

CAHIER DE

Formation

N° 26 **Biologie médicale**

**IMMUNO-HÉMATOLOGIE
ET GROUPES SANGUINS**



CAHIER DE

Formation

Biologie médicale



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA déjà parus et distribués à l'ensemble des LABORATOIRES D'ANALYSES de BIOLOGIE MEDICALE en FRANCE.

]

TOUT LE CONTENU DE CE FICHER RESTE LA PROPRIETE DE BIOFORMA.
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

]

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schémas et photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront poursuivies devant les tribunaux compétents.

]

Seule une impression pour une copie personnelle (étudiant, interne, biologiste de labm) est permise.





Cher Confrère,

Nous vous présentons ci-après un nouveau numéro des Cahiers de Formation de Biologie Médicale consacré aux techniques de groupes sanguins.

Sujet difficile, sulfureux pour les raisons que chacun sait, qui n'en est pas moins partie intégrante de la biologie médicale et dont il est indispensable que chaque Directeur de laboratoire maîtrise parfaitement la pratique.

Des textes réglementaires, récemment parus, obligent à une modernité technique de haut niveau à l'ensemble de cette discipline, validant le système français au sein du système international.

Au moment crucial de la transfusion sanguine dont dépend le plus souvent la survie du receveur chaque minute, chaque geste compte. La parfaite connaissance des procédures à mettre en œuvre, l'intelligence des recherches à effectuer, la capacité à fournir un résultat clair et cohérent sont autant d'éléments positifs qui permettent un dialogue fécond avec le clinicien.

Ce Cahier de mise à niveau des connaissances en la matière doit être un outil d'usage quotidien pour vous et vos équipes.

BIOFORMA souhaite ainsi poursuivre sa mission de formation continue. Nous vous souhaitons bonne réception de ce document et vous prions d'accepter, Cher Confrère, nos cordiales et confraternelles salutations.

Adrien BEDOSSA
Président

IMMUNO-HÉMATOLOGIE ET GROUPES SANGUINS

ASPECTS THÉORIQUES
APPLICATIONS CLINIQUES
ET TRANSFUSIONNELLES

LISTE DES AUTEURS

- Professeur Christian Janot
avec la collaboration du Docteur Lucienne Mannessier
et la participation des
Docteur Jacques Chiaroni
Docteur Annette Lejealle
Docteur Suzanne Mathieu-Nafissi
Docteur Francis Roubinet

- Christian Janot
Professeur des Universités - Faculté de médecine de Nancy
EFS Lorraine - Champagne - Nancy

- Lucienne Mannessier
EFS Nord de France - Lille

- Jacques Chiaroni
EFS Alpes - Méditerranée - Marseille

- Annette Lejealle
EFS Ile-de-France - Paris

- Suzanne Mathieu-Nafissi
EFS Lorraine - Champagne - Nancy

- Francis Roubinet
EFS Pyrénées - Méditerranée - Toulouse

S O M M A I R E



PRÉFACE	9
EXTRAIT DU JOURNAL OFFICIEL DU 4 MAI 2002	12
IMMUNO-HÉMATOLOGIE ÉVOLUTION DES ASPECTS RÉGLEMENTAIRES	21
GLOSSAIRE	29
NOMENCLATURE DES GROUPES SANGUINS	31
SYSTÈME ABO ISBT 001	35
I - Les 4 principaux phénotypes ABO	35
II - Les sous-groupes A1 et A2	37
III - Les phénotypes rares ABO	38
IV - Les anticorps du système ABO	40
SYSTÈME H ISBT 018 (anciennement Hh-SE-se)	42
I - Les enzymes α 1-2fucosyltransférases et l'antigène H	42
II - Les phénotypes H déficients	43
III - Les anticorps anti-H	43
BIOCHIMIE DES ANTIGÈNES ABH	44
SYSTÈME LE ISBT 007 (anciennement Lewis)	47
I - Génétique et biochimie	47
II - Les phénotypes LE	48
III - Les anticorps anti-LE	48
BASES MOLÉCULAIRES DES ANTIGÈNES ABH ET LE	50
SYSTÈME P1 ISBT 003 (anciennement P) ET ANTIGÈNE DU « GLOBOSIDE » ISBT 209	53
I - Les antigènes	53
II - Les anticorps anti-P1	54
III - Biochimie et génétique	54

SYSTÈME LU ISBT 005 (anciennement Luthéran)	56
I - Les antigènes	56
II - Les anticorps anti-LU	57
III - La biochimie et la génétique	57
SYSTÈME RH ISBT 004 (anciennement Rh, Rhésus)	59
I - Historique	59
II - Les antigènes communs	60
III - Les autres antigènes du système RH	60
IV - Les haplotypes partiellement affaiblis	62
V - Les haplotypes partiellement silencieux	62
VI - Les haplotypes totalement silencieux	63
VII - Les anticorps du système RH	63
VIII - Génétique et biochimie	64
IX - Terminologie des génotypes et phénotypes	66
LES ANTIGÈNES DE GRANDE FRÉQUENCE OU « ANTIGÈNES PUBLICS »	69
LES ANTIGÈNES DE FAIBLE FRÉQUENCE OU « ANTIGÈNES PRIVÉS »	70
SYSTÈME KEL ISBT 006 (anciennement KELL)	71
I - Les antigènes	71
II - Les anticorps anti-KEL	73
III - Le phénotype Mac Leod et le système XK	74
IV - Biochimie et génétique	75
SYSTÈME FY ISBT 008 (anciennement Duffy)	77
I - Les antigènes FY1	77
II - Les anticorps anti-FY	79
III - La biochimie et la génétique	79
IV - La fonction des antigènes FY	80
SYSTÈME JK ISBT 009 (anciennement Kidd)	81
I - Les antigènes	81
II - Les anticorps	82
III - La biochimie et la génétique	83
SYSTÈME MNS ISBT 002 (anciennement MNSs)	84
I - Les quatre antigènes : MNS1, MNS2, MNS3 et MNS4	84
II - Les anticorps	85
III - La biochimie	85

SYSTÈME XG ISBT 012 (anciennement Xg) LIÉ AU SEXE	87
I - Généralités	87
II - Fréquence des phénotypes	87
III - Génétique	87
IV - L'antigène XG1	89
LES POLYAGGLUTINABILITÉS	90
I - Généralités	90
II - Les polyagglutinabilités congénitales	90
III - Les polyagglutinabilités acquises	92
INCOMPATIBILITÉS FŒTO-MATERNELLES ÉRYTHROCYTAIRES NON ABO (IFM)	97
I - Les anticorps et antigènes concernés	97
II - Physio-pathologie	98
III - Épidémiologie	99
IV - Surveillance de la grossesse	100
V - Prévention de l'allo-immunisation à l'antigène RH1	103
ASPECTS BIOLOGIQUES DES ACCIDENTS HÉMOLYTIQUES DE TRANSFUSION SANGUINE	106
I - Étiologie des accidents	106
II - Accidents par anticorps anti-érythrocytaires	107
III - Diagnostic biologique	109
IV - Prévention	109
PRINCIPES GÉNÉRAUX DE LA TRANSFUSION SANGUINE ET PRODUITS SANGUINS LABILES	115
I - Caractéristiques principales des PSL	116
II - Rappel sur les indications des PSL	118
III - Qualifications et transformations des PSL	118
LES ANÉMIES HÉMOLYTIQUES AUTO-IMMUNES	123
I - Définition	123
II - Diagnostic	124
III - Mécanismes physio-pathogéniques	125
IV - Populations touchées	125
V - Antigènes cibles	126
VI - Classification des AHAI et pathologies associées	127
VII - Hémolysé et médicament	130
VIII - Traitements des AHAI	131
TECHNOLOGIES ACTUELLES EN IMMUNOHÉMATOLOGIE ÉRYTHROCYTAIRE	136
I - Rappel technologique	136
II - Techniques actuelles d'agglutination	139

III - Alternatives actuelles aux techniques d'agglutination	142
IV - Alternatives actuelles aux techniques immunologiques	144
V - Les évolutions technologiques doivent s'accompagner d'une prise en compte du facteur humain	144
TYPAGES ÉRYTHROCYTAIRES ET DIFFICULTÉS	147
I - Principes généraux d'un typage érythrocytaire	147
II - Validation analytique du typage érythrocytaire	149
III - Conduites spécifiques en fonction des anomalies	150
RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI-ÉRYTHROCYTAIRES (RAI)	158
I - Principe	158
II - Indications	158
III - Les différents anticorps anti-érythrocytaires	159
IV - La réaction d'agglutination	160
V - Modalités pratiques	161
VI - Les différentes techniques de RAI	163
VII - Interprétation et rendu des résultats	164
ÉPREUVE DIRECTE DE COMPATIBILITÉ AU LABORATOIRE (EDC)	168
I - Rappels des modalités techniques de l'EDC	168
II - Interprétation	169
III - Arbres décisionnels	170
VALIDATION ANALYTIQUE EN IMMUNOHÉMATOLOGIE ÉRYTHROCYTAIRE	172
I - Contrôle des réactifs à réception	173
II - Contrôles quotidiens internes (CQI)	174
III - Validation analytique	175

PRÉFACE

Le sang, tissu liquide dont le rôle vital a été connu dès la préhistoire continue d'avoir dans l'esprit populaire un aspect mythique, il est un facteur de vie.

Dès 1616, HARVEY met en évidence la circulation sanguine et le mouvement perpétuel du sang. Plus tard LOWER observe que le sang imbibé d'air après son passage dans les poumons redevient rouge mais l'explication de cette propriété de relâcher l'oxygène revient à SELYE en 1867. Ce n'est qu'en 1900 que les groupes sanguins ABO sont reconnus par Karl LANDSTEINER permettant avec les découvertes tardives des autres systèmes de groupes érythrocytaires et leur mécanisme génétique de transmission, l'essor de l'immuno-hématologie, de la transfusion sanguine, l'éclaircissement de certaines pathologies et de leur traitement. Au-delà de toutes les fonctions physiologiques remplies par le sang dans l'organisme des vertébrés supérieurs et de plusieurs invertébrés, le sang a été utilisé comme marqueur génétique pour l'identification des individus bien avant que nous ne connaissions le polymorphisme de l'ADN. Il a permis sur le plan géographique de suivre la migration des populations sur la terre ; en anthropologie l'étude des groupes sanguins a montré chez les primates une structuration qui s'élabore au fur et à mesure de l'évolution des singes avec parfois certains paradoxes.

La connaissance des groupes sanguins a surtout permis le développement extraordinaire de la transfusion sanguine après la seconde guerre mondiale. Cette thérapeutique nouvelle a autorisé les grands progrès de la médecine, de la chirurgie et de l'obstétrique qui n'auraient pu être réalisés sans l'apport de sang humain provenant de donneurs de sang bénévoles.

La transfusion sanguine n'a qu'un effet palliatif car la survie des éléments constitutifs du sang est limitée dans l'organisme du receveur, on ne peut pas la considérer comme une greffe de tissu ou d'organe dont le succès est assurée par la pérennité de la survie de cet organe appelé à remplacer la fonction vitale que remplissait le tissu malade.

Malgré les effets adverses devenus très exceptionnels que peut revêtir la transfusion sanguine, elle demeure indispensable pour apporter au malade les constituants du sang qui lui font défaut avec des possibilités techniques très différentes selon les pays. En France et dans les pays développés, la transfusion sanguine est organisée en réseau permettant d'assurer avec la plus grande sécurité ses quatre missions de base que sont :

- Le prélèvement du sang chez le donneur bénévole.
- La qualification biologique qui permet la caractérisation immunologique et la sécurité infectieuse du sang.

- La préparation des produits sanguins labiles à usage thérapeutique qui consiste à séparer à partir du sang total : les globules rouges, les plaquettes, les globules blancs et le plasma. Chacun de ces éléments ayant des propriétés thérapeutiques propres, seul le facteur déficitaire présent chez le malade lui sera apporté.
- La cession ou distribution aux malades hospitalisés dans les établissements privés et publics de santé.

Actuellement, en 2002, la France dispose de structures parfaitement organisées régulées et fédérées par l'Etablissement Français du Sang et, avec son réseau transfusionnel, de moyens de préparation du sang et de sécurisation des produits de très haut niveau technologique, notre pays est autosuffisant au prix d'efforts importants développés par les associations de donneurs de sang bénévoles administrés par la Fédération Française. Ainsi sont garantis les trois piliers du système : le volontariat, l'anonymat et le bénévolat, bases du don que l'on peut considérer comme un devoir civique pour le citoyen.

La transfusion sanguine doit assurer pour la sécurité du receveur deux missions principales :

- La compatibilité immunologique, c'est-à-dire toutes les analyses d'immuno-hématologie.
- L'absence de transmission de maladies infectieuses ou autres, le sang pouvant être le vecteur de nombreux micro-organismes pathogènes.

Nous avons dans ce document de travail et de formation à l'attention des transfuseurs et des biologistes fait un point d'actualité sur la théorie des groupes sanguins érythrocytaires chez l'homme et une mise à jour des différentes technologies utilisées dans un laboratoire d'immuno-hématologie. Plus que dans d'autres domaines de la biologie, les erreurs de laboratoire peuvent avoir des conséquences gravissimes pour le receveur. C'est une des raisons pour lesquelles, les biologistes avec l'aide des industriels ont contribué à la standardisation des réactifs et des techniques. L'automatisation et l'informatisation ont considérablement progressé au cours de ces dernières années accroissant ainsi la sécurité transfusionnelle. L'assurance qualité a également participé à cette sécurité en aidant les laboratoires à respecter les bonnes pratiques de qualification biologique des dons, le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale et garantissant ainsi au maximum la phase analytique des examens biologiques. Quant aux étapes pré et post analytiques, elles appartiennent aux établissements de santé. Ces derniers se doivent aujourd'hui de disposer d'un Comité de Sécurité Transfusionnelle et d'Hémovigilance faisant participer tous les acteurs de la transfusion sanguine. Ces Comités sont également des structures d'observation des incidents et accidents transfusionnels permettant de recenser toutes les complications résiduelles et de les corriger à toutes les étapes de la chaîne transfusionnelle.

Ces évolutions technologiques ont permis une révision de la législation française avec la parution de l'arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale. Cette simplification se traduisant par une égale sécurité.

Il ne faut pas manquer de souligner que tout acte de la vie qu'il soit médical ou non médical comporte des risques que la société doit comprendre et doit assumer ; certains d'entre eux sont acceptés par l'homme (alcool, tabac, drogue...) d'autres sont considérés comme intolérables. Cette façon de considérer les faux-pas de la vie doit être modulée par la méconnaissance de certains traitements, de certains micro-organismes de la part des scientifiques qui ne leur permet pas de tout appréhender. De deux maux il faut toujours choisir le moindre par exemple transfuser un grand polytraumatisé ou vacciner pour prévenir des pandémies ; l'un comme l'autre de ces gestes peut avoir des effets adverses : un vaccin sous dosé en antigène ne sera pas protecteur mais bien toléré, surdosé il protégera contre la maladie mais sera probablement mal toléré. Dans les deux cas le scientifique pourra être mis en cause, c'est la raison pour laquelle la recherche de l'équilibre doit être constante.

Et lorsque la science ne « suit » pas la constatation ou la naissance d'une pathologie nouvelle, s'applique le « principe de précaution » dont les vertus ne sont plus à vanter, mais qui peut également avoir des effets négatifs dans l'attente de la découverte et de l'identification du problème.

La France a la chance d'avoir le meilleur système transfusionnel au monde, il est universel, il est gratuit, il est bénévole, il est anonyme et il garantit l'autosuffisance. Malheureusement de telles performances ne sont pas la règle dans tous les pays et il faut féliciter tous nos concitoyens et tous les scientifiques qui permettent de telles performances au service des malades.

Avant de refermer cette réflexion générale sur la transfusion sanguine, nous voudrions dédier cet ouvrage à notre Maître Monsieur le Professeur Charles SALMON qui tout au long de sa carrière a œuvré dans la découverte des groupes sanguins, a fait progresser l'immuno-hématologie et la transfusion sanguine. Qu'il y trouve l'hommage de ses élèves.

Christian JANOT

EXTRAIT DU JOURNAL OFFICIEL DU 4 MAI 2002

SANTÉ

Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale

NOR : SANP0221588A

Le ministre délégué à la santé,

Vu le code de la santé publique, et notamment les articles L. 6211-8 (4°), L. 6213-1, L. 6213-2, L. 6213-3, L. 1131-1, L. 1131-2, L. 1131-3 ;

Vu le décret n° 76-1004 du 4 novembre 1976, modifié notamment par le décret n° 93-354 du 15 mars 1993, fixant les conditions d'autorisation des laboratoires d'analyses de biologie médicale ;

Vu le décret n° 83-104 du 15 février 1983, modifié notamment par le décret n° 93-354 du 15 mars 1993, relatif au contrôle de bonne exécution des analyses de biologie médicale prévu par l'article L. 6213-2 du code de la santé publique ;

Vu l'arrêté du 12 janvier 1999 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en assistance médicale à la procréation ;

Vu l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale ;

Vu la proposition du directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé du 26 octobre 2001, modifiée le 12 décembre 2001 et le 5 avril 2002 ;

Vu l'avis de la Commission nationale permanente de biologie médicale du 16 janvier 2002,

Arrête :

Art. 1^{er}. – Le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale annexé à l'arrêté du 26 novembre 1999 est modifié ainsi qu'il suit :

Au III du guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale, le premier paragraphe du 2.2.2 est supprimé ;

Le IV du guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale est complété par un C ainsi intitulé : « C. – Cas parti-

culier des bonnes pratiques de laboratoire en immuno-hématologie érythrocytaire », dont les dispositions et les annexes figurent en annexe du présent arrêté.

Art. 2. – Le directeur général de la santé, le directeur de l'hospitalisation et de l'organisation des soins et le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire et des produits de santé sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié ainsi que ses annexes au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 26 avril 2002.

BERNARD KOUCHNER

ANNEXE GÉNÉRALE

C. – CAS PARTICULIER DES BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE EN IMMUNO-HÉMATOLOGIE ÉRYTHROCYTAIRE

En vue de mettre en œuvre une sécurisation des analyses et des résultats en immuno-hématologie érythrocytaire quelle que soit la finalité des analyses prescrites, ainsi qu'une sécurisation de la transmission des résultats, il est fixé pour ces analyses :

- les champs d'application ;
- les règles de réalisation ;
- le contrôle de qualité interne ;
- les conditions d'automatisation et d'informatisation ;
- la carte de groupes sanguins.

I. – Champ d'application

Les champs d'application concernant les analyses d'immuno-hématologie érythrocytaire suivantes :

- 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 le dosage pondéral des anti-RH ;
 - l'épreuve directe de compatibilité au laboratoire ;
 - le test direct à l'antiglobuline,
- sont définis dans l'annexe D I.

II. - Règles de réalisation des analyses

Tous les réactifs nécessaires aux examens d'immuno-hématologie érythrocytaire doivent être conformes à la législation et à la réglementation relative aux conditions particulières de mise sur le marché en vigueur à la date de lancement.

1. Le groupage ABO-RH1 (RhD)

1.1. Définition de l'analyse

Cette analyse consiste à déterminer de manière indissociable les phénotypes ABO et RH1 (RhD) du système RH.

1.2. Modalités de mise en œuvre

1.2.1. Le principe

Une réalisation du groupage sanguin ABO-RH1 :

Une réalisation du groupage sanguin ABO repose sur deux épreuves complémentaires :

- une épreuve globulaire qui consiste à rechercher les antigènes A (ABO1) et B (ABO2) avec les réactifs monoclonaux suivants : anti-A (anti-ABO1), anti-B (anti-ABO2) et anti-AB (anti-ABO3) ;
- une épreuve plasmatique qui consiste à rechercher les anticorps anti-A et anti-B avec les hématies-tests A1 et B. Au moins une de ces hématies doit être de phénotype RH : -1.

Une réalisation du groupage sanguin RH1 comporte obligatoirement l'utilisation d'un réactif anti-RH1 d'origine monoclonale et du réactif témoin dépourvu de toute activité anticorps mais dont la capacité d'agglutination d'hématies sensibilisées est strictement identique au réactif anti-RH1.

Une détermination du groupage sanguin ABO-RH1 :

Sa définition est fonction des conditions techniques :

- si les opérations du groupage sanguin, incluant les modalités de vérification et d'enregistrement des échantillons et des prescriptions, sont strictement réalisées dans les conditions d'automatisation et d'informatisation décrites à l'article IV Automatisation et informatisation, une détermination repose sur une seule réalisation exécutée à l'aide d'un lot de réactifs, d'un lot d'hématies-tests et par un technicien ;
- dans tous les autres cas, une détermination 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.

Un groupage sanguin ABO-RH1 valide :

Un groupage sanguin ABO-RH1 valide est réalisé sur deux prélèvements différents à raison d'une détermination par prélèvement.

1.2.2. Les contrôles qualité internes

En ce qui concerne la détermination ABO, le système analytique doit être contrôlé en utilisant une série d'échantillons de contrôle de phénotypes garantis (typage obtenu par un processus technique différent de celui qui doit être contrôlé par ces échantillons) comprenant au minimum :

- un échantillon de groupe A ;
- un échantillon de groupe B ;
- un échantillon de groupe O.

En ce qui concerne la détermination du groupe RH1, le système analytique doit être contrôlé en utilisant une série d'échantillons de contrôle de phénotypes garantis (typage obtenu par un processus technique différent de celui qui doit être contrôlé par ces échantillons) comprenant au minimum :

- un échantillon de groupe RH : 1 ;
- un échantillon de groupe RH : -1.

1.2.3. Interprétation et validation des résultats, gestion des anomalies (Annexe D II)

2. Le phénotypage RH-KEL 1 (Rh-K)

2.1. Définition de l'analyse

Cette analyse comprend l'étude des antigènes RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e) et KEL 1 (K).

2.2. Modalités de mise en œuvre

2.2.1. Le principe

Une réalisation du phénotypage RH-KEL 1 :

Une réalisation du phénotypage RH-KEL 1 comporte obligatoirement l'utilisation des réactifs anti-RH2, anti-RH3, anti-RH4, anti-RH5, anti-KEL 1 et du (des) réactif(s) témoin(s) adéquat(s). Il est recommandé d'utiliser des réactifs d'origine monoclonale.

Une détermination du phénotypage RH-KEL 1 :

Sa définition est fonction des conditions techniques :

- si les opérations du phénotypage RH-KEL 1, incluant les modalités de vérification et d'enregistrement des échantillons et des prescriptions, sont strictement réalisées dans les conditions d'automatisation et d'informatisation décrites à l'article IV Automatisation et informatisation, une détermination repose sur une seule réalisation exécutée à l'aide d'un lot de réactifs et par un technicien ;
- dans tous les autres cas, une détermination 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.

Un phénotypage RH-KEL 1 valide :

Un phénotypage RH-KEL 1 valide est réalisé sur deux prélèvements différents à raison d'une détermination par prélèvement.

2.2.2. Les contrôles qualité internes

Le système analytique doit être contrôlé en utilisant une série d'échantillons de contrôle de phénotypes garantis (typage obtenu par un processus analytique différent de celui qui doit être contrôlé par ces échantillons) comprenant pour chaque spécificité les hématies suivantes :

- anti-RH2 : un échantillon RH :2,4 et un échantillon RH : -2,4 ;
- anti-RH3 : un échantillon RH :3,5 et un échantillon RH : -3,5 ;
- anti-RH4 : un échantillon RH :2,4 et un échantillon RH :2,-4 ;
- anti-RH5 : un échantillon RH :3,5 et un échantillon RH :3,-5 ;
- anti-KEL 1 : un échantillon KEL :1 et un échantillon KEL : -1.

2.2.3. Interprétation et validation des résultats, gestion des anomalies (Annexe D III)

3. Le phénotypage étendu

3.1. Définition de l'analyse

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.

3.2. Modalités de mise en œuvre

3.2.1. Le principe

Une réalisation du phénotypage étendu :

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

Une détermination du phénotypage étendu :

Sa définition est fonction des conditions techniques :

- si les opérations du phénotypage étendu, incluant les modalités de vérification et d'enregistrement des échantillons et des prescriptions, sont strictement réalisées dans les conditions d'automatisation et d'informatisation décrites à l'article IV Automatisation et informatisation, une détermination repose sur une seule réalisation exécutée à l'aide d'un lot de réactifs et par un technicien ;
- dans tous les autres cas, une détermination 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.

Un phénotypage étendu valide :

Un phénotypage étendu valide est réalisé sur deux prélèvements différents à raison d'une détermination par prélèvement.

3.2.2. Les contrôles qualité internes

Le système analytique doit être contrôlé en utilisant, pour chaque spécificité, deux échantillons de contrôle de phénotypes garantis (typage obtenu par un processus analytique différent de celui qui doit être contrôlé par ces échantillons). L'un de ces échantillons doit être négatif et l'autre d'expression « hétérozygote ».

3.2.3. Interprétation et validation des résultats, gestion des anomalies (Annexe D IV)

4. La recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI)

4.1. Définition de l'analyse

A l'aide de gammes d'hématies-tests d'origine humaine, telles qu'elles sont définies en 4.2.1, on dépiste puis identifie, sur du sérum ou du plasma, les anticorps dirigés contre les antigènes érythrocytaires autres que A et B.

4.2. Modalités de mise en œuvre

4.2.1. Le principe

La recherche d'anticorps anti-érythrocytaires 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 » d'anticorps anti-érythrocytaires. En cas de dépistage positif, l'identification de l'anticorps est obligatoire.

Cette étape repose sur l'utilisation d'une gamme d'au moins trois hématies-tests de groupe O qui doit permettre la détection des anticorps correspondants aux antigènes RH1 (D), RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e), KEL 1 (K), KEL 2 (Cellano), KEL 4 (Kpb), FY1 (Fya), FY2 (Fyb), JK1 (Jka), JK2 (Jkb), MNS1 (M), MNS2 (N), MNS3 (S), MNS4 (s), LE1 (Lea), LE2 (Leb), P1, LU2 (Lub).

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

- RH : 1,2,-3,-4,5 ;
- RH : 1,-2,3,4,-5 ;
- RH : -1,-2,-3,4,5.

De plus, une expression phénotypique « homozygote » doit être respectée pour les antigènes FY1, JK1, JK2, MNS3 et recommandée pour les antigènes FY2 et MNS4.

En aucun cas ces hématies ne feront l'objet de mélange.

Une étape d'identification qui consiste à déterminer la spécificité du ou des anticorps présents, en confrontant la distribution des réactions positives et négatives obtenues avec la distribution des antigènes sur les gammes d'hématies-tests utilisées.

Cette étape est réalisée sur un échantillon non décanté et non ouvert si possible, si elle est mise en œuvre par un laboratoire différent de celui qui a réalisé le dépistage.

Cette étape repose sur l'utilisation, outre la gamme de dépistage, d'au moins 10 hématies-tests. L'ensemble de ces hématies de groupe O doit comporter les antigènes suivants : RH1, RH2, RH3, RH4, RH5, RH6, RH8 (Cw), KEL 1, KEL 2, KEL 3 (Kpa), KEL 4, FY1, FY2, JK1, JK2, MNS1, MNS2, MNS3, MNS4, LE1, LE2, P1, LU1 (Lua), LU2.

Les phénotypes suivants doivent être représentés au moins sur deux hématies : KEL 1, FY :1,-2, FY :1,-2, JK :1,-2, JK :1,-2, MNS :3,-4, MNS :3,4, P :1.

Cette phase doit permettre l'identification d'un anticorps courant isolé ainsi qu'une orientation dans l'identification des mélanges d'anticorps.

Les techniques :

Pour les deux étapes, la méthodologie technique repose sur la mise en œuvre d'un test indirect à l'antiglobuline polyspécifique ou anti-IgG permettant de détecter, sur colonne de filtration ou en immuno-adhérence, un anti-RH1 humain de concentration égale à 20 ng/ml ou d'autres techniques de sensibilité au moins égale.

Lors de la phase d'identification, il peut être utile voire indispensable d'utiliser en complément les techniques dites enzymatiques notamment dans le cadre de difficulté d'identification (association d'alloanticorps) et lors des étapes de diagnostic biologique des accidents immunohémolytiques transfusionnels.

4.2.2. Les contrôles qualité internes

Le système analytique sera contrôlé en utilisant des échantillons de contrôle comportant des anticorps (natifs ou réactifs) de spécificité et de titre connus avec au minimum un anticorps de titre ≤ 4 dans la technique d'utilisation et sur une hématie comportant l'antigène correspondant d'expression « hétérozygote ».

4.2.3. Interprétation et validation des résultats (Annexe D V)

5. Le titrage des anticorps anti-érythrocytaires immuns autres que les anti-A et anti-B et le dosage pondéral des anti-RH

5.1. Définition de l'analyse

Le titrage consiste à tester le plasma ou le sérum des patientes et ses dilutions vis-à-vis d'hématies - tests possédant les antigènes spécifiques. La surveillance de l'évolution du taux des anticorps est basée obligatoirement sur le titrage par le test indirect à l'antiglobuline.

Le dosage pondéral consiste à mesurer par méthode semi-quantitative et automatisée, la concentration en anticorps. Applicable aux seuls anti-RH, elle consiste en un dosage comparatif par rapport à l'étalon international anti-RH1 dont la concentration est connue. Le plasma ou le sérum des femmes enceintes immunisées et ses dilutions sont testés vis-à-vis d'hématies - tests possédant l'antigène spécifique correspondant.

5.2. Modalités de mise en œuvre

5.2.1. Le principe

Le titrage des anticorps consiste à tester le plasma ou le sérum ainsi que ses dilutions de raison géométrique 2 vis à vis d'hématies possédant l'antigène correspondant à l'anticorps identifié de façon extemporanée.

La technique de référence est le test indirect à l'antiglobuline technique tube, en utilisant des hématies natives en solution saline 0,15M.

La technique doit être standardisée, c'est à dire pratiquée :

- avec des réactifs identiques : antiglobuline et mélange d'hématies - tests de même phénotype érythrocytaire ;
- par rapport à un standard anti-RH1 de titre connu ;
- avec reprise en parallèle de l'échantillon précédent conservé congelé à une température inférieure ou égale à -30°C ;
- en automatisant si possible la réalisation des dilutions à l'aide d'un diluteur. Par ailleurs, la dilution sera extemporanée et si possible portera sur un volume minimum de 100 μl .

Un mélange de trois variétés d'hématies natives doit être utilisé. Elles seront prélevées depuis moins de quatorze jours en solution de conservation et de phénotype suivant RH :1, 2, 3, 4, 5 pour les anti-RH1 purs ou associés à un anti-RH2 ou un anti-RH3, d'expression hétérozygote pour les antigènes correspondant aux autres anticorps à tester.

5.2.2. Les contrôles qualité internes

Ils comportent l'étude du standard anti-RH1 de concentration connue à différentes dilutions.

5.2.3. Validation analytique (Annexe D VI)

6. L'épreuve directe de compatibilité au laboratoire

6.1. Définition de l'analyse

C'est une analyse qui consiste à tester l'échantillon de sérum ou de plasma du receveur vis-à-vis des hématies de la tubulure du produit sanguin à transfuser.

6.2. Modalités de mise en œuvre

6.2.1. Le principe

L'épreuve directe de compatibilité au laboratoire se déroule en trois étapes :

1° Sélection des unités à compatibiliser conformément aux bonnes pratiques de distribution. Cette sélection prend en compte :

Le statut immuno-hématologique du receveur dont la définition minimale préalable repose obligatoirement, en absence d'antécédents valables, sur :

- le groupage ABO.RH1 ;
- le phénotypage RH-KEL 1 ;
- le phénotypage autre que RH-KEL 1 d'un ou plusieurs antigènes immunogènes si une antigène ou séro compatibilité les concernant doit être respectée ;
- le dépistage d'anticorps anti-érythrocytaires dont le délai par rapport à la date effective de la transfusion est conforme aux dispositions réglementaires ;
- l'identification d'anticorps anti-érythrocytaires en cas de dépistage positif.

La mention d'un protocole transfusionnel éventuel spécifique à la situation clinique considérée.

2° Préparation des hématies de la tubulure.

Cette étape a pour but de conditionner les hématies de la tubulure afin qu'elles puissent être testées dans les mêmes conditions techniques que la RAI.

Au cours de cette étape, il convient d'être particulièrement attentif aux modalités d'identification de la tubulure et des échantillons secondaires à partir du numéro codé en barres de l'unité de produit sanguin.

3^e Exécution technique.

Les conditions techniques sont identiques à celles utilisées par la RAI.

6.2.2. Les contrôles qualité internes

Le système analytique doit être contrôlé en utilisant des échantillons de contrôle identiques à ceux utilisés pour la RAI.

6.2.3. Interprétation et validation des résultats (Annexe D VII)

7. Le test direct à l'antiglobuline

7.1. Définition de l'analyse

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 du complément. Ce test doit être réalisé sur un échantillon de préférence anticoagulé.

7.2. Modalités de mise en œuvre

7.2.1. Le principe

La mise en évidence de la sensibilisation *in vivo* des hématies repose sur l'utilisation d'antiglobuline(s) humaine(s) dont la portion Fab reconnaît les marqueurs isotypiques d'immunoglobulines ou des fractions du complément spécifiquement fixées sur l'hématie.

La réalisation de cette analyse impose d'utiliser de façon simultanée et indépendante une antiglobuline anti-IgG et un anti-C3d ainsi que des réactifs témoins appropriés.

7.2.2. Les contrôles qualité internes

Le système analytique sera contrôlé en utilisant des hématies préalablement sensibilisées *in vitro* par des IgG et éventuellement du complément.

7.2.3. Interprétation et validation des résultats (Annexe D VIII)

III. - Contrôle de qualité interne (CQI)

Le biologiste devra organiser un contrôle de qualité interne conformément au guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA) et qui repose notamment sur l'analyse d'échantillons de contrôle effectuée dans les mêmes conditions que celles appliquées aux échantillons biologiques. Les résultats relatifs à ces échantillons de contrôle doivent être connus et garantis. La mise en œuvre de ces contrôles est, au minimum, quotidienne.

IV. - Automatisation. - Informatisation

1. Automatisation et exécution analytique

Les caractéristiques, les modalités de mise en place et le fonctionnement des matériels automatiques et informatiques seront conformes aux règles générales d'exécution des analyses de biologie médicale prévues par le GBEA en vigueur.

1.1. Objectifs de l'automatisation et de l'informatisation au laboratoire d'immuno-hématologie (Annexe D IX)

1.2. Définition des caractéristiques minimales d'un système permettant de dire que le processus d'analyse immuno-hématologique est automatique

Quel que soit le degré d'automatisation du processus analytique, sa qualité est directement liée à la phase préanalytique qui comporte des opérations manuelles critiques dont l'erreur peut remettre en cause la fiabilité du résultat :

- acceptation des échantillons et des documents accompagnateurs (prescription - fiche de suivi médical),
- saisie de l'état civil,
- établissement du lien entre patient - support d'identification positive - échantillon.

Ces opérations doivent faire l'objet de procédures écrites et détaillées permettant d'éviter toute erreur de saisie ou d'identification. Il

est nécessaire de mettre en œuvre des opérations spécifiques permettant une vérification de la saisie et du lien entre le patient et son échantillon.

A ce titre, la saisie informatique de l'état civil à partir de la prescription doit être suivie d'un contrôle basé sur une deuxième saisie réalisée à partir des informations inscrites sur l'échantillon et après une identification positive de celui-ci.

La qualification « d'automatique » pour un système donné impose que celui-ci puisse prendre en charge certaines phases de l'exécution analytique apparaissant comme critiques pour la fiabilité des résultats et puisse associer de façon automatique et univoque le patient aux résultats correspondants via le support d'identification positive de l'échantillon. Cette conception peut donc s'appliquer aussi bien aux automates qu'aux semi-automates tels qu'ils sont définis en biologie médicale et qui fonctionnent dans un système informatique donné.

L'attribution de cette qualification repose donc sur la prise en charge, par le système (ensemble de l'automate et de l'environnement informatisé du laboratoire) concerné, des opérations mentionnées en annexe D X.

2. Sécurisation du transfert des résultats du laboratoire sur le centre de distribution (Annexe D XI)

V. - Carte de groupes sanguins

La carte de groupes sanguins est un document de synthèse de données biologiques permettant d'assurer la sécurité transfusionnelle immunologique du patient.

La carte de groupes sanguins est éditée par un système informatique validé. Toute retranscription manuelle ou utilisation d'étiquettes de groupe autocollantes est interdite. Les deux déterminations portées sur la carte seront effectuées par le même laboratoire.

L'ensemble des mentions nécessaires à la sécurité transfusionnelle immunologique doit apparaître sur une seule face de la carte.

1. Mentions apparaissant sur la carte de groupes sanguins

1.1. Identification du laboratoire qui a édité la carte de groupes sanguins

Nom du laboratoire.
Adresse.
Téléphone.
Signature du biologiste.

1.2. Identification du patient

Nom de naissance complété s'il y a lieu du nom marital.
Prénom(s) et en cas de prénom composé, transcription du prénom complet en toutes lettres.
Sexe.
Date de naissance.
En cas de changement de nom marital, la carte reste valide si les autres identifiants sont corrects.

1.3. Groupes sanguins et phénotypes érythrocytaires

Le résultat de chaque détermination est suivi de la date de sa réalisation.

Une mention rappelle que les groupes sanguins et les phénotypes ne sont valides qu'après deux déterminations. Cette mention peut être portée au dos de la carte.

Il est recommandé d'utiliser la nomenclature alphanumérique internationale.

1.4. Recherche d'anticorps anti-érythrocytaires

La présence d'un ou plusieurs anticorps anti-érythrocytaires est mentionnée sur la carte suivie de la date de découverte de l'anticorps. Il n'est pas fait mention des caractéristiques (liste des antigènes) des gammes d'hématies-tests qui ont été utilisées, ainsi que leur provenance.

Une recherche d'anticorps anti-érythrocytaire négative ne fait l'objet d'aucune mention sur la carte de groupes sanguins.

Il est recommandé d'utiliser la nomenclature alphanumérique internationale.

2. Cas particulier du nouveau-né

La détermination des groupes sanguins chez un nouveau-né ou un nourrisson nécessite un prélèvement de sang veineux. Elle ne peut pas être réalisée à partir d'un prélèvement de sang effectué au cordon.

Le document de groupes sanguins n'est valide que jusqu'à l'âge de six mois. Il doit mentionner : « groupe sanguin de nouveau-né – valide jusqu'au – date de naissance + 6 mois – ».

ANNEXE D

BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE EN IMMUNO-HÉMATOLOGIE ÉRYTHROCYTAIRE

ANNEXE DI

CHAMPS D'APPLICATION

1. Groupage ABO-RH1

En absence de résultats valides, cette analyse est réalisée :

- dans un contexte prétransfusionnel avéré ou potentiel ;
- dans un contexte pré-nuptial, pré ou périnatal conformément aux dispositions réglementaires relatives au suivi de la grossesse. Dans ce contexte les réactifs anti-RH1 utilisés doivent détecter la plupart des variants RH1 ;
- pour la validation de l'identification d'anticorps anti-érythrocytaires ;
- en l'absence de résultats valides du phénotype RH-KEL 1 cette analyse est obligatoirement complétée par un phénotype RH-KEL 1.

2. Phénotype RH-KEL 1

En absence de résultats valides, cette analyse est réalisée :

- dans un contexte prétransfusionnel avéré ou potentiel. La prise en compte du résultat s'inscrit dans le cadre des bonnes pratiques de distribution ;
- dans le contexte pré-nuptial, pré ou périnatal conformément aux dispositions réglementaires relatives au suivi de la grossesse ;
- pour la validation de l'identification d'anticorps anti-érythrocytaires ;

En absence de résultats valides de groupage ABO-RH1 :

- cette analyse est obligatoirement complétée par un groupage ABO-RH1.

3. Phénotype étendu

En absence de résultats valides, cette analyse est réalisée :

- systématiquement dans les cas d'allo-immunisation anti-érythrocytaire complexe et proposée, à titre préventif, chez certains patients transfusés de manière itérative. Dans ce dernier cas l'analyse concerne les antigènes courants suivants : FY1, FY2, JK1, JK2, MNS3 et si possible MNS4.
- pour la validation de l'identification d'anticorps anti-érythrocytaires dirigés contre un ou plusieurs antigènes érythrocytaires autres que ceux qui sont définis par le groupage ABO-RH1 et par le phénotype RH-KEL 1 et pour lesquels les réactifs sont disponibles sur le marché.

En absence de résultats valides de groupage ABO-RH1 et/ou de phénotype RH-KEL 1, cette analyse est obligatoirement complétée par un groupage ABO-RH1 et un phénotype RH-KEL 1.

4. Recherche d'anticorps anti-érythrocytaires

Cette analyse doit être réalisée dans le cadre de la prévention des accidents immuno-hémolytiques transfusionnels :

- chez tout patient susceptible à court terme d'être transfusé ;
- chez le transfusé itératif, en bonne place au cours des séries de transfusions ;
- chez le patient transfusé dans le cadre du suivi post-transfusionnel préconisé par la réglementation.

Elle doit être réalisée en contexte de greffe ou transplantation.

Elle doit être réalisée en contexte pré ou périnatal conformément aux dispositions réglementaires relatives au suivi de la grossesse.

En l'absence de prescription, ces analyses doivent être réalisées à l'initiative du biologiste.

5. Titrage des anticorps anti-érythrocytaires autres que anti-A, anti-B et dosage pondéral des anti-RH

Le titrage, indissociable de la recherche des anticorps anti-érythrocytaires, est obligatoire chez toute femme enceinte possédant un anticorps immun. Il permet d'estimer l'évolution de l'allo-immunisation en rapport avec un passage d'hématies fœtales qui peut éventuellement se produire dès le premier trimestre de la grossesse. L'activité fonctionnelle (pouvoir hémolytique) de l'anticorps

dépendant de sa concentration et de son affinité, pour les anticorps du système RH, l'association au dosage pondéral est nécessaire afin de mieux appréhender le risque hémolytique anté-natal.

En cas d'allo-immunisation une nouvelle programmation des RAI (avec tirage et éventuellement dosage pondéral) est nécessaire. Il est classiquement reconnu qu'un contrôle mensuel est suffisant, dans la majorité des cas, jusqu'à la 20^e semaine d'aménorrhée. Au-delà, un contrôle tous les quinze jours est à envisager. Dans certains cas d'immunisation sévère, un contrôle fréquent est nécessaire, même avant la 20^e semaine d'aménorrhée, et d'autant plus en fin de grossesse où le rythme peut être hebdomadaire.

En l'absence de prescription, ces analyses doivent être réalisées à l'initiative du biologiste.

6. Epreuve directe de compatibilité au laboratoire

Cette analyse est réalisée dans les circonstances suivantes :

- s'il s'agit d'un receveur présentant ou ayant présenté un (ou plusieurs) allo-anticorps anti-érythrocytaires ;
- s'il s'agit d'un nouveau-né présentant un test direct à l'antiglobuline positif ou né de mère allo-immunisée.

7. Test direct à l'antiglobuline

Cette analyse doit s'inscrire dans l'un des contextes suivants :

- dans le cadre d'un syndrome 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 d'une 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 de l'exploration biologique d'autres maladies auto-immunes.

ANNEXE D II

GROUPAGE ABO-RH1

Dans l'épreuve globulaire de réalisation du groupage sanguin ABO, le réactif anti-B utilisé ne doit pas donner de réaction croisée vis-à-vis de l'antigène B acquis. L'un des deux réactifs, anti-A ou anti-AB, doit pouvoir reconnaître les hématies Ax.

1. Interprétation et validation des résultats

La validation analytique repose sur :

- résultats conformes des CQI ;
- absence d'ambiguïté réactionnelle avec chaque réactif ;
- absence de double population. A ce titre, il est indispensable que tout antécédent transfusionnel récent (moins de quatre mois) soit signalé au laboratoire lors de la prescription de l'analyse ;
- profil réactionnel cohérent par rapport à la table d'interprétation des groupes ABO-RH1 ;
- absence de discordance entre deux réalisations ;
- absence de discordance avec antériorité.

2. Gestion des anomalies

La constatation d'une anomalie lors de la phase de validation analytique du groupe sanguin ABO-RH1 impose l'intervention du biologiste. La gestion de l'anomalie repose alors sur :

Une attitude sécurisée en termes d'exploitation :

- ne pas rendre le résultat ;
- rendre un conseil transfusionnel provisoire en cas d'urgence ;

Une nouvelle détermination du groupe sanguin :

- si l'anomalie n'est pas retrouvée, le résultat est validé ;
- si l'anomalie est retrouvée, une poursuite de l'exploration.

Une attitude cohérente en termes d'exploration de l'anomalie qui tiendra compte :

- du contexte clinique ;

- du profil réactionnel obtenu ;
- du résultat des témoins du groupage ABO :
 - le témoin « auto » qui consiste à tester, dans les mêmes conditions techniques, le plasma du sujet vis-à-vis de ses propres hématies ;
 - les témoins « allo » et éventuellement « A2 » qui consistent à tester, dans les mêmes conditions techniques, le plasma du sujet vis-à-vis d'une gamme d'hématies-tests O et A2 dont la constitution antigénique permettra de détecter les anticorps anti-érythrocytaires, autres que anti-A et anti-B, susceptibles d'interférer avec l'épreuve plasmatique ;
 - le témoin « réactif » qui consiste à tester, dans les mêmes conditions techniques, les hématies du sujet vis-à-vis d'un réactif témoin n'ayant pas d'activité anticorps.

ANNEXE D III

PHÉNOTYPAGE RH-KEL 1

1. Interprétation et validation des résultats

La validation analytique repose sur :

- résultats conformes des CQI ;
- absence d'ambiguïté réactionnelle avec chaque réactif ;
- absence de double population. A ce titre, il est indispensable que tout antécédent transfusionnel récent (moins de quatre mois) soit signalé au laboratoire lors de la prescription de l'analyse ;
- profil réactionnel cohérent par rapport à la table d'interprétation des phénotypes RH-KEL 1 ;
- absence de discordance entre deux réalisations ;
- absence de discordance avec antériorité.

2. Gestion des anomalies

La constatation d'une anomalie lors de la phase de validation analytique du phénotype RH-KEL 1 impose l'intervention du biologiste. La gestion de l'anomalie repose alors sur :

- Une attitude sécurisée en termes d'exploitation :
 - ne pas rendre le résultat ;
 - rendre un conseil transfusionnel provisoire en cas d'urgence ;
- Une nouvelle détermination du phénotype :
 - si l'anomalie n'est pas retrouvée, le résultat est validé ;
 - si l'anomalie est retrouvée une poursuite de l'exploration ;
- Une attitude cohérente en termes d'exploration de l'anomalie qui tiendra compte :
 - du contexte clinique ;
 - du profil réactionnel obtenu (témoins adéquats inclus).

ANNEXE D IV

PHÉNOTYPAGE ÉTENDU

1. Interprétation et validation des résultats

La validation analytique repose sur :

- résultats conformes des CQI ;
- absence d'ambiguïté réactionnelle avec chaque réactif ;
- absence de double population. A ce titre, il est indispensable que tout antécédent transfusionnel récent (moins de quatre mois) soit signalé au laboratoire lors de la prescription de l'analyse ;
- profil réactionnel cohérent par rapport à la table d'interprétation des phénotypes étendus ;
- absence de divergence entre deux réalisations ;
- absence de discordance avec antériorité.

2. Gestion des anomalies

La constatation d'une anomalie lors de la phase de validation analytique du type érythrocytaire étendu impose l'intervention du biologiste. La gestion de l'anomalie repose alors sur :

- Une attitude sécurisée en termes d'exploitation :
 - ne pas rendre le résultat ;
 - rendre un conseil transfusionnel provisoire en cas d'urgence ;
- Une nouvelle détermination du phénotype :
 - si l'anomalie n'est pas retrouvée, le résultat est validé ;
 - si l'anomalie est retrouvée, une poursuite de l'exploration ;
- Une attitude cohérente en termes d'exploration de l'anomalie qui tiendra compte :

- du contexte clinique ;
- du profil réactionnel obtenu.

ANNEXE D V

RECHERCHE D'ANTICORPS ANTI-ÉRYTHROCYTAIRES

Interprétation et validation des résultats

L'identification d'un ou plusieurs anticorps anti-érythrocytaires impose :

De valider la spécificité de chaque anticorps par l'obtention d'une réaction positive avec toutes les hématies porteuses de l'antigène correspondant (au moins 3 hématies) et d'une réaction négative avec toutes les hématies non porteuses de cet antigène (au moins 3 hématies). Le seuil minimal de 3 hématies en terme de réactivités positives ou négatives ne s'applique pas en cas d'association d'anticorps de spécificité anti-RH.

Lorsque cette correspondance exacte n'est pas obtenue, l'interprétation doit prendre en compte le caractère « homozygote » ou « hétérozygote » des hématies utilisées. Dans ces conditions, une étape supplémentaire avec un plus grand nombre d'hématies informatives doit être mise en œuvre :

D'éliminer des anticorps supplémentaires éventuels :

- par la mise en œuvre de techniques complémentaires ;
- par la présence, sur les hématies négatives, des antigènes présents sur la gamme de dépistage ne correspondant pas à la (aux) spécificité(s) préalablement identifiée(s) ;

De contrôler l'absence de l'antigène correspondant à chaque allo-anticorps identifié lorsque les réactifs sont disponibles sur le marché.

En absence de résultats valides, l'identification d'un anticorps anti-érythrocytaire doit être complétée par un groupage ABO-RH1 et un phénotype RH-KEL 1.

ANNEXE D VI

TITRAGE DES ANTICORPS ANTI-ÉRYTHROCYTAIRES IMMUNS AUTRES QUE LES ANTI-A ET ANTI-B ET LE DOSAGE PONDÉRAL DES ANTI-RH

La validation analytique repose sur les résultats obtenus avec un standard anti-RH1, les résultats comparatifs entre les 2 échantillons n et $n - 1$ de la patiente et les résultats de l'antériorité.

ANNEXE D VII

ÉPREUVE DIRECTE DE COMPATIBILITÉ AU LABORATOIRE

Interprétation et validation des résultats

Une procédure doit définir les modalités de libération des produits sanguins labiles compatibilisés en fonction des résultats de cette épreuve :

- résultats conformes des CQI ;
- en absence de réactivité dans la technique considérée :
 - l'unité est déclarée compatible. Sa libération est autorisée avec identification spécifique de l'unité conformément aux dispositions réglementaires en vigueur ;
- en cas de réactivité dans la technique considérée :
 - l'unité est déclarée incompatible. En fonction du contexte, sa libération peut être autorisée conformément aux dispositions réglementaires prévues par les bonnes pratiques de distribution et le conseil transfusionnel. Par ailleurs, une exploration complémentaire peut être entreprise afin d'expliquer ces résultats et sélectionner de nouvelles unités en tenant compte de ces explorations.

ANNEXE D VIII

TEST DIRECT À L'ANTIGLOBULINE

Interprétation et validation des résultats

- résultats conformes des CQI ;
- absence d'ambiguïté réactionnelle avec chaque réactif ;
- profil réactionnel cohérent par rapport à la logique d'interprétation préalable.

ANNEXE D IX

OBJECTIFS DE L'AUTOMATION ET INFORMATISATION AU LABORATOIRE D'IMMUNO-HÉMATOLOGIE

1. Diminuer le risque d'erreur humaine

En immuno-hématologie érythrocytaire, l'automatisation et l'informatisation des analyses et du transfert des résultats apporte une

sécurité supplémentaire par rapport à la réalisation manuelle en réduisant plusieurs risques possibles d'erreurs, et en particulier les erreurs relatives à :

- l'enregistrement de la demande ;
- la sélection de l'échantillon ;
- la sélection du réactif ;
- l'exécution de l'analyse elle-même ;
- la transcription ;
- l'interprétation ;
- la saisie des résultats.

2. Garantir la traçabilité

La compréhension et la correction d'éventuels dysfonctionnements reposent sur une analyse précise des défaillances qui peuvent survenir au niveau d'un processus. L'efficacité de cette exploration *a posteriori* est intimement liée à une traçabilité fiable de tous les éléments ayant contribué aux opérations analytiques. Aussi les opérations suivantes, relatives à chaque analyse, doivent être archivées, accessibles et exploitables :

- date de l'analyse ;
- couple distributeur-lecteur ;
- réactifs : types - spécificités - numéro de lot ;
- liaison avec les CQI (types - spécificités- numéro de lot - résultats) ayant permis la validation ;
- opérateur ;
- résultats réactionnels obtenus avec chaque réactif ;
- notion de correction manuelle éventuelle survenue avec l'un d'entre eux ;
- résultats analytiques interprétés.

3. Gérer les alarmes de fonctionnement du système

Remarques :

- en l'absence de connexion informatique, le risque d'erreur de transcription existe toujours, même en cas de double saisie ;
- l'optimisation des systèmes automatiques impose de mettre l'accent sur une formation adaptée des opérateurs.

ANNEXE DX

a) Traitement et identification des échantillons

	OBLIGATOIRE	RECOMMANDÉ
Identification positive du numéro de code-barres échantillon	X	
Lecteur de code-barres échantillon intégré.....		X
Identification positive du positionnement aléatoire de l'échantillon sur automate.....	X	
Alarme si problème de lecture de code-barres (procédure dégradée)...	X	
Contrôle du prélèvement par détecteur de présence, de niveau ou de caillot	X	
Protection contre les contaminations interspécimens (1)	X	
(1) La réalité de cette opération peut être démontrée lors de la phase de validation préalable du système.		

b) Gestion des réactifs

	OBLIGATOIRE	RECOMMANDÉ
Identification positive du numéro de code-barres des réactifs (2).....		X
Identification positive du positionnement aléatoire sur automate (2).....		X
Alarme si problème de lecture de code-barres (procédure dégradée)...		X
Gestion des conditions de conservation des réactifs.....		X
Mise en suspension des hématies tests.....	X	
Détection de niveaux.....		X

	OBLIGATOIRE	RECOMMANDÉ
Alarme sur détection de niveaux.....		X
Alarme de péremption.....		X
Protection contre les contaminations inter-réactifs (1)	X	
Gestion des stocks.....		X
(1) La réalité de cette opération peut être démontrée lors de la phase de validation préalable du système et régulièrement vérifiée par l'analyse des contrôles qualité internes adéquats.		
(2) Si ces opérations ne sont pas prises en charge par le système, toute réalimentation du distributeur en réactif doit être validée par l'analyse des contrôles qualité internes adéquats.		

c) Gestion du support réactionnel (microplaque ou support filtration)

	OBLIGATOIRE	RECOMMANDÉ
Identification positive du numéro de code-barres du support	Si nécessaire	
Identification positive du positionnement aléatoire du support sur automate	X	
Alarme si problème de lecture de code-barres (procédure dégradée) ...	X	
Alarme de péremption.....		X

d) Gestion de la phase de préparation distribution

	OBLIGATOIRE	RECOMMANDÉ
Mise en suspension de l'échantillon...	X	
Distribution et identification de la position de l'échantillon sur le support réactionnel.....	X	
Identification de la position de chaque réactif sur le support réactionnel.....	X	
Etablissement du lien Echantillon-Réactif-Support	X	
Maintien du lien Echantillon-Réactif-Support (durant les phases d'incubation et de centrifugation).....	X	

e) Traitement de la lecture des réactions

	OBLIGATOIRE	RECOMMANDÉ
Lecture automatisée des réactions.....	X	
Alarme sur défaut de mesure.....	X	
Relance après avis de l'opérateur	X	
Traçabilité d'intervention manuelle.....	X	
Association automatique et univoque Réactions-Réactifs-Identifiant.....	X	
Détection des doubles populations, hémolyse et faible agglutination.....		X

f) Traitement des informations

	OBLIGATOIRE	RECOMMANDÉ
Confrontation informatique des résultats des CQI avec ceux attendus		X
Alarme d'écart d'interprétation		X
Blocage des transferts analytiques des résultats concernés en cas de non-conformité.....		X
Levée du blocage en manuelle avec traçabilité d'intervention		X
Interprétation informatique des cohérences réactionnelles	X	

	OBLIGATOIRE	RECOMMANDÉ
Détection d'incohérence y compris en cas d'intervention manuelle (correction de rejet).....	X	
Incohérence entre épreuve globulaire et plasmatique.....	X	
Réaction positive avec le réactif témoin.....	X	
Absence de deux antigènes anti-hématologiques.....	X	
Coexistence antigène et anticorps correspondant lors des phases d'identification d'anticorps.....	X	

g) Exploitation des informations

La décision finale de la validation analytique revient à l'opérateur :

- par contrôle visuel de chaque support avec analyse de cohérence avec les résultats rendus par le système ;
- par appréciation de la qualité des contrôles qualité internes automatisant la validation analytique.

	OBLIGATOIRE	RECOMMANDÉ
Transfert automatique des résultats concernés au dossier du patient correspondant.....	X	
Confrontation automatique avec l'historique des résultats du patient et détection de discordance.....	X	

h) Validation biologique

Conforme à la réglementation en vigueur (GBEA).

ANNEXE D X I

SÉCURISATION DU TRANSFERT DES DONNÉES IMMUNO-HÉMATOLOGIE VERS LE SERVICE DE DISTRIBUTION

Elle repose en partie sur la fiabilité des données immuno-hématologiques du receveur introduites dans le système.

Afin d'éviter leur prise en compte manuelle à partir de résultats écrits, ces données doivent être transférées en totalité et informatiquement, après validation, vers le site de distribution de l'Établissement français du sang ou le dépôt de distribution de l'établissement de santé autorisé à attribuer les produits sanguins labiles.

Le transfert des données doit respecter le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA) et les recommandations suivantes :

La transmission de données nominatives

Les procédures utilisées doivent garantir la confidentialité :

Les données doivent être cryptées lorsque celles-ci doivent transiter sur un réseau ouvert. Elles doivent également être cryptées lorsqu'elles doivent transiter sur un réseau interne sur lequel peut se connecter du personnel non médical et non paramédical :

L'identification de l'émetteur, du destinataire et la vérification des droits de celui-ci à recevoir ces données sont obligatoires. Le destinataire pouvant être une personne physique ou un ordinateur.

L'intégrité des données transmises

Le protocole de transfert des données doit comporter des procédures efficaces de contrôle des échanges vérifiant que le ou les messages reçus sont identiques au(x) message(s) envoyé(s) et que ces procédures soient effectivement actives.

Au cas où de telles procédures ne seraient pas utilisées (en raison de problèmes momentanés, par exemple), le message émis doit en comporter la mention en clair afin d'avertir le receveur de la possibilité d'erreurs dans la transmission des données.

En cas d'échec de transmission ou de rupture de communication en cours, il faut retransmettre automatiquement et intégralement le ou les messages.

L'archivage des transmissions

Il est nécessaire d'archiver ces transmissions pendant toute la durée légale d'archivage des dossiers des patients. Ces archives

doivent pouvoir être éditables et consultables à tout moment en comportant la date et l'heure d'émission du message acquitté par le receveur.

En cas de transmissions multiples d'un même dossier pour complément ou mise à jour, chacune des transmissions doit être archivée sous la même forme.

Les messages de transfert utilisés doivent répondre aux dispositions normatives en vigueur qui concernent la transfusion sanguine.

IMMUNO-HÉMATOLOGIE

ÉVOLUTION DES ASPECTS RÉGLEMENTAIRES

La parution de l'arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale constitue une importante évolution de la législation régissant la pratique de l'immuno-hématologie et la sécurité transfusionnelle. La parution de ce texte est liée aux remarquables progrès de l'automatisation et de l'informatisation, à la performance accrue des réactifs utilisés en immuno-hématologie ainsi que la mise en place routinière de l'assurance qualité au sein des laboratoires d'immuno-hématologie. Ces tableaux comparent les différences entre les deux textes réglementaires des 17 mai 1985 et 26 avril 2002, concernant les examens d'immuno-hématologie et la sécurité transfusionnelle.

Les textes sont transcrits en italiques.

Les différences entre les deux textes sont en italique et en gras.

Les commentaires sont en caractères habituels.

<i>Circulaire DGS/3B/552 du 17 mai 1985 relative à la prévention des accidents transfusionnels et des accidents d'allo-immunisation</i>	<i>Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale</i>
<i>... Épreuve de Beth-Vincent ou épreuve globulaire : elle consiste à mettre en évidence à la surface des hématies la présence des antigènes A ou B à l'aide de 3 réactifs : anti A, anti B et anti A+B.</i>	<i>... une épreuve globulaire qui consiste à rechercher les antigènes A (ABO1) et B (ABO2) avec les réactifs monoclonaux suivants : anti-A (anti-ABO1), anti-B (anti-ABO2) et anti-AB (anti-ABO3)</i> <i>L'annexe D II précise que : ... Le réactif anti-B utilisé ne doit pas donner de réaction croisée vis-à-vis de l'antigène B acquis. L'un des deux réactifs, anti-A ou anti-AB, doit pouvoir reconnaître les hématies Ax.</i>
<i>... Épreuve de Simonin ou épreuve sérique : elle consiste à rechercher des anticorps anti A ou anti B dans le sérum. Ces anticorps sont détectés à l'aide d'hématies A1, A2, B et O préparées selon ...</i>	<i>... une épreuve plasmatique qui consiste à rechercher les anticorps anti-A et anti-B avec les hématies-tests A1 et B. Au moins une de ces hématies doit être de phénotype RH : -1.</i>

<p>Dans l'annexe technique (annexe n° 1) les hématies O devenaient facultatives : <i>... et pour l'épreuve sérique, une goutte d'hématies tests lavées à 10 p. 100 en « saline »* de groupes A1, A2, B et éventuellement O...</i></p> <p>Elles vont disparaître dans le nouveau texte !</p>	<p><u>Les hématies-test O et A2 ont disparu. Ceci combiné à l'absence de réactif anti-H lors de l'épreuve globulaire, ne permet pas la détection de sujets Bombay (H : -1), lors du groupage sanguin.</u></p>
<p><i>Ces deux épreuves (épreuve globulaire et épreuve sérique) doivent être réalisées par deux techniciens différents, à l'aide de deux séries de réactifs différentes.</i></p> <p>Cette notion de deux séries de réactifs différentes n'est pas rappelée dans le nouveau texte.</p> <p><i>... III. - Les techniques automatisées ou semi-automatisées.</i> <i>Ces techniques doivent respecter les mêmes principes que ceux énoncés pour les techniques manuelles.</i></p>	<p>Dans ce texte apparaît la possibilité de réalisation d'un groupe sanguin par une seule personne sous réserve d'impératifs d'automation et d'informatisation précisés au chapitre IV, alors que dans le texte précédent les techniques automatiques étaient réalisées dans les mêmes conditions que les techniques manuelles.</p> <p>Cette détermination par une personne concerne le groupage ABO-RH1, le phénotypage RH-KEL1 et le phénotypage étendu.</p> <p>Voici à titre d'exemple le passage concernant le groupage ABO-RH1 :</p> <p><i>Une détermination du groupage ABO-RH1 : sa définition est fonction des conditions techniques :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <i>– si les opérations du groupage sanguin, incluant les modalités de vérification et d'enregistrement des échantillons et des prescriptions, sont strictement réalisées dans les conditions d'automation et d'informatisation décrites à l'article IV : Automation et informatisation, une détermination repose sur une seule réalisation exécutée à l'aide d'un lot de réactifs, un lot d'hématies-tests et par un technicien ;</i> <i>– dans tous les autres cas, une détermination repose sur deux réalisations exécutées par deux techniciens différents.</i> <p>On note la disparition de la notion de deux séries différentes de réactifs lorsque deux opérateurs interviennent.</p>

	<p>Les contrôles de qualité internes sont exactement spécifiés.</p> <p>Ils concernent le groupage ABO-RH1 (RhD), le phénotypage RH-KEL1 (Rh-K), le phénotypage étendu, la recherche d'anticorps anti-érythrocytaire (RAI) et l'épreuve directe de compatibilité au laboratoire, le tirage des anticorps anti-érythrocytaires immuns autres que les anti-A et anti-B et le dosage pondéral des anti-RH, le test direct à l'antiglobuline.</p> <p>Leur résultat est primordial pour l'interprétation et la validation des résultats.</p> <p>Voici à titre d'exemple le texte concernant le groupage ABO-RH1 :</p> <p>1.2.2. Les contrôles de qualité internes :</p> <p><i>En ce qui concerne la détermination ABO, le système analytique doit être contrôlé en utilisant une série d'échantillons de contrôle de phénotypes garantis (typage obtenu par un processus technique différent de celui qui doit être contrôlé par ces échantillons) comprenant au minimum :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <i>– un échantillon de groupe A ;</i> <i>– un échantillon de groupe B ;</i> <i>– un échantillon de groupe O.</i> <p><i>En ce qui concerne la détermination du groupe RH1, le système analytique doit être contrôlé en utilisant une série d'échantillons de contrôle de phénotypes garantis (typage obtenu par un processus technique différent de celui qui doit être contrôlé par ces échantillons) comprenant au minimum :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <i>– un échantillon de groupe RH : 1 ;</i> <i>– un échantillon de groupe RH : -1.</i>
<p>Dans ce texte, les phénotypes Rhésus, Kell et les autres phénotypes sont réunis sous le même chapitre. En ce qui concerne le phénotype étendu, il est précisé que la liste des antigènes cités n'est pas exhaustive :</p>	<p>Un chapitre est consacré au phénotypage RH-KEL1 (Rh-K) et un autre au phénotypage étendu.</p> <p>L'importance du phénotype RH-KEL1 est rappelée dans les champs d'application du</p>

<p><i>V. La détermination des phénotypes érythrocytaires.</i> <i>En dehors de la détermination des phénotypes ABO et Rh standard (D), le laboratoire peut, dans certains cas, devoir réaliser la détermination du phénotype dans les systèmes de groupes sanguins Rhésus (C, c, E, e) et Kell (K)...</i> <i>D'autres phénotypes peuvent, dans certains cas, être pratiqués : système Duffy (Fya, Fyb), système Kidd (Jka, Jkb), système MNSs (S, s), système Lewis (Lea, Leb)...</i> <i>Cette liste de phénotypes n'est pas exhaustive.</i></p>	<p><i>groupage ABO-RH1 : ... en l'absence de résultats valides du phénotype RH-KEL1 cette analyse est obligatoirement complétée par un phénotypage RH-KEL1.</i></p>
	<p>Le DSAI a disparu.</p> <p>Pour la RAI, les indications (champs d'application) sont élargies : <i>... cette analyse doit être réalisée... dans le cadre du suivi post-transfusionnel préconisé par la réglementation.</i> <i>Elle doit être réalisée en contexte de greffe ou transplantation...</i></p> <p>Les autres indications restent inchangées.</p>
<p><i>Les recherches d'anticorps irréguliers sont essentiellement pratiquées selon des techniques manuelles. Trois techniques exécutées conjointement sont souhaitables pour mettre en évidence la totalité des anticorps irréguliers : le test d'agglutination en « saline » (1) à la température du laboratoire 20 ± 2 °C, le test de Coombs indirect et un test aux enzymes, ces deux techniques étant obligatoires...</i></p>	<p>Les principales modifications techniques de ce texte :</p> <p>La technique en saline disparaît. La technique enzymatique n'est plus obligatoire mais reste « utile voire indispensable » dans les difficultés d'identification.</p> <p>La technique de Coombs indirect peut également faire appel à l'antiglobuline anti-IgG.</p> <p>Le support d'examen (colonne de filtration ou immuno-adhérence) est précisé.</p>
	<p><i>... Pour les deux étapes, la méthodologie technique repose sur la mise en œuvre d'un test indirect à l'antiglobuline polyspécifique ou anti-IgG permettant de détecter,</i></p>

<p>... L'épreuve de dépistage doit être réalisée à l'aide de globules rouges tests de dépistage : il s'agit d'une gamme de 2 à 4 échantillons d'hématies tests de groupe O...</p>	<p><i>sur colonne de filtration ou en immuno-adhérence, un anti-RH1 humain de concentration égale à 20 ng/ml ou d'autres techniques de sensibilité au moins égale.</i></p> <p><i>Lors de la phase d'identification, il peut être utile voire indispensable d'utiliser en complément les techniques dites enzymatiques notamment dans le cadre de difficulté d'identification (association d'alloanticorps) et lors des étapes de diagnostic biologique des accidents immunohémolytiques transfusionnels.</i></p> <p>La technique en tube n'apparaît pas, même dans les difficultés d'interprétation sur les nouveaux supports.</p> <p>... une étape de dépistage...</p> <p><i>Cette étape repose sur l'utilisation d'une gamme d'au moins trois hématies-tests de groupe O...</i></p> <p>La gamme d'hématies-tests de dépistage est de 3 au lieu de 2 à 4 et elle est élargie avec l'apparition des antigènes Kpb (KEL4) et Lub (LU2).</p> <p>Les antigènes de la gamme d'identification sont exactement précisés contrairement au texte précédent et comportent les antigènes Cw (RH8), Kpa (KEL3) et Lua (LU1) en plus de la gamme de dépistage...</p> <p>Des phénotypes obligatoires sont indiqués pour les systèmes Kell, Duffy, Kidd, MNSs et P.</p>
<p><i>L'épreuve directe de compatibilité au laboratoire (EDC)...</i></p> <p><i>Il s'agit d'un test personnalisé qui permet de mettre en réaction le sérum du patient et les globules rouges qui doivent être transfusés...</i></p>	<p>6. <i>L'épreuve directe de compatibilité au laboratoire.</i></p> <p><i>Cette analyse est réalisée dans les circonstances suivantes :</i></p>

<p><i>Ce test doit au minimum comporter deux épreuves dont un test à l'antiglobuline...</i></p> <p>Comme pour la RAI, l'obligation des deux techniques disparaît dans le nouveau texte.</p>	<ul style="list-style-type: none"> – <i>s'il s'agit d'un receveur présentant ou ayant présenté un (ou plusieurs) allo-anticorps anti-érythrocytaires ;</i> – <i>s'il s'agit d'un nouveau-né présentant un test direct à l'antiglobuline positif ou né de mère allo-immunisée.</i> <p><i>6.1. définition de l'analyse</i></p> <p><i>C'est une analyse qui consiste à tester l'échantillon de sérum ou de plasma du receveur vis-à-vis des hématies de la tubulure du produit sanguin à transfuser...</i></p> <p>Des précisions apparaissent concernant :</p> <ul style="list-style-type: none"> – <i>la sélection des unités à compatibiliser conformément aux bonnes pratiques de distribution,</i> – <i>la préparation des hématies de la tubulure,</i> – <i>l'exécution technique qui est identique à la RAI.</i>
<p>L'annexe n° II donnait les caractéristiques des documents transfusionnels.</p>	<p>Un important chapitre IV Automation et Informatisation apparaît dans ce texte, précisant les conditions exactes des phases pré-analytiques, analytiques et post-analytiques dont la réalisation stricte autorise la détermination des groupes sanguins par une personne et un lots de réactifs. L'accent est mis sur les <i>procédures écrites et détaillées permettant d'éviter toute erreur de saisie ou d'identification...</i></p> <p>L'annexe D IX fixe <i>les objectifs de l'automation et informatisation au laboratoire d'immuno-hématologie</i> pour :</p> <ul style="list-style-type: none"> – <i>Diminuer le risque d'erreur humaine.</i> – <i>Garantir la traçabilité.</i> – <i>Gérer les alarmes de fonctionnement du système.</i>

Les caractéristiques de la carte de groupe sanguin apparaissent dans le chapitre IV Automation et Informatisation :

La carte de groupe sanguin est éditée par un système informatique validé. Toute retranscription manuelle ou utilisation d'étiquettes de groupe autocollantes est interdite.

Les deux déterminations portées sur la carte seront effectuées par le même laboratoire.

L'ensemble des mentions nécessaires à la sécurité transfusionnelle immunologique doit apparaître sur une seule face de la carte...

Les éléments d'identification du laboratoire sont précisés dans ce texte.

En ce qui concerne le patient, des éléments supplémentaires apparaissent :

- la notion de sexe,
- la notion de validité de la carte en cas de changement de nom marital, si les autres identifiants sont corrects.

En ce qui concerne *le nouveau-né, le sang de cordon ne peut être utilisé pour le groupage sanguin et le document de groupes sanguins n'est valide que jusqu'à l'âge de six mois. Il doit mentionner : « groupe sanguin de nouveau-né valide jusqu'au – date de naissance + 6 mois.*

L'annexe D précise les conditions *d'interprétation et de validation* des examens d'immuno-hématologie ainsi que la *gestion des anomalies* pour chaque type d'examen.

L'annexe D XI concerne la *Sécurisation du transfert des données immunohématologiques vers le service de distribution.*

	<p><i>... Afin d'éviter leur prise en compte manuelle à partir des résultats écrits, ces données doivent être transférées en totalité et informatiquement, après validation, vers le site de distribution de l'Établissement français du sang ou le dépôt de distribution de l'établissement de santé autorisé à distribuer les produits sanguins labiles.</i></p> <p>Le texte précise également les modalités de transfert des données, de la vérification de leur intégrité et l'archivage des transmissions.</p>
--	---

GLOSSAIRE

AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de Santé.
AHAI	Anémie Hémolytique Auto-Immune.
ANAES	Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé.
BFI	Solution de Basse Force Ionique ou LISS.
CEC	Circulation Extra-Corporelle.
CGR	Concentré de Globules Rouges.
CMV	CytoMégaloVirus.
CNRGS	Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins.
CPA	Concentré de Plaquettes d'Aphérèse.
CPS	Concentré de Plaquettes Standard.
CQI	Contrôle Quotidien Interne (ou Contrôle de Qualité Interne).
Cr51	Chrome 51.
DAT	Direct Antiglobulin Test ou Test de Coombs Direct ou Test Direct à l'antiglobuline.
DTT	DiThioTréitol.
EDC	Epreuve Directe de Compatibilité.
EFS	Etablissement Français du Sang.
HEMPAS	Hereditary Erythroblastic Multinuclearity with a Positive Acidified Serum.
HFM	Hémorragie Foeto-Maternelle.
HLA	Human Leukocytes Antigens ou Antigènes d'Histocompatibilité.
HPN	Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne.
IAT	Indirect Antiglobulin Test ou Test de Coombs Indirect ou Test indirect à l'antiglobuline.
IFM	Incompatibilité Foeto-Maternelle.
IgA	Immunoglobines A.
IgG	Immunoglobines G.
IgM	Immunoglobines M.
ISBT	International Society of Blood Transfusion.

LDH	LacticoDesHydrogénase.
LISS	Low Ionic Strenght Solution ou Solution de Basse Force Ionique (BFI).
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique.
LNH	Lymphome Non Hodgkinien.
MCP	Mélange de Concentrés de Plaquettes.
MDS	MyeloDysplastic Syndrome ou Syndromes myélodysplasiques.
PEG	PolyEthylèneGlycol.
PFC	Plasma Frais Congelé.
PSL	Produits Sanguins Labiles.
RAI	Recherche d'Anticorps Irréguliers.
SA	Semaines d'Aménorrhée.

NOMENCLATURE DES GROUPES SANGUINS

La nouvelle nomenclature des groupes sanguins est numérique. Nous indiquons ci-après quelques exemples non exhaustifs de correspondance entre l'ancienne et la nouvelle nomenclature ainsi que la façon d'exprimer les antigènes et les phénotypes selon cette dernière.

Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature	Antigènes (ou groupes) usuels
ABO	ABO	ABO : 1, 3 (ex groupe A) ABO : 2, 3 (ex groupe B) ABO : 1, 2, 3 (ex groupe AB) ABO : -1, -2, -3 (ex groupe O)
Rhésus	RH	RH1 (ex D) RH2 (ex C) RH3 (ex E) RH4 (ex c) RH5 (ex e) RH : 1, 2, -3, -4, 5 (ex D+ C+ E- c- e+) RH : -1, -2, -3, 4, 5 (ex D- C- E- c+ e+)
Kell	KEL	KEL1 (ex Kell) KEL2 (ex k ou Cellano) KEL3 (ex Kpa) KEL4 (ex Kpb) KEL : -1, 2, -3, 4 (ex K- k+ Kpa- Kpb+)
Duffy	FY	FY1 (ex Fya) FY2 (ex Fyb) FY : -1, 2 (ex Fya- b+) FY : 1, -2 (ex Fya+ b-) FY : -1, -2 (ex Fya- b-)
Kidd	JK	JK1 (ex Jka) JK2 (ex Jkb)
MNSs	MNS	MNS1 (ex M) MNS2 (ex N) MNS3 (ex S) MNS4 (ex s)
Lewis	LE	LE : 1, -2 (ex Lea+ b-) LE : -1, 2 (ex Lea- b+) LE : -1, -2 (ex Lea- b-)
Lutheran	LU	LU : -1, 2 (ex Lua- b+) LU : 1, 2 (ex Lua+ b+) LU : 1, -2 (ex Lua+ b-)

Nous indiquons également des exemples de phénotypes rares (tableau du CNRGS)

PHENOTYPES ERYTHROCYTAIRES RARES : NOMENCLATURES

NOMENCLATURE INTERNATIONALE	ANCIENNE NOMENCLATURE
AG PNI	Ag public ?
ASS AC	Association anticorps
CO : -1,2	Co(a-b+)
CO : -1,-2	Co(a-b-)
COST : -1	COST-
DI : 1,-2	Di(a+b-)
DO : -1,-2,-3,-4,-5	Doa-b-Gya-Hy-Joa-
DO : -1,W2,W3,-4,-5	Doa-bwGyawHy-Joa-
DO : W1,W2,3,W4,-5	DoawbwGya+HywJoa-
Fy : -1,-2	Fy(a-b-)
GE : -2,-3	Ge-1-2-3
GE : -2,3	Ge-1-2+3
GLOB : -1,-2	Tja-
GLOB : -1,2,P1+	Pk1
GLOB : -1,2,P1-	Pk2
H : -1	BOMBAY1
H : W1	BOMBAY2
I : -1,2	I-
JMH-	JMH- (AC = IgG4)
JMHVAR	JMH-
JK : -1,-2	Jk(a-b-)
JRA-	Jra-
KEL : -2	CELLANO-
KEL : -4	Kpb-
KEL : -5	KO
KEL : -7	Jsb-
KEL PARA	Para K
KN : -1	Kna-
KN : -3	McCa-
KN : -4	Sla-
KN : -5	Yka-
LAN-	Lan-
LU : -1,W2	Lu(a-b-)Fe+
LU : -1,W2	Lu(a-bW)
LU : -1,-2	Lu(a-b-)
LU : 1,-2	Lu(a+b-)
LU : -13	Lu-13
LU PARA	Para Lu

NOMENCLATURE INTERNATIONALE	ANCIENNE NOMENCLATURE
LW : -5,7	LW(a-b+)
LW : -5,-7	LW(a-b-)
MC LEOD	Mac leod
MNS : -3,-4,w5	S-s-BONTE
MNS : -3,-4,-5	S-s-U-
MNS : -3,-4,W5	S-s+UW
MNS : 3,-4,W5	S-s-UW
MNS : 3,4,W5	S+s+UW
RH : -1,-2,-3,-4,-5	-- -/ - - -
RH : -1,-2,3,4,-5	ddccEE
RH : -1,2,-3,-4,5	ddCCee
RH : -1,2,3,-4,-5	ddCCEE
RH : -1,2,3,-4,5	ddCCee
RH : -1,2,3,4,-5	ddCcEE
RH : 1,-2,-3,-4,-5	D- -/D- - -
RH : 1,-2,-3,4,-5	Dc-/Dc-
RH : 1,2,3,-4,-5	DCCEE
RH : p1,-2,3,4,-5	DpccEE(Dp=D PARTIEL)
RH : p1,2,-3,-4,5	DpCCee(Dp=D PARTIEL)
RH : -8,9,-51	C ^w -,C ^x
RH : 8,-9,-51	C ^w +,C ^x -
RH : 8,9,-51	C ^w +,C ^x +
RH : -19	hr ^s -
RH : -31	hr ^b -
RH MOD	Rhmod
RH : 32,-46	RN
SC : -1,2	Sc-1
SC : -1,-2	Sc-1-2
VEL-	Vel-1-2
YT : -1,2	Yt(a-b+)
WJ-	Wj

■ INTRODUCTION

Le système de groupe sanguin ABO est sans aucun doute le plus important du fait de son implication en transfusion sanguine et pour la transplantation d'organe.

C'est à Karl Landsteiner que l'on doit attribuer le mérite de la découverte des groupes sanguins, à l'âge de 32 ans. Le 23 mars 1900, il publie dans le « Zentralblatt für Bakteriologie » une très courte communication dans laquelle il affirme que « le sérum des personnes saines agglutine, non seulement les globules rouges d'animaux (hétéro-agglutination) mais également des globules rouges d'autres personnes (iso-agglutination). » En 1901, il répartit le sang en trois groupes (1, 2 et 3) en fonction des réactions d'agglutination observées en testant le sérum et les globules rouges de sujets de son laboratoire. Les globules rouges des individus de groupe 1 ne sont pas agglutinés par les sérums d'individus de groupe 2 ou 3 ; par contre son sérum agglutine les hématies de groupe 2 et 3. Les hématies des individus de groupe 2 sont agglutinées par les sérums des sujets de groupe 1 et 2 ; leur sérum agglutine les hématies du groupe 3. Enfin les hématies des individus du groupe 3 sont agglutinées par le sérum des individus de groupe 1 et 2 ; leur sérum agglutine les hématies du groupe 2. Les groupes A, B et O étaient découverts. L'année suivante, ses collaborateurs, Decastello et Von Sturli, continuant ces travaux, identifient un quatrième groupe sanguin (groupe 4 = groupe AB). Les hématies des individus de ce groupe sont agglutinées par les sérums des sujets de groupe 1, 2 et 3. Par contre leur sérum ne semble pas contenir de substances agglutinantes. Ces découvertes devaient marquer le début des connaissances modernes sur les groupes sanguins.

Le système de groupe sanguin ABO présente deux caractéristiques qui sont à l'origine des méthodes de groupage sanguin et expliquent son rôle important en transfusion et transplantation :

- la présence constante d'anticorps « naturels » anti-A et anti-B correspondants aux antigènes absents des globules rouges.
- les antigènes ABO ne sont pas de simples antigènes de groupe sanguin érythrocytaire mais leur présence dans la plupart des tissus et liquides biologiques en fait de véritables antigènes tissulaires.

La nature biochimique de ces antigènes est aujourd'hui bien connue : ce sont des sucres situés sur la partie terminale d'oligosaccharides reliées à des protéines ou des lipides. Les antigènes sont construits grâce à l'action d'enzymes spécifiques : les glycosyl-transférases A et B. Ce système ne peut être compris que s'il est étudié en association avec d'autres : le système H (anciennement Hh-Sese) et le système LE (Lewis).

Le gène ABO est situé sur la chromosome 9. Les gènes H, Se et Le sont quant à eux localisés sur le chromosome 19.

I. LES 4 PRINCIPAUX PHÉNOTYPES ABO

Selon la nomenclature internationale le système ABO est le 001. Il comprend 4 antigènes principaux : les antigènes A (001), B (002), AB (003) et A1 (004).

Le système ABO se caractérise par :

- la présence ou l'absence des antigènes A et/ou B à la surface des globules rouges,
- et la présence ou l'absence d'agglutinines « naturelles » anti-A et/ou anti-B dans le plasma.

Cette double caractéristique est à la base des techniques de détermination des groupes sanguins ABO qui repose sur l'étude de ces deux propriétés. Un groupage sanguin comporte donc deux étapes : la recherche des antigènes érythrocytaires à l'aide de sérums-tests monoclonaux anti-A, anti-B, anti-A, B et la recherche des anticorps plasmatiques à l'aide d'hématies-tests A1 et B. **La concordance entre ces deux épreuves est impérative.** Au moins une de ces hématies doit être de phénotype RH:–1.

Des échantillons de contrôle (CQI ou contrôles de qualité internes) sont rendus obligatoires par arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale, afin de garantir la réalisation du groupe ABO.

Il s'agit au minimum :

- d'un échantillon de groupe A,
- d'un échantillon de groupe B,
- d'un échantillon de groupe O.

La définition du groupage ABO est désormais indissociable du phénotypage RH1 (Rh D) du système RH et sa réalisation indissociable du phénotype RH KEL1.

Les quatre phénotypes principaux se déduisent de façon simple selon les règles édictées plus haut.

Groupe sanguin	Antigène sur le globule rouge	Anticorps du plasma	% en France
A	A	anti-B	45 %
B	B	anti-A	9 %
O	ni A, ni B	anti-A et anti-B	43 %
AB	A et B	ni anti-A ni anti-B	3 %

La présence ou l'absence des antigènes A ou B à la surface des hématies est sous la dépendance de trois gènes (voir chapitre sur la génétique) :

- le gène A qui induit la synthèse de l'antigène A,
- le gène B qui induit celle de l'antigène B,
- le gène O qui ne modifie pas la substance de base H.

La transmission héréditaire de ces gènes obéit aux lois de Mendel. Ces gènes *A*, *B* et *O* sont des allèles, ils sont situés sur un même locus chromosomique et ils s'excluent toujours lors de la méiose. Le groupe sanguin de tout individu dépend donc de la présence de deux de ces trois allèles *A*, *B* et *O*. Les gènes *A* et *B* sont codominants, ils s'expriment au niveau du phénotype. Le gène *O* est quant à lui « récessif » par rapport aux gènes *A* et *B*.

Phénotype	Génotype
A	A/A OU A/O
B	B/B OU B/O
O	O/O
AB	A/B

Ainsi aux phénotypes O et AB, correspond un seul génotype. Pour les groupes A et B, le phénotype peut être différent du génotype. En effet, si les hématies d'un individu sont agglutinées par l'anticorps anti-A et lui seul, elles sont dites de groupe A mais cela n'indique pas si au niveau du génome, il y a deux gènes A ou simplement un gène A associé à un gène *O*.

Règles de compatibilité transfusionnelle

Du fait de la présence des anticorps naturels réguliers anti-A et/ou anti-B il convient de tenir compte de ce groupe dès la première transfusion.

Il ne faut jamais transfuser du sang possédant l'antigène correspondant à l'anticorps du receveur. En cas d'incompatibilité ABO entre les hématies du donneur et les anticorps du plasma du receveur, l'accident gravissime ne peut être évité. Si on injecte par exemple à un sujet B, qui possède un anti-A, des concentrés globulaires A, l'anticorps naturel du receveur se fixera sur les globules rouges transfusés et les détruira. **Le sang injecté est dit incompatible.**

a- Les transfusions isogroupes (Donneur et Receveur de même groupe) sont toutes compatibles.

b- Les concentrés globulaires O peuvent être transfusés indifféremment à des sujets A, B ou AB puisque les hématies O sont dépourvues des antigènes A et B. **Les sujets du groupe O sont dits donneurs universels.**

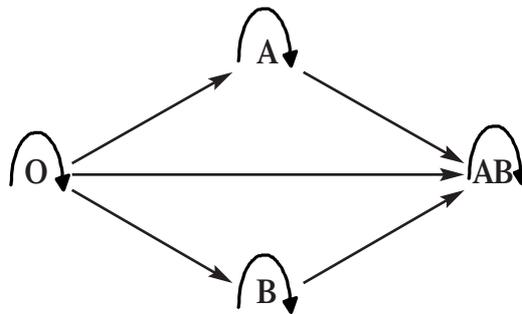
Dans cette règle de compatibilité transfusionnelle, on ne tient pas compte de l'anticorps du donneur qui apporté en très faible quantité par le concentré globulaire, est dilué dans la masse sanguine du receveur et adsorbé sur les antigènes ABO exprimés au niveau des cellules endothéliales vasculaires.

Cette règle souffre cependant d'exceptions :

– lors de transfusions massives et non isogroupes (ex. sang O à un sujet A), il est possible que l'anticorps du donneur alors apporté en quantité très importante vienne détruire les hématies du receveur.

– le donneur universel dangereux. Le sujet O, appelé donneur universel, peut posséder dans certains cas, un anticorps immun, anti-A le plus souvent, qui est dangereux pour le

receveur A ou AB. Le sang de ces sujets, ne peut donc être transfusé qu'à des receveurs isogroupes, c'est-à-dire des sujets de groupe O. Cette notion était surtout valable dans le cas de transfusion de sang total qui n'est plus réalisée actuellement. Dans le cas de transfusion de concentrés globulaires, le risque est quasi inexistant.



Les règles de compatibilité ABO dans le cadre de la transfusion de plasma sont l'inverse de celles de la transfusion de concentrés globulaires.

■ II. LES SOUS-GROUPES A1 ET A2

Très rapidement un premier niveau de complexité a été rapporté à propos du phénotype A. Le phénotype A₁ est retrouvé chez 80 % des sujets A et le phénotype A₂ chez 20 %. Le phénotype A₁ se caractérise par la présence de l'antigène A₁ qui peut être mis en évidence par des réactifs comme la lectine *Dolichos biflorus*. Les hématies de phénotype A₂ ne possèdent pas l'antigène A₁ et on peut parfois mettre en évidence dans le plasma de sujets de phénotype A₂ ou A₂B, un anti-A₁ naturel irrégulier. Il s'agit d'un anticorps froid de faible titre. Inversement les sujets de phénotype A₁ ou A₁B peuvent présenter dans leur plasma une agglutinine naturelle et irrégulière de spécificité anti-H sans conséquence sur le plan transfusionnel.

En pratique le nombre de sites antigéniques A chez les sujets de phénotype A₁ (1 000 000) est beaucoup plus élevé que chez les sujets de phénotype A₂ (environ 200 000). Il en résulte des intensités de réactions souvent plus faibles avec les hématies-tests A₂ qu'avec les hématies-tests A₁.

En fait les différences ne sont pas seulement quantitatives mais également qualitatives et reposent sur des bases moléculaires différentes.

La distinction pratique entre ces deux phénotypes n'a aucun intérêt sur le plan transfusionnel ou obstétrical.

Enfin certains sujets peuvent présenter un phénotype intermédiaire dans lequel les hématies sont agglutinées plus faiblement, à la fois par les réactifs anti-H et anti-A₁ : A_{int}

Phénotype	Anti-A ₁	Anti-H
A ₁	+++	-
A ₂	-	+++
A _{int}	++	++

■ III. LES PHÉNOTYPES RARES ABO

III.1- Les variants génétiques

III.1.1- Groupes A ou B faibles

De rares individus présentent des phénotypes particuliers caractérisés par la faible expression des antigènes A ou B à la surface des hématies. On peut également identifier dans le plasma de ces individus des agglutinines naturelles anti-A₁ ou anti-B. Ces faits peuvent être à l'origine de difficultés de groupage. Sur la base des réactions sérologiques, une classification a été établie. Ainsi ont été décrits les phénotypes A₃, A_x, A_{end}, A_m, A_y, A_{el}, B₃, B_x, B_m, Bel.... Les principales caractéristiques sérologiques des phénotypes A et B faibles les plus fréquents sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Phénotype	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-H	Hématie B	Hématie A ₁	Hématie A ₂
A ₃	++/-	-	++/-	+++	+++	+ ou -	-
A _x	(+)	-	+	+++	+++	+	-
A _{end}	(+)/-	-	(+)/-	+++	+++	+ ou -	-
A _m	-	-	-	+++	+++	-	-
A _{el}	-	-	-	+++	+++	+++	++ ou -
A _y	-	-	-	+++	+++	-	-
B ₃	-	++/-	++/-	+++	-	+++	++
B _x	-	(+)	(+)	+++	+ ou -	+++	++
Bel	-	-	-	+++	+ ou -	+++	++
Bm	-	-	-	+++	-	+++	++

++/- ou +/- = double population ; (+) = très faible agglutination.

Caractéristiques sérologiques de certains phénotypes A ou B faibles

Les données moléculaires accumulées depuis 1990, montrent l'extrême hétérogénéité de ces groupes « faibles » et cette classification n'a plus qu'un intérêt didactique. Sur le plan transfusionnel elle n'a également aucun intérêt. Il s'agit dans tous les cas de sujets de groupe A, mais en cas de transfusion, il est classique de leur transfuser des concentrés globulaires de groupe O et du plasma de groupe A.

III.1.2- Les phénotypes cis-AB

En 1924, Bernstein proposait un mode de transmission des groupes sanguins ABO à partir de 3 gènes allèles (deux allèles codominants A et B et un allèle silencieux O). Aucune exception à ce mode de transmission n'a été rapportée jusqu'en 1964 où Seyfried met en évidence le phénotype cis-AB. Les individus possédant un phénotype cis-AB, sont caractérisés par un mode non classique de transmission des caractères A et B exprimés à la membrane de leur globules rouges. Les caractères A et B ne sont pas transmis comme deux allèles indépendants mais comme un seul allèle appelé « cis-AB ». L'incidence du phénotype cis-AB est très faible ; même dans la population japonaise où le pourcentage de sujets cis-AB parmi les sujets de phénotype AB a été décrit comme étant plus élevé que dans les populations caucasiennes, il est très bas (0.012 %). Le phénotype cis-AB est

hétérogène et sur la base des réactions sérologiques, trois phénotypes principaux ont été décrits : cis- A_1B_3 , cis- A_2B_3 and cis- A_2B .

Le phénotype cis-AB le plus fréquent est le cis A_2B_3 caractérisé par :

- un antigène A dont la réactivité est égale à celle d'un A_2B classique
- un antigène B très affaibli
- un excès important d'antigène H
- un anti-B faible dans le plasma
- la présence dans la salive des sujets sécréteurs de substance A et H en quantité normale et de substance B mise en évidence seulement en utilisant les propres hématies du sujet.

Ce phénotype se différencie du phénotype B acquis par l'excès d'expression de l'antigène H et par la présence d'un anti-B faible dans le plasma.

III.1.3- Les phénotypes B(A) et A(B)

Entre 1986 et 1989, Beck et col. démontrent que les hématies d'environ 1 % des sujets B préalablement groupées à l'aide de réactifs polyclonaux, sont agglutinées par un anticorps monoclonal puissant anti-A. Ce phénotype est appelé B(A). Le phénomène est dû au fait qu'une enzyme B puissante ajoute de grandes quantités de D-galactose à la substance H préformée mais également de petites quantités de N-acétyl-galactosamine.

De façon contraire, le phénotype A(B) a été également mis en évidence à l'aide d'anticorps monoclonaux puissants anti-B. Chez certains sujets préalablement groupés A à l'aide de réactifs polyclonaux, une faible réactivité des hématies est observée avec le réactif monoclonal anti-B.

Ces deux phénotypes démontrent que les transférases codées par les gènes A et B ont des spécificités qui se « superposent » partiellement.

III.2- Les phénotypes rares acquis

III.2.1- Le phénotype B acquis

Ce phénotype acquis s'observe chez des sujets de phénotype A_1 , le plus souvent dans un contexte d'infection digestive dans le cadre d'un cancer colique. Lors du groupage sanguin, on met en évidence une faible agglutination (image de double population) des hématies avec les réactifs anti-B. Ce phénomène était classiquement observé avec les réactifs anti-B polyclonaux. Il n'est aujourd'hui pratiquement plus mis en évidence du fait de l'utilisation des anticorps monoclonaux. Les clones anti-B doivent en effet être sélectionnés pour ne pas reconnaître ce phénomène.

Ceci est parfaitement expliqué sur le plan biochimique : l'action d'une désacétylase produite par le germe responsable de l'infection transforme la N-acétyl-galactosamine (épitope A) en galactosamine, qui est très proche du galactose (épitope B).

Ce phénomène est transitoire et ne dure que le temps de la vie des globules rouges ayant subi l'action de la désacétylase.

Dans des cas plus rares, un autre mécanisme pourrait expliquer le phénotype B acquis. Certains types de bactéries produisent des lipopolysaccharides qui présentent des

structures B-like. L'adsorption passive de telles structures sur la membrane des hématies entraînerait un phénotype B acquis. Ce phénomène démontré in vitro, n'a toutefois jamais été prouvé in vivo.

III.2.2- Le phénotype A acquis

Berman a montré en 1992, que des hématies polyagglutinables de type Tn se comportent comme ayant un antigène A. En effet, le sucre immunodominant du phénomène Tn est une N-acétyl-galactosamine.

III.2.3- Les modifications antigéniques au cours de pathologies malignes

De nombreuses études ont démontré que les cellules de nombreux tissus qui expriment normalement les antigènes ABH, peuvent perdre partiellement cette expression quand un processus malin se développe dans ces tissus. On observe fréquemment ce phénomène chez des patients atteints de pathologies hématologiques.

Inversement et plus rarement, certains sujets de groupe B ou O peuvent présenter au niveau de leurs cellules malignes un antigène A like.

■ IV. LES ANTICORPS DU SYSTÈME ABO

Les anticorps anti-A et anti-B sont régulièrement présents chez tous les individus dépourvus de l'antigène correspondant. Ils sont classiquement dénommés « naturels et réguliers ». En fait ils sont produits lors de la petite enfance en réponse à des stimulations immunologiques environnementales et aux antigènes A ou B exprimés par les bactéries de la flore intestinale.

Des anticorps « immuns » anti-A ou anti-B peuvent également apparaître à la suite de stimulations supplémentaires.

Les anticorps naturels et immuns ont des caractéristiques physiques différentes qui permettent de les distinguer.

IV.1- Anticorps anti-A, anti-B et anti-A, B « naturels »

Ce sont les anticorps réguliers anti-A des sujets B, anti-B des sujets A et anti-A,B des sujets O. Certains anticorps sont de type irréguliers : ce sont par exemple l'anti-A1 des sujets A2, A2B, ou A faibles et l'anti-H des sujets A1 et A1B. Leur production est liée à la réponse primaire de l'organisme dirigé contre des antigènes A ou B portés par les bactéries saprophytes de la flore intestinale ou diverses substances de l'environnement.

Ces anticorps naturels ont les propriétés suivantes :

- ils sont spontanément agglutinants en milieu salin,
- leur optimum thermique est à + 4°C.,
- ils peuvent être neutralisés par des substances de groupes A ou B solubles,

- ils n'ont pas de pouvoir hémolysant,
- ils sont thermolabiles (10 min à + 70 °C.),
- ils sont composés essentiellement d'IgM, mais aussi d'IgG voire d'IgA.

Les anticorps anti-A ou anti-B apparaissent habituellement entre le 3^e et 6^e mois de vie et leur concentration atteint un maximum vers l'âge de 10 ans. La concentration des anticorps anti-A ou anti-B est diminuée dans certaines pathologies (Waldenström, LLC,...) et augmentée dans certaines anémies hémolytiques auto-immunes, les cirrhoses éthyliques, ou certaines hépatites chroniques actives.

IV.2- Anticorps anti-A ou anti-B immuns

- Ils peuvent résulter d'une allo-immunisation par grossesse ou exceptionnellement d'une transfusion incompatible. Cependant le plus souvent, ils sont le fruit d'une hétéro-immunisation à la suite du contact de l'organisme avec des substances d'origine animale ou bactérienne.

Ces anticorps immuns sont inconstants et ont les propriétés suivantes :

- ils ne sont pas spontanément agglutinants en milieu salin,
- leur activité est conservée à + 37 °C,
- ils sont difficilement neutralisables par des substances solubles,
- ils résistent au traitement par la chaleur 10 min à + 70 °C,
- ils sont hémolysants,
- ils sont constitués essentiellement d'IgG.

Ces anticorps immuns, à la différence des précédents sont capables de franchir la barrière placentaire et peuvent donc être impliqués dans des problèmes d'immunisation fœto maternelle.

IV.3- Auto-anticorps anti-A et anti-B

Quelques cas d'auto-anticorps anti-A et anti-B de nature IgM ont été décrits.

SYSTEME H ISBT 018 (anciennement Hh-SEse)

■ INTRODUCTION

Les antigènes ABH sont des antigènes ubiquitaires retrouvés non seulement à la surface des globules rouges, mais aussi dans la plupart des tissus et liquides biologiques de l'organisme. L'expression des antigènes A ou B nécessite d'abord l'intervention d'autres glycosyltransférases que A ou B. Les gènes H et SE codent la même enzyme : une α 1-2fucosyltransférase. Suivant le type de cellules, c'est l'un ou l'autre de ces 2 gènes qui intervient (voir biochimie). Ces deux gènes sont situés sur le chromosome 19 et sont donc indépendants du locus ABO. Il y a 4 haplotypes : *HSE* et *Hse* courants et *hSE* et *hse* exceptionnels.

Les antigènes ABH sont présents dans les liquides biologiques de 80 % des sujets qui possèdent le gène SE tandis que 20 % possèdent en double dose le gène amorphe se et sont donc non sécréteurs.

L'enzyme H quant à elle, est présente en particulier dans les globules rouges, la moelle osseuse, les lymphocytes et les glomérules rénaux.

■ I. LES ENZYMES α 1-2FUCOSYLTRANSFÉRASES ET L'ANTIGÈNE H

Que ce soit l'enzyme codée par le gène H (FUT2) ou le gène SE (FUT3), elles permettent la fixation d'un fucose sur le carbone 2 d'un dissaccharide précurseur, lui même appartenant à une glycoprotéine ou un glycolipide. C'est la fixation de ce fucose qui crée l'antigène ou la substance H. Cette étape biochimique est indispensable pour que les enzymes A ou B puissent agir à leur tour. A la suite de l'action de ces dernières enzymes l'antigène H sera donc en partie ou presque totalement transformé.

La substance H sera donc identifiable sur tous les globules rouges (sauf ceux des sujets H déficients). Tous les réactifs anti-H agglutinent les hématies des sujets quelque soit leur groupe ABO. L'intensité des réactions observées sera toutefois variable et décroît dans l'ordre suivant : $O > A_2 > B > A_2B > A1 > A_1B$.

De façon parallèle la quantité de substance H mise en évidence par des réactions d'inhibition de l'agglutination dans la salive de sujets sécréteurs décroît des sujets de groupe O à A_1B .

Groupe sanguin ABO	Substances solubles dans les sécrétions
A	A + H
B	B + H
AB	A + B + H
O	H

■ II. LES PHÉNOTYPES H DÉFICIENTS

Pendant longtemps on a cru que les gènes H et Se étaient monomorphes et que l'enzyme H était fonctionnelle dans les globules rouges de tous les sujets. En 1952, Bhende décrit chez un sujet indien, un phénotype ABO particulier caractérisé par l'absence d'antigène A, B, et de substance H sur les globules rouges et la présence dans son plasma d'anti-A, d'anti-B et surtout d'un anti-H très puissant. Ce phénotype a été appelé Oh ou Bombay. Cette découverte est importante sur le plan théorique et a des répercussions capitales en pratique transfusionnelle. En effet, le sujet Bombay est un « receveur dangereux » qui ne peut recevoir que du sang identique au sien.

Il a été ensuite démontré que plusieurs types de phénotypes déficients existent et on distingue :

- les phénotypes H déficients non sécréteurs : h/h se/se,
- les phénotypes H déficients sécréteurs : h/h SE.

II.1- Les phénotypes H déficients non sécréteurs h/h se/se

Ils sont caractérisés par l'absence d'antigène H au niveau des hématies et des sécrétions et par la présence dans le plasma d'anti-H.

On distingue les H nuls et les H faibles :

- les H nuls d'origine indienne ne possèdent pas du tout d'antigène H,
- les H faibles d'origine européenne possèdent un peu de substance H érythrocytaire décelable par fixation-élution d'anti-H de H nul d'origine indienne,
- les Ah, Bh et ABh : les H faibles qui possèdent les gènes A ou B voient leur faible quantité d'antigène H transformée en A ou B. Dans leur plasma, on trouve un anti-H identique à celui des H nuls.

II.2- Les phénotypes H déficients sécréteurs h/h SE

Ils sont caractérisés par l'absence d'antigène H érythrocytaire mais la présence de substance H dans les sécrétions. Dans le plasma, on peut déceler un anti-HI de très faible intensité.

■ III. LES ANTICORPS ANTI-H

Les anticorps anti-H observés chez les sujets A₁ ou A₁B non sécréteurs sont une agglutinine froide sans danger sur le plan transfusionnel. Par contre l'anti-H des sujets Bombay ou des sujets Ah ou Bh est actif à + 37 °C, le plus souvent hémolysant et très dangereux sur le plan transfusionnel.

Enfin on peut mettre en évidence des anticorps anti-HI en général peu dangereux sur le plan transfusionnel. L'anti-HI reconnaît toutes les hématies OI1 (OI+) mais ne reconnaît pas les rares sujets OI2 (OI-) ou déficients en antigène H ni les hématies de cordon. Il n'est pas inhibé par la salive des sujets sécréteurs de substances ABH. On l'observe chez la plupart des Bombay sécréteurs et quelques sujets A₁ ou A₁B sécréteurs. Ces anti-HI sont peu puissants et n'ont que rarement une conséquence sur le plan transfusionnel.

BIOCHIMIE DES ANTIGÈNES ABH

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Les voies de synthèse biochimique des antigènes ABH et LE ont été progressivement comprises à partir des années 50 essentiellement à la suite des travaux des équipes de Kabat et de Morgan et Watkins.

Les déterminants antigéniques ABH sont des carbohydrates terminaux se fixant sur des structures oligosaccharidiques qui sont portées par des glycosphingolipides solubles, des oligosaccharides libres solubles, et des structures membranaires. Parmi ces structures membranaires, on trouve des protéines intégrales de la membrane, et des glycolipides associés à la membrane. Ainsi les études biochimiques ont permis de démontrer que 80 % des déterminants ABH de la membrane du globule rouge sont associés avec la bande 3 (une protéine ayant un rôle de transporteur d'anion). La synthèse des molécules ABH (et LE) fait intervenir plusieurs gènes distincts qui codent tous pour des glycosyltransférases agissant de façon séquentielle pour catalyser la synthèse de ces déterminants.

Les molécules ABH et LE ne sont donc pas les produits primaires des gènes ABO, H, SE ou LE. Les produits de ces gènes sont des enzymes : les glycosyltransférases.

La compréhension de la biosynthèse des antigènes A ou B est étroitement liée à celle de la biosynthèse de l'antigène H sous l'action du gène H ou SE. En effet, l'avant-dernière étape de cette synthèse aboutit au déterminant H qui, suivant le cas, est catalysé par une α L fucosyltransférase codée par le gène H ou SE.

Il existe en fait différentes enzymes capables de fixer un fucose (au moins 7 fucosyltransférases décrites) qui agissent sur au moins 6 disaccharides précurseurs dont 4 sont communs.

- Type I = α Gal 1 \rightarrow 3 GlcNAc1 \rightarrow R
- Type II = α Gal 1 \rightarrow 4 GlcNAc1 \rightarrow R
- Type III = α Gal 1 \rightarrow 3 GalNAc1 \rightarrow R
- Type IV = α Gal 1 \rightarrow 3 GalNAc1 \rightarrow R

Ces disaccharides précurseurs sont couplés à un « carrier » (porteur) ». Ils peuvent être suivant les cellules et les tissus des carbohydrates, des glycolipides ou des glycoprotéines de différentes tailles.

Les précurseurs de type I et II sont trouvés à la terminaison d'oligosaccharides liés par une liaison –N ou –O à des protéines ou à des lipides. Le type de précurseur varie suivant les tissus : Le précurseur de type I est « classiquement » seulement synthétisé dans les tissus de l'endoderme (cellules épithéliales digestives, urinaires, respiratoires et certaines cellules exocrines) et donc trouvé avec les molécules ABH fixées sur les protéines et les lipides des sécrétions et fluides de l'organisme. Le précurseur de type II est trouvé dans des tissus dérivant du mésoderme et en particulier les érythrocytes ou de l'ectoderme comme l'épiderme.

Le précurseur de type III est limité à des oligosaccharides liés en –O, à des glycoprotéines exprimées par des cellules épithéliales et à des glycolipides de la membrane du globule rouge. Le précurseur de type IV est un composant de glycolipides de la membrane du globule rouge et de certains organes solides comme le rein.

Tous ces précurseurs sont utilisés comme substrat pour des réactions de transglycosylation catalysées par des $\alpha(1,2)$ fucosyltransférases. Ceci entraîne la fixation d'un fucose sur le C2 du galactose et aboutit au déterminant H. Il y a au moins deux $\alpha(1,2)$ fucosyltransférases : l'une est le produit du gène H et l'autre du gène SE. Ces deux enzymes se différencient par leur affinité pour leur substrat. La fucosyltransférase H utilise les précurseurs de type II et IV et donne la substance H de type 2 et 4. La fucosyltransférase SE utilise les précurseurs de type I et III et aboutit aux substances H de types 1 et 3.

Après l'action des fucosyltransférases, peuvent intervenir les glycosyltransférases codominantes permettant la fabrication des déterminants A et B. L'allèle A code pour une $\alpha(1,3)$ Nacétyl-galactosaminyltransférase. L'allèle B pour une $\alpha(1,3)$ galactosyltransférase. Un schéma simplifié de biosynthèse est présenté figure 1.

Donc schématiquement suivant le précurseur utilisé on pourra avoir des antigènes ABH de 4 types principaux :

- De type 1 = trouvé dans les sécrétions, le plasma et les cellules épithéliales et des antigènes adsorbés à partir du plasma sur les globules rouges.
- De type 2 = les chaînes ABH de type 2 constituent les structures principales ABH des globules rouges. On les trouve souvent sous formes branchées sur les glycosphingolipides.
- De type 3 : ces déterminants sont liés par le biais de la N-acétyl-galactosamine à une sérine ou une thréonine de polypeptides. Ce type n'est pas retrouvé au niveau des globules rouges mais dans de très nombreux autres tissus. Leur expression est contrôlée par le gène SE. Un autre type de chaîne ABH de type 3, trouvé au niveau des globules rouges résulte de l'extension de l'antigène A de type 2. Cette extension se fait par action d'une $\alpha(1,3)$ galactosyltransférase qui rajoute un galactose formant un précurseur de type 3. L'enzyme H agit formant un déterminant H de type III, qui peut être utilisé par la transférase A1 et non par la transférase A2. Ce déterminant répétitif A est caractéristique du phénotype A1.

- De type 4

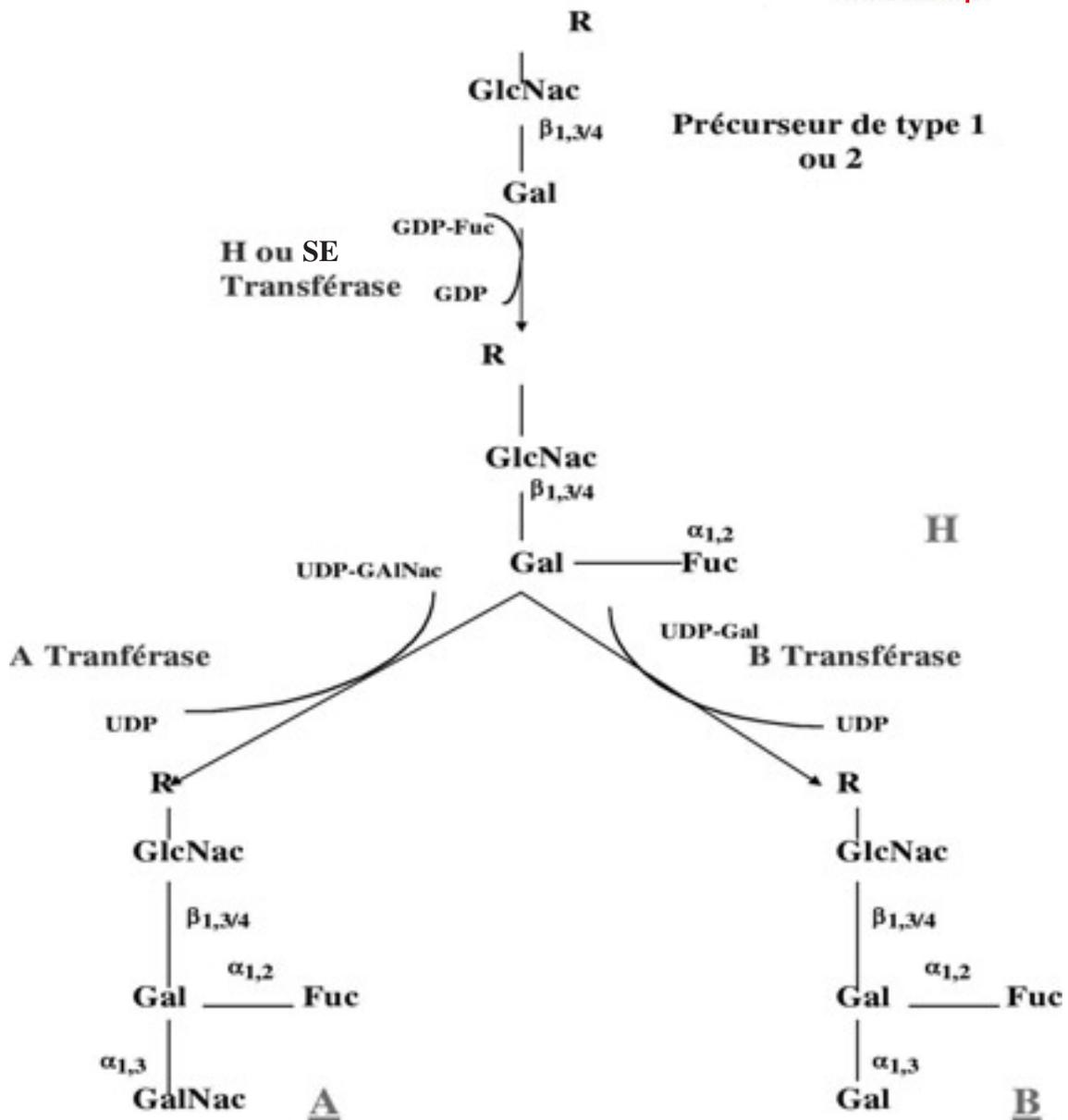


Figure : Schéma simplifié de la biosynthèse des antigènes ABH

SYSTÈME LE ISBT 007 (anciennement Lewis)

■ INTRODUCTION

Mourant met en évidence en 1948, un anticorps reconnaissant un antigène présent chez 20 % des sujets testés (anti-Le^a ou anti-LE1). Deux ans plus tard, Andersen identifie un anticorps (anti-Le^b ou anti-LE2) reconnaissant la grande majorité des sujets négatifs avec le premier anticorps.

Ces découvertes permettent à l'époque de définir trois phénotypes érythrocytaires

- LE : 1, -2
- LE : -1, 2
- LE : -1, -2

Le système LE n'est pas un système de groupe sanguin au sens strict du terme mais un système de sécrétion voire un système tissulaire. A la différence des enzymes ABH, l'enzyme LE n'intervient pas au niveau des cellules hématopoïétiques. Cette transférase produit essentiellement des substances de groupes solubles : des glycoprotéines dans la salive et des glycosphingolipides dans le plasma. Ces dernières sont adsorbées secondairement sur la membrane du globule rouge du fait des échanges permanents des glycosphingolipides ayant lieu entre le plasma et les membranes cellulaires. Ainsi il est possible artificiellement de transformer des hématies LE : -1 en hématies LE1 en les incubant avec du plasma de sujet LE1.

Il n'existe pas de phénotype érythrocytaire LE : 1, 2 chez l'adulte à l'inverse les antigènes LE ne sont pas présents sur les hématies des nouveau-nés.

Enfin comme nous le verrons, tous les sujets LE : 1, -2 sont non sécréteurs de substances ABH ; de même les sujets LE : -1,2 sont tous sécréteurs de substances ABH. Le phénotype LE est donc influencé par le phénotype sécréteur du sujet.

■ I. GÉNÉTIQUE ET BIOCHIMIE

Le gène LE est situé sur le bras court du chromosome 19, très près du gène codant pour la fraction C3 du complément. Ce gène est indépendant des gènes ABO, Hh et SEse. Les phénotypes LE sont toutefois liés aux antigènes de groupe ABO car l'enzyme produite par le gène LE agit sur les mêmes substrats que les glycosyltransférases A, B, H ou SE.

Le gène LE (FUT3), présent chez 90 % des sujets a été cloné et code pour une $\alpha(1-3)$ ou $(1,4)$ fucosyltransférase qui transfère un fucose sur le carbone 3 ou 4 de la α N-acétyl-

glucosamine subterminale d'un précurseur. Il peut utiliser le substrat de type I, donnant l'antigène LE1, mais également sur la substance H de type I pour créer le déterminant LE2. L'antigène LE1 résulte donc de la fixation du fucose en 4 sur la α N-acétylglucosamine d'un disaccharide précurseur. On comprend que cet antigène ainsi que l'antigène LE2 ne peuvent être « fabriqués » au niveau de l'érythroblaste puisque au niveau du substrat de type II (présent dans l'érythroblaste), le carbone 4 de la N-acétylglucosamine est pris dans la liaison avec le C1 du galactose.

Le gène LE peut toutefois également agir au niveau du substrat de type II et créer par son activité $\alpha(1, 3)$, l'antigène LE3 (Le^x). Si il y a d'abord action de l'enzyme codée par le gène H, on obtient l'antigène Le^y . Toutefois l'affinité de l'enzyme LE est beaucoup plus importante pour le substrat de type I que sur le substrat de type II et en pratique dans le plasma et sur le globule rouge, seuls les glycolipides LE1 et LE2 sont trouvés.

Ensuite peuvent agir les glycosyltransférases A ou B et donner ALE1...

■ II. LES PHÉNOTYPES LE

II.1- La substance LE1

Chez les individus possédant le gène LE :

- la cellule muqueuse des glandes salivaires fabrique et déverse dans la salive de la substance LE1 sous forme glycoprotéinique,
- une cellule inconnue fabrique et déverse dans le plasma de la substance LE1 sous forme glycolipidique qui s'adsorbe secondairement à la surface des globules rouges.

II.2- La substance LE2 et le rôle du gène SE

Seuls les sujets qui possèdent les gènes LE et SE fabriquent la substance LE2 qui est retrouvée dans la salive, le plasma et sur les globules rouges. La salive et le plasma de ces individus contiennent par ailleurs les substances H et LE1. Par contre, les globules rouges sont dépourvus de substances LE1.

Ainsi, en fonction du génotype, les phénotypes chez les Caucasiens sont les suivants :

- LE^{esese} → LE : 1, – 2 20 %
- LE^{ESE} → LE : – 1, 2 70 %
- $lele^{esese}$ ou $lele^{ESE}$ → LE : – 1, – 2 10 %

■ III. LES ANTICORPS ANTI-LE

Ce sont le plus souvent des anticorps naturels irréguliers. Ils sont de nature IgM et fixent le complément. Certains d'entre eux ne sont mis en évidence qu'en utilisant le test indirect à l'antiglobuline ou à l'aide d'hématies traitées par les enzymes protéolytiques. On les

observe chez 0,5 % des Caucasiens mais leur fréquence est plus élevée chez les Noirs et les femmes enceintes. Ils sont produits par les sujets LE : -1, -2 de groupe A₁, B ou A₁B essentiellement.

L'anti-LE1 est le plus fréquent ; il est souvent actif à + 37 °C et parfois hémolysant. Il est élaboré par les sujets LE : -1, -2 sécréteurs.

L'anti-LE2 est plus rare, et développé par les sujets LE : -1, -2 non sécréteurs. En fait, il existe deux types d'anti-LE2 :

- L'anti-LebH (anti-LE4) : c'est le plus fréquent. Il ne reconnaît que les hématies LE2 de groupe O et A2 qui possèdent beaucoup de substance H. Cet anticorps est inhibé par la salive de tous les sujets sécréteurs de substance H.
- L'anti-LebL : plus rare ; c'est en fait le véritable anti-LE2. Il reconnaît toutes les hématies LE2 quel que soit le groupe ABO. Il n'est inhibé que par la salive des sujets SE et LE.

L'anti-Lex (anti-LE3) est quant à lui, peu fréquent. Il est produit par les sujets A1B LE : -1, -2 sécréteurs. Il agglutine toutes les hématies LE1 ou LE2 quel que soit leur groupe ABO. Cet anticorps agglutine également les hématies de 90 % des nouveau-nés qui sont pourtant LE : -1, -2. Cet anticorps n'est pas un mélange d'anti-LE1 et d'anti-LE2, il reconnaît l'antigène LE3, qui est l'équivalent de l'antigène LE1, construit sur les chaînes précurseurs de type 2.

Autres Spécificités

- anti-LE5 (ALeb)
- anti-LE6 (BLeb)...

Le système LE n'a que peu d'intérêt en pratique transfusionnelle. En effet seuls de rares anti-LE1, anti-LebL et quelques anti-LE3 sont hémolysants à + 37 °C. Ce sont les seuls dont il faudra tenir compte.

Les anticorps du système LE ne sont pas impliqués dans la maladie hémolytique du nouveau né car ils ne traversent pas la barrière placentaire et tous les nouveau-nés sont LE : -1, -2.

BASES MOLÉCULAIRES DES ANTIGÈNES ABH ET LE

La connaissance des bases moléculaires du polymorphisme ABH et LE connaît une progression très rapide depuis 1990, date à laquelle l'équipe de Yamamoto a décrit l'organisation du gène ABO.

Le gène ABO est sur le chromosome 9 (9q34.1-q34.2). Il est constitué de 7 exons et comprend environ 20Kb. La taille des exons varie de 28 bp à 688 bp pour l'exon 7. Il est intéressant de noter que les exons 6 et 7 du gène ABO codent à eux seuls pour la plus grande partie de la protéine enzymatique.

Les allèles A₁ et B ne diffèrent que par 7 mutations nucléotidiques dont quatre entraînent un changement d'acide aminé aux codons 176, 235, 266 et 268 :

	176	235	266	268
Allèle A ¹	arginine	glycine	leucine	glycine
Allèle B	glycine	sérine	méthionine	alanine

L'allèle A² diffère de l'allèle A¹ par une mutation C467T (Proline156leucine), mais également et sans doute surtout par une délétion d'une cytosine parmi 3 en position 1059 à 1061 qui entraîne une extension du cadre de lecture de 64 nucléotides. La séquence d'acides aminés est prolongée de 11 acides aminés (365 au lieu de 354).

Quant à l'allèle O, l'élément fondateur essentiel est une délétion de la guanine en position 261 au sein de l'exon 6 qui entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré. Ceci aboutit à une protéine tronquée de 117 acides aminés (au lieu de 354), dépourvue du site catalytique. La très grande majorité des allèles O possède cette délétion en 261. Des allèles O plus rares ne la possèdent pas. Un premier, présente deux mutations ponctuelles au niveau des nucléotides 297, 526 et 802. Cette dernière mutation (G802A), est responsable de l'abolition de l'activité catalytique de l'enzyme en modifiant l'acide aminé 268 (Arginine à la place d'une Glycine). Un deuxième, est identique à l'allèle A2 mais possède en plus une insertion de guanine entre les nucléotides 798 et 804. Un troisième diffère seulement de l'allèle A1 par une autre insertion d'une guanine entre les nucléotides 87 et 88 qui entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré en position 56. Un dernier (selon les données actuellement disponibles) présente une mutation C322T qui crée un codon stop.

De plus les bases moléculaires de nombreux variants faibles ont été rapportés. Il est aujourd'hui clair que le polymorphisme génétique des groupes sanguins ABO est très nettement supérieur au polymorphisme phénotypique. Ainsi 27 allèles A, 15 allèles B et au moins 26 allèles O sont aujourd'hui décrits, sans tenir compte de plusieurs allèles hybrides qui ont été également rapportés.

Le gène H ou FUT1 et le gène SE ou FUT2 codent tous les deux pour une 2 α -L-fucosyltransférase. Ces deux gènes structuraux sont localisés sur le bras long du chromosome 19 (19q13.3) très proche d'un gène inactif chez l'homme, appelé Sec1. Le gène FUT1 s'étend sur un peu moins que 9 Kb et sa région codante ne comporte qu'un seul exon de 1,1 Kb. La protéine H comprend 365 acides aminés. Des mutations inactivatrices du gène H ont été décrites. Dans le phénotype Bombay indien, une mutation inactivatrice T725G (Leucine 242 Arginine) a été rapportée. Dans le phénotype Bombay Réunion, on observe une autre mutation inactivatrice C349T (Histidine 117 Tyrosine). A côté de ces deux mutations majeures, d'autres mutations sporadiques ont été décrites.

Les mutations inactivatrices du gène SE ont également été décrites. Ainsi, dans le phénotype Bombay indien, le gène FUT2 est totalement délété ; par contre dans le phénotype Bombay Réunion, on observe une mutation non sens ponctuelle G428A qui est retrouvée chez à peu près 20 % des Caucasiens non sécréteurs.

Le gène LE (FUT3) a été également cloné. 361 acides aminés composent la protéine LE. Plusieurs mutations ont été rapportées comme étant associées à une inactivation de la fucosyltransférase. Ainsi le changement de l'acide aminé 20 (Arginine à la place de la leucine) et de l'acide aminé 170 (sérine à la place d'une glycine) ont été impliqués dans le phénotype LE : -1, -2 chez les japonais. Dans la population indonésienne, une autre mutation Ile356Lys a été décrite chez les sujets LE : -1, -2. Plusieurs autres mutations ont été également impliquées.

■ CONCLUSION

Le système de groupe sanguin ABO doit être considéré comme un groupe tissulaire. L'existence d'anticorps naturels réguliers anti-A et anti-B explique l'importance du respect de la compatibilité ABO en transfusion sanguine et ce dès la première transfusion. La répartition ubiquitaire des antigènes ABO implique que l'on tienne compte de ce groupe dans la transplantation d'organes en particulier rénale.

L'implication du système ABO dans le cadre de la maladie hémolytique néonatale est importante en terme de fréquence mais ses répercussions cliniques sont le plus souvent modérées du fait de l'immaturation antigénique à la naissance.

Les antigènes ABH et associés se caractérisent par le fait qu'ils ne sont pas le produit primaire des gènes ABO, H et SE ou LE. Ils résultent de l'action de glycosyltransférases qui vont greffer de façon successive des sucres sur un substrat accepteur.

Au polymorphisme phénotypique déjà complexe découvert depuis un siècle, se superpose aujourd'hui un polymorphisme génétique encore plus complexe dont l'étude permet aujourd'hui de mieux comprendre les relations entre les structures des glycosyltransférases et leur activité enzymatique qui est à l'origine de l'expression phénotypique observée.

BIBLIOGRAPHIE

1. LANDSTEINER K. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. Wien Klin Wochenschr, 1901, 14, 1132-1134.
2. DECASTELLO A, VON STURLI A. Ueber die isoagglutine im serum gesunder und kranker menschen. München Med Wochenschr, 1902, 49, 1090-1095.
3. EPSTEIN A, OTTENBERG R. A simple method of performing serum reactions. Proc NY Path Soc, 1908, 8, 117-123.
4. BERNSTEIN F. Ergebnisse einer biostatistischen zusammenfassenden betrachtung über die erblichen blutstrukturen des menschen. Klin Wochenschr, 1924, 3, 1495-1924.
5. BERNSTEIN F. Zusammenfassenden betrachtungen über erbliche blutstrukturen des menschen. Z Indukt Abstamm-Vereb lehre, 1925, 37, 237.
6. MOURANT AE. A new human blood group antigen of frequent occurrence. Nature, 1946, 158, 237-238.
7. ANDERSEN PH. The blood group L system. A new group L2. A case of epistasy within the blood groups. APMIS, 1948, 25, 728-731.
8. GRUBB R. Correlation between Lewis blood group and secretor character in man. Nature 1948, 162, 933.
9. BHENDE YM, DESHPANDE CK, BHATIA HM, SANGER R, RACE RR, MORGAN WTJ, WATKINS WM. A new blood group character related to the ABO system. Lancet, 1952, 1, 903-904.
10. ALLERDICE PW, KAITA H, LEWIS M, MCALPINE, PJ, WONG P, ANDERSON J, GIBLETT ER. Segregation of marker loci in families with an inherited paracentric insertion of chromosome 9, Am. J. Hum. Genet., 1986, 39, 612-617.
11. CLAUSEN H, WHITE T, TAKIO K, TITANI K, STROUD MR, HOLMES EH, KARKOV J, THIM L, HAKOMORI SI. Isolation to homogeneity and partial characterization of a histo-blood group A defined Fuc 1,2 Gal 1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase from human lung tissue. J. Biol. Chem., 1990, 265, 1139-1145.
12. YAMAMOTO F., CLAUSEN H., WHITE T., HAKOMORI T. (1990a) Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system Nature, 345, 229-233.
13. YAMAMOTO F., MARKEN J., TSUJI T., WHITE T., CLAUSEN H., HAKOMORI S. (1990b) Cloning and characterization DNA complementary to human UDP-Gal1Nac : Fuc 1-2 Gal 1,3-Gal NAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. J. Biol. Chem., 265, 1146-1151.

SYSTÈME P1 ISBT 003 (anciennement P) ET ANTIGÈNES DU « GLOBOSIDE » ISBT 209

■ INTRODUCTION

En 1927, Landsteiner et Levine découvrent à l'aide d'hétéro-anticorps le système P1. Ce système est étudié avec les systèmes ABO et associés car il existe une relation entre eux au niveau phénotypique. Néanmoins, les gènes du système P1 sont génétiquement indépendants des systèmes ABO, H, LE et des antigènes Ii. En 1951 et 1959 Levine et Matson découvrent respectivement de nouveaux anticorps définissant des phénotypes exceptionnels tels que les phénotypes GLOB : -1, -2 (Tja -) et GLOB : -1, 2 (Pk). Les trois antigènes P1, GLOB1 et GLOB2 sont synthétisés à partir d'un même précurseur.

■ I. LES ANTIGÈNES

I.1- L'antigène du système P1

On distingue à l'aide de l'anti-P1 deux phénotypes P1 et P2 dont les fréquences respectives sont de 75 % et 25 %. L'antigène P1 est mal développé à la naissance. Les sujets P2 développent très fréquemment un anticorps naturel irrégulier anti-P1.

I.2- Les antigènes du globoside : GLOB1 ET GLOB2 et les phénotypes exceptionnels

I.2.1- Les phénotypes GLOB : -1, 2 P1 positif (P1k) et GLOB : -1, 2 P1 négatif (P2k)

Les hématies des sujets GLOB : -1, 2 P1 positif possèdent les antigènes P1 et GLOB2 mais sont dépourvues de l'antigène GLOB1. Les hématies des sujets GLOB : -1, 2 P1 négatif ne possèdent que l'antigène GLOB2. Dans le sérum des sujets GLOB : -1, 2, il y a toujours un anti-GLOB1 naturel de nature IgM et/ou IgG, actif à +37 °C et hémolysant les hématies P1 positif et P1 négatif. Ce phénotype semble plus fréquent au Japon que dans les autres parties du monde.

I.2.2- Le phénotype silencieux GLOB : -1, -2 et l'anti-P1 + GLOB1 + GLOB2

Les hématies des sujets GLOB : -1, -2 ne possèdent aucun des antigènes des systèmes P1 et GLOB. Dans le sérum, on observe un anti-P1 + GLOB1 + GLOB2 qui reconnaît toutes les hématies sauf celles des sujets GLOB : -1, -2. L'anti-P1+GLOB1+GLOB2 est un anticorps naturel, régulier, de nature IgM et /ou IgG. Il est lui aussi extrêmement

dangereux sur le plan transfusionnel puisqu'il est actif à +37 °C et hémolysant. Ce phénotype GLOB : -1, -2 est aussi plus fréquent au Japon.

En ce qui concerne les avortements à répétition (avant la 14^e semaine d'aménorrhée) et les phénotypes GLOB : -1, -2 et GLOB : -1, 2, il semblerait que l'on puisse incriminer les composantes IgG anti-GLOB1 ou anti-GLOB2. Il est donc utile de vérifier chez les femmes enceintes GLOB : -1, -2 ou GLOB : -1, 2 la nature IgG ou IgM de ces composantes. Les glycosphingolipides exprimés par le placenta (dont le globoside qui exprime les antigènes GLOB1 et GLOB2) seraient les cibles primaires des anticorps maternels anti-P1+GLOB1+GLOB2. Les échanges plasmatiques dès le début de la grossesse permettent de diminuer le taux des anticorps. Ce globoside est aussi présent dans les cellules endothéliales et du trophoblaste.

I.3- Les particularités des antigènes

L'antigène P1, mal développé chez le fœtus, n'entraîne pas d'incompatibilité foëto-maternelle. Il est résistant aux protéases et le nombre de sites par hématie est extrêmement variable d'un individu à un autre, ainsi l'on distingue les P1 d'expression forte, moyenne, faible et très faible.

■ II. LES ANTICORPS ANTI-P1

Les anti-P1 sont fréquents et naturels. Plus de 60 % des sujets P1 peuvent développer temporairement un anti-P1. Ces anticorps sont généralement des anticorps froids, et même actifs à +37 °C, ils ne sont pas dangereux sur le plan transfusionnel.

Cependant, un soin particulier doit être apporté aux puissants anti-P1, anti-GLOB1 et anti-GLOB1 + 2 stimulés par les bactéries ou des allergènes.

Les individus possédant les anti-GLOB1 ou anti-GLOB1+2 ne peuvent recevoir que leur propre sang ou celui du même phénotype rare.

L'auto-anti-GLOB1 peut être observé dans certaines anémies hémolytiques auto-immunes (survenant après une infection virale ou bactérienne) : il s'agit dans ce cas d'une IgG biphasique, qui se fixe à +4 °C et provoque l'hémolyse des hématies ainsi sensibilisées à +37 °C.

Enfin, il existe des auto-anti-P1 stimulés par des agents infectieux : hydatidose et douve du foie.

■ III. BIOCHIMIE ET GÉNÉTIQUE

Les antigènes de ces deux systèmes sont des glycosphingolipides. La partie saccharidique des glycosphingolipides est synthétisée sous l'action séquentielle de glycosyl-transférases.

BIBLIOGRAPHIE

1. LANDSTEINER K, LEVINE P. Further observations on individual differences of human blood. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, NY, 1927, 24, 941-942.
2. MATSO, GA, SWANSON R, NOADES J, SANGER R, RACE RR. A « new » antigen and antibody belonging to the P blood group system. *Am. J. Hum. Genet.*, 1959, 11, 26-34.
3. NAIKI M, MARCUS DM. Human erythrocyte P and Pk blood group antigens : identification as glycosphingolipides. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 1974, 60, 1105-1111.
4. LEVINE P. Comments on hemolytic disease of newborn due to anti-PP1Pk (anti-Tja). *Transfusion*. 1977, 17, 573-578.
5. BEN-ISMAIL R, CARME B, GENTILINI M AND SALMON C. Comparative automated assay of anti-P1 antibodies in acute hepatic distomiasis (Fascioliasis) and in Hydatidosis. *Vox Sang.* 1980, 38, 165-168.
6. CAMERON GL AND STALEVEY JM. Blood group P substance in hydatid cyst fluids. *Nature*. 1957, 19, 535-538.
7. ISEKI S, MASAKI S AND LEVINE P. A remarkable family with the rare human isoantibody anti-Tja in four siblings ; anti-Tja and habitual abortion. *Nature*. 1954, 173, 1193-1194.
8. KORTEKANGAS AE, KAARSALO E, MALARTIN L, TIPPETT P, GAVIN J, NOADES J, SANGER R AND RACE RR. *Vox Sang.* 1959, 4, 337-349.
9. KUNDU SK, EVANS A, RIZVI J, GLIDDEN H AND MARCUS DM. A new Pk phenotype in the P blood group system. *J Immunogenetics*. 1980, 7, 431-439.
10. LOPEZ M, CARTRON JP, MARIOTTI M, BONY V, SALMON C. AND LEVENE C. Cytotoxicity of anti-PP1Pk antibodies and possible relationship with early abortions of p mothers. *Clin Immunol Immunopath.* 1983, 28, 296-303.

SYSTÈME LU ISBT 005 (anciennement Luthéran)

Découvert en 1945 par Callender, le système LU est essentiellement gouverné par deux allèles LU1 et LU2 qui produisent deux antigènes antithétiques LU1 et LU2. Les gènes LU sont situés sur le chromosome 19.

I. LES ANTIGÈNES

I.1- Les antigènes LU1 et LU2

A l'aide des deux anticorps anti-LU1 et anti-LU2, on distingue trois phénotypes érythrocytaires.

Réactions		Phénotypes	Génotypes probables	Fréquence en France
Anti-LU1	Anti-LU2			
+	+	LU :1,2	LU1LU2	5,58 %
+	-	LU :1,-2	LU1LU1	0,07 %
-	+	LU :-1,2	LU2LU2	94,35 %

Les antigènes ne sont présents que sur les hématies. Ils ne sont pas bien développés chez le nouveau-né.

La réaction d'agglutination des hématies LU1 par l'anti-LU1 donne souvent une image de double population. De plus, la force antigénique des antigènes LU1 et LU2 est d'expression très variable d'un sujet à un autre. Enfin, il est souvent facile de distinguer les hématies d'expression homozygote et hétérozygote par effet de dose.

I.2- Les phénotypes LU : -1, -2, -3

I.2.1- Le phénotype récessif

Comme dans tous les systèmes de groupe sanguin, il existe un phénotype silencieux dû à la présence en double dose d'un gène silencieux appelé lu. Par transfusion ou grossesse incompatible, les individus LU : -1, -2, -3 développent inévitablement un anti-LU3 qui reconnaît toutes les hématies sauf celles des LU : -1, -2, -3.

I.2.2- Le phénotype dominant

Ce phénotype particulièrement exceptionnel est observé durant plusieurs générations chez des individus qui possèdent les gènes LU1 et/ou LU2 mais qui ne peuvent s'exprimer

normalement en raison de la présence d'un inhibiteur dominant In(Lu) indépendant du système LU. L'inhibiteur dominant In(Lu) inhibe LU1, LU2 mais aussi LU18 (Aua), P1, I2 (i) et AnWj.

I.2.3- Le phénotype lié au chromosome X

Un troisième phénotype silencieux a été décrit : il est dû à un inhibiteur récessif XS2 lié au chromosome X.

I.3- Les autres antigènes antithétiques

LU9 et LU6, LU8 et LU14, LU18 (Aua) et LU19 (Aub) sont des antigènes antithétiques appartenant au système LU.

I.4- Les antigènes PARA-LU

Dans le sérum de rares sujets LU : -1, 2, il a été observé des anti-publics qui reconnaissent toutes les hématies sauf celles des LU : -1, -2, -3 récessif et dominant. Les antigènes reconnus sont appelés « para-LU ».

■ II. LES ANTICORPS ANTI-LU

Les anti-LU1 sont rares, ils sont souvent actifs en saline + 22 °C. Ce sont des IgG qui peuvent être parfois d'origine naturelle. Ils ne sont généralement pas dangereux en transfusion. Les anti-LU2 sont exceptionnels. Les anti-LU sont rarement impliqués dans les incompatibilités fœto-maternelles et ces dernières sont toujours bénignes.

■ III. LA BIOCHIMIE ET LA GÉNÉTIQUE

Les antigènes LU sont portés par des glycoprotéines de 597 AA, ils sont essentiellement exprimés au niveau des érythrocytes. Ces antigènes sont dénaturés par la trypsine et l' α -chymotrypsine ainsi que les agents réducteurs des fonctions thiols.

BIBLIOGRAPHIE

1. CALLENDER S., RACE RR, PAYKOC ZV. Hypersensitivity to transfused blood. Br. Med. J. 1945, ii, 83.
2. CUTBUSH M., CHANARIN I. The expected blood-group antibody, anti-Lub. Nature. 1956, 178, 855-856.
3. SHAW MA., LEAK MR, DANIELS GL, TIPPETT P. The rare Lutheran blood group phenotype Lu(a-b-) : a genetic study. Ann. Hum. Genet. 1984, 48, 229-237 and unpublished observations.
4. RACE RR, SANGER R. Blood Groups in Man, 6th edn. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1975.
5. TIPPETT P. A case of suppressed Lua and Lub antigens. Vox Sang. 1971 ; 20 : 378-380.
6. MANNESSIER L., ROUGER PH., JOHNSON C., MUELLER K., MARSCH WL. Acquired loss of red-cell Wj antigen in a patient with Hodgkin's disease. Vox Sang. 1986, 50, 240-244.
7. CRAWFORD MN, TIPPETT P AND SANGER R. The antigens Aua, i and P1 of cells of dominant type of Lu(a-b-). Vox Sang. 1974, 26, 283-287.
8. KISSMEYER-NIELSEN F. A further example of anti-Lu as cause of a mild hemolytic disease of the newborn. Vox Sang. 1960, 5, 532-537.
9. MARSH WL. Anti-Lu5, anti-Lu6 and anti-Lu7. Three antibodies defining high frequency antigens related to the Lutheran blood group system. Transfusion Philad. 1972, 12, 27-34.
10. NORMAN PC, TIPETT P AND BEAL RW. An Lu(a-b-) phenotype caused by an X-linked recessive gene. Vox Sang. 1986, 51 : 49-52.

SYSTÈME RH ISBT 004 (anciennement Rh, Rhésus)

■ INTRODUCTION

Système complexe de groupe sanguin porté uniquement par les globules rouges, polymorphe et d'importance majeure en pathologie humaine.

Depuis la découverte de l'antigène RH1 (D ou RhD) en 1939 près de 50 antigènes différents ont été mis en évidence.

Nous insisterons essentiellement sur les antigènes RH1 (D), RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e) et leurs anticorps correspondants qui sont le plus souvent impliqués en contexte obstétrico transfusionnel

■ I. HISTORIQUE

La découverte du système RH, comme celle de nombreux autres systèmes de groupes sanguins érythrocytaires, a été le résultat de l'exploration d'incidents transfusionnels et de maladie hémolytique du nouveau-né.

L'attribution du nom de « Rhésus » à ce système est née d'une confusion historique avec un autre système.

En effet en 1939 Lévine et Stetson constatent que le sérum d'une femme ayant accouché d'un enfant atteint de maladie hémolytique néo-natale agglutine non seulement les hématies de l'enfant et du père mais aussi celles de 85 % des sujets testés.

Landsteiner et Wiener en 1940 constatent que le sérum dilué d'un lapin immunisé par des hématies de *Macacus rhésus* agglutine les hématies des mêmes sujets.

En fait, compte tenu que le sérum du lapin non dilué reconnaissait 100 % des sujets, il apparaissait que cet hétéro anticorps reconnaissait un antigène différent de l'antigène RH1, présent sur la majorité des hématies humaines mais dont la densité antigénique est plus importante chez les sujets porteurs de l'antigène RH1 que chez les sujets qui en sont dépourvus.

L'antigène incriminé dans cette confusion a été nommé LW (Landsteiner et Wiener) et le terme de RH a été maintenu pour désigner le système initialement concerné.

■ II. LES ANTIGÈNES COMMUNS

II.1- L'antigène RH1

85 % des sujets appartenant à la population européenne sont porteurs de cet antigène. Ils sont dits classiquement « RH1 ou RhD positif ». 15 % de ces mêmes sujets sont non porteurs de cet antigène ils sont « RH : -1 ou RhD négatif ». Cet antigène étant le plus immunogène des antigènes de groupes sanguins érythrocytaires sa détermination le rend indissociable du groupage sanguin ABO. L'antigène RH1 est bien développé à la naissance, il est strictement limité aux érythrocytes. La densité antigénique est fonction du phénotype (100 000 sites pour les hématies D--/D-- à 10 000 sites) conformément à la réduction suivante :

$$D \rightarrow DccEE > DCCee > DCcee > Dccee$$

II.2- Les autres antigènes communs

Ils sont représentés par les quatre antigènes suivants :

- RH2 (C) défini par l'anti-RH2 et présent chez 70 % de la population européenne.
- RH3 (E) défini par l'anti-RH3 et présent chez 30 % de la population européenne.
- RH4 (c) défini par l'anti-RH4 et présent chez 80 % de la population européenne.
- RH5 (e) défini par l'anti-RH5 et présent chez 98 % de la population européenne.

Les antigènes RH2 et RH4 d'une part et les antigènes RH3 et RH5 d'autre part sont antithétiques. Cela signifie que si l'un est absent l'autre est forcément présent.

La présence ou l'absence de ces quatre antigènes est analysée dans le cadre du phénotype RH-KEL1 qui comporte en outre la recherche de l'antigène KEL1 (K ou Kell) du système KEL.

■ III. LES AUTRES ANTIGÈNES DU SYSTÈME RH

III.1- Les variants de RH1

III.1.1-Phénotype RH1 faible

Classiquement et en fonction du phénotype, une hématie RH1 comporte entre 10 000 et 30 000 sites RH1. Le phénotype RH1 faible est classiquement caractérisé par un déficit quantitatif en sites antigéniques RH1. Ce déficit abouti, en fonction du seuil de sensibilité de la technique utilisée, à un affaiblissement de la réactivité voir une absence de détection de cet antigène. Compte tenu de l'évolution des réactifs et des techniques la fréquence des antigènes RH1 dits faibles a donc diminué. On conçoit, en terme de risque sanitaire, que la détection de ce type d'antigène doit être prise en compte dans le cadre de la qualification biologique du don ou lors du groupage d'un nouveau né, alors que l'intérêt est plus limité chez les patients receveurs de concentrés érythrocytaires. Deux types, au

moins, de mécanismes génétiques peuvent être impliqués : soit une forme allélique du gène RH1 soit un affaiblissement d'un allèle RH1 par effet de position en trans d'une forme allélique permettant la synthèse de l'antigène RH2.

III.1.2- Phénotype RH1 partiel

L'antigène RH1 peut être considéré 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. En fonction de(s) l'épitope(s) absent(s) on distingue plusieurs catégories de RH1 partiels. Les circonstances de découverte de tels phénotypes sont multiples :

Lors d'une identification d'un anticorps anti-érythrocytaire. Ces sujets peuvent, à la suite d'une stimulation obstétrico-transfusionnelle par un antigène RH1 « complet », s'immuniser contre la partie manquante. Dans ces conditions, la présence d'une spécificité anti-RH1 chez un sujet porteur de l'antigène RH1, avec un autocontrôle négatif évoquera cette possibilité.

Lors d'un typage RH1. Si l'un des deux réactifs monoclonaux anti-RH1 utilisés ne reconnaît pas l'épitope manquant, la discordance de résultat entre les deux réalisations pourra évoquer le diagnostic.

III.2- Les variants de RH2 et RH4 : ces variantes sont rares

La variante la plus importante est l'antigène RH8 (Cw) : la présence de cet antigène est liée à l'existence d'un allèle au gène RHCE et le plus souvent chez les sujets RH1. Sa fréquence est de 0,5 %. Il est mis en évidence par un anticorps spécifique : l'anti-RH8, mais aussi par l'anti-RH2.

III.3- Les variants de RH3 et RH5

Les plus importantes sont RH11 (E^w) et RH24 (E^T) La variante « E^U » est un antigène faible détecté par un test indirect à l'antiglobuline.

Enfin dans la race noire, il existe de nombreuses variantes de l'antigène RH5 accompagnées souvent de l'absence d'antigènes publics du système RH. L'antigène RH5 est comme l'antigène RH1 une mosaïque de plusieurs épitopes.

III.4- L'antigène RH12 (G), l'anti-RH12 et le gène « rG »

En 1958, Allen et Tippett découvrent un sujet exceptionnel dont les globules rouges apparemment RH : -1-2-345 sont agglutinés par les sérums anti-RH1,2. L'antigène reconnu fut appelé RH12. Il est présent sur toutes les hématies qui possèdent soit l'antigène RH1, soit l'antigène RH2, soit les deux et les rares hématies RH : -1-2 et RH12. Ces hématies RH : -1-2,12 ne sont pas reconnues par les anti-RH2 ou anti-RH1 purs mais le sont par les anti-RH1,2 qui sont en fait des anti-RH1,2,12.

L'anti-RH12 des anti-RH1,2,12 peut être isolé par fixations-éluions successives :

- anti-RH1,2,12 + globules rouges RH : -12-345 : élution d'un anti-RH12,2
- anti-RH12,2 + globules rouges RH : 1-2-345 : élution d'un anti-RH12.

III.5- Les antigènes composés

Ce type d'antigène désigne le produit de la collaboration de deux allèles en position cis sur le même chromosome. Ainsi la forme allélique RHce du gène RHCE contrôle non seulement la synthèse des deux antigènes courants RH4 et RH5 mais aussi celle d'un épitope supplémentaire reconnu par un anticorps spécifique : l'antigène RH6 (ce). Par ailleurs les sujets, ne possédant pas cet antigène, peuvent s'immuniser contre celui ci, et synthétiser un allo anti-RH6 dont l'identification repose sur un profil réactionnel spécifique défini dans le tableau ci après.

Phénotypes Gamme d'hématies tests	Génotype	Réactions obtenues avec anti-RH6
D CC ee	DCE/DCE	0
D cc ee	Dce/dce	+
dd cc ee	dce/dce	+
D cc EE	DcE/DcE	0
DCCeE	DCE/DcE	0
DCCeE	DCE/dce	+

D'autres formes alléliques du gène RHCE font l'objet de cette collaboration et codent les différents antigènes définis dans le tableau suivant.

Haplotype	Antigènes codés
RHce	RH2, RH5, RH7 (Ce)
RHcE	RH4, RH3, RH27 (cE)
RHCE	RH2, RH3, RH22 (CE)

■ IV. LES HAPLOTYPES PARTIELLEMENT AFFAIBLIS

L'affaiblissement de la réactivité antigénique peut concerner non seulement l'antigène RH1 mais aussi les autres antigènes classiques du système RH. A titre d'exemple certains sont présentés dans le tableau ci dessous.

	D	C	e	RH32	RH46	RH35
Noir RN	S	W	W	+0		
Blanc type I	N	W	W	/	/	+
Blanc type II	S	W	W	/	/	0

S : strong : renforcement d'activité

W : weak : affaiblissement de réactivité

■ V. LES HAPLOTYPES PARTIELLEMENT SILENCIEUX

La survenue de crossing over entre les gènes RHD et RHCE est à l'origine des gènes hybrides D - CE – D dont les produits de synthèse aboutissent à une perte totale ou partielle de l'antigène CE, des antigènes de grande fréquence avec éventuellement une modification de l'expression de l'antigène RH1 voire l'expression d'épitopes rares. Certains de ces haplotypes sont, à titre d'exemple, présentés dans le tableau suivant.

	D	C	E	c	e	RH17	RH18	RH29	LF
D--	S	0	0	0	0	0	0	+	
D--	W	0	0	0	0	0	0	+	Tar
D..	S	0	0	0	0	0	0	+	Evans
Dc-	S	0	0	W	0	0	0	+	
DCw-	S	0	0	0	0	0	0	+	(Cw)
DIV(C) -	W	W	0	0	0	0	0	+	Goa

LF : antigène de faible fréquence.

■ VI. LES HAPLOTYPES TOTALEMENT SILENCIEUX

Les antigènes RH sont regroupés sous forme d'un complexe composé de sous unités maintenues par liaisons non covalentes. Ce complexe comporte le cœur du complexe (tétramère RH + RH50) et des chaînes accessoires (CD47 - LW – GPB).

Le phénotype RH null est caractérisé par une absence de TOUS les antigènes RH à la surface membranaire. Deux mécanismes peuvent être à l'origine de l'absence du cœur du complexe :

→ soit une mutation homozygote des gènes RHD et RHCE : RH null amorphe.

→ soit une mutation homozygote du gène RH50 présent sur le chromosome N° 6 et n'appartenant pas au système RH : RH null régulateur

Les conséquences liées à ce type de phénotypes sont multiples :

Anomalies membranaires :

Stomatosphérocytose

Anémie hémolytique chronique.

Forme sévère : splénectomie.

Absence ou diminution des antigènes suivants :

LW

CD47

GPB (MNS3 - MNS4 - MNS5)

FY5

■ VII. LES ANTICORPS DU SYSTÈME RH

Les anticorps du système RH apparaissent classiquement après allo immunisation transfusionnelle ou obstétricale.

Les anticorps de ce système montrent des caractéristiques communes. La majorité d'entre eux sont des IgG (IgG1) et se fixent à 37 °C. L'agglutination est observée avec un test

indirect à l'antiglobuline. Leur détection est facilitée par l'utilisation de potentialisateur du test indirect à l'antiglobuline (Solution basse force ionique, Polyéthylène glycol) ou par un traitement préalable des hématies par des enzymes protéolytiques.

Certains de ces anticorps peuvent être de classe IgM (anti-RH3) ou retrouvés chez certains patients n'ayant jamais été exposés à une stimulation inter humaine (anti-RH8).

Un effet de dose, c'est-à-dire une réaction plus intense avec des hématies d'expression « homozygote », est observé avec certaines spécificités (anti-RH2, anti-RH4, anti-RH3, anti-RH5). Cet aspect n'est pas classique avec l'anti-RH1 qui présente toutefois des réactions plus intenses avec des hématies de phénotypes RH : 1, -2,3,4, -5 susceptibles de comporter une plus grande quantité d'antigènes RH1.

Classiquement ces anticorps n'activent pas le complément.

Implications cliniques

Les anticorps du système RH peuvent être impliqués dans des accidents immuno-hémolytiques par transfusions incompatibles. L'antigène RH1 est si immunogène (dans 50 à 70 % des cas, la transfusion d'une unité de sang RH1 entraîne chez un receveur RH : -1 la formation d'anti-RH1) qu'il est impératif de ne jamais transfuser un receveur RH : -1 avec du sang RH1. De même, l'injection de concentrés plaquettaires provenant de sujets RH1 peut stimuler l'apparition d'anti-RH1, en raison de leur contamination par de faibles quantités d'hématies. Enfin, dans certaines situations cliniques ou lors de la notion d'une allo immunisation vis à vis des antigènes RH, la prise en compte de l'ensemble du phénotype RH KEL1 lors de la sélection des unités à transfuser est obligatoire.

Les anticorps du système RH peuvent être impliqués dans le développement de maladies hémolytiques fœtale et du nouveau né. De tels anticorps, présents chez une femme en cours de grossesse, sont susceptibles de traverser le placenta et, si l'antigène correspondant est présent, de sensibiliser voire d'hémolyser les hématies fœtales puis néo natales. La prévention repose sur un respect strict du phénotype RH KEL1 lors de la transfusion de femme en période d'activité génitale et sur l'immuno-prophylaxie anti-RH1 chez les parturientes non immunisées vis à vis de l'antigène RH1 et ayant accouché d'un enfant porteur de l'antigène RH1 et dans d'autres circonstances (chapitre IFM).

Enfin les antigènes du système RH peuvent être la cible d'auto anticorps chauds développés par le patient contre ses propres antigènes RH (auto-anti-RH1, auto-anti-RH5, auto-anti-RH6). L'apparition de ces anticorps est responsable d'une sensibilisation in vivo des hématies pouvant aboutir à une hémolyse et donc à un tableau plus ou moins sévère d'anémie hémolytique auto immune.

■ VIII. GÉNÉTIQUE ET BIOCHIMIE

Dès 1943, Fischer, à partir de constatations sérologiques (réactions antithétiques entre anti-RH2 (C) et anti-RH4 (c) d'une part et entre anti-RH3 (E) et anti-RH5 (e) d'autre part) émet les hypothèses génétiques selon lesquelles le système RH comporte 3 couples d'allèles (D/d, C/c, E/e) situés sur 3 « loci » extrêmement liés et regroupés en 8 haplotypes différents transmis en bloc lors de la méiose.

Pour chacun de ces haplotypes et en fonction de la combinatoire allélique présente il établit une nomenclature spécifique dite en « R ». Ainsi à partir de constatations sérologiques (phénotypage) et en fonction des fréquences spécifiques de ces haplotypes, il propose de déduire le génotype probable (statistiquement le plus fréquent) et les génotypes possibles.

R1 :	DcE : 0.42
r :	dce : 0.38
R2 :	DcE 0.14
R0 :	Dce 0.02
r'' :	dcE 0.011
r' :	dCe 0.009
RZ :	DCE : 0.002
ry :	dCE

Exemple

Dénomination des phénotypes					
Réactions sérologiques					Terminologie du phénotype
Anti-RH1	Anti-RH2	Anti-RH3	Anti-RH4	Anti-RH5	
+	0	0	+	+	Génotype probable R ⁰ r Génotype possible : R ⁰ R ⁰

En fait les données de la biologie moléculaire ont démontré que le système RH comporte deux gènes liés RHD et RHCE présents sur le chromosome N° 1 qui contrôlent la synthèse des antigènes du système RH.

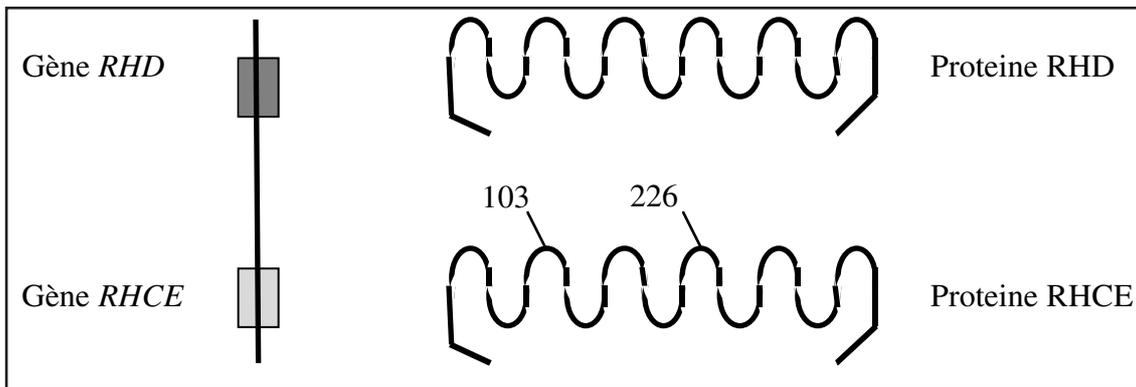
Le gène RHD code pour la protéine RHD et détermine la présence de l'antigène RH1 sur les hématies. Il est présent chez 85 % des sujets d'origine européenne qui sont dits RH1. Il est absent ou non fonctionnel chez 15 % des sujets dits RH : -1.

Le gène RHCE comporte, entre autres, quatre formes alléliques différentes qui déterminent, sur la protéine RHCE, la présence ou l'absence des antigènes concernés.

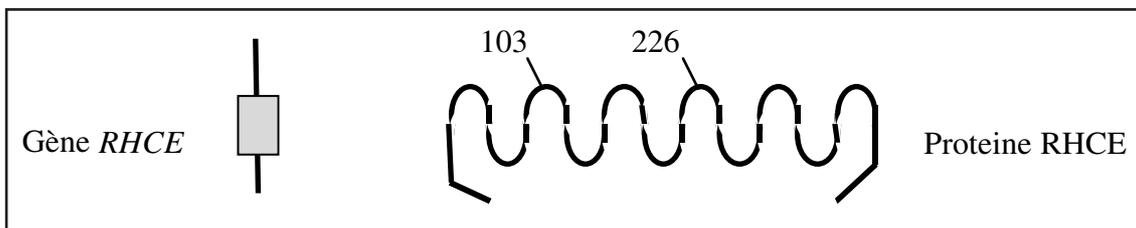
Gènes	Allèles	Antigènes présents sur la protéine CE
RHCE	RHCE	C (RH2) E (RH3)
RHCE	RHce	C (RH2) e (RH5)
RHCE	RHcE	c (RH4) E (RH3)
RHCE	RHce	c (RH4) e (RH5)

Les produits des deux gènes RHD et RHCE sont des protéines de 416 acides aminés qui traversent la membrane érythrocytaire à 12 reprises, laissant ainsi apparaître de courtes boucles sur la face externe.

- Sujet porteur des gènes RHD et RHCE



- Sujet porteur uniquement du gène RHCE



Les antigènes antithétiques codés par les différentes formes alléliques du gène RHCE ne diffèrent que par un seul acide aminé spécifique en position 103 et 226.

Antigènes	Acides aminés	Position
RH2	Sérine	103
RH4	Proline	103
RH3	Proline	226
RH5	Alanine	226

Ces antigènes, contrairement à d'autres antigènes protéiques de groupes sanguins, ne comportent aucune glycosylation. Ils sont détectés uniquement sur les hématies et absents de toutes autres cellules hématopoïétiques ou non.

D'un point de vue fonctionnel, les molécules RH semblent jouer un rôle de transporteur de cations et de maintien de l'intégrité membranaire. En effet les exceptionnels sujets « RH null » présentent des anomalies membranaires et une diminution de la durée de vie de leurs hématies dépourvues de tout antigène RH.

■ IX. TERMINOLOGIE DES GÉNOTYPES ET PHÉNOTYPES

Les humains étant des êtres diploïdes le génotype est caractérisé par la présence de couples d'allèles déterminant l'ensemble des antigènes correspondant présents chez chaque individu.

Du phénotype il n'est pas toujours possible de déduire le génotype. Cette détermination passe par la notion de génotype probable (statistiquement le plus fréquent) et de génotypes possibles. L'ordre décroissant de fréquence des huit haplotypes RH différents est le suivant : R¹ (DCe), r (dce), R² (DcE), R⁰ (Dce), r' (dCe), r'' (dcE), R^Z (DCE), r^v (dCE).

En terme de nomenclature, la dénomination en « R » de chacun de ces haplotypes a été abandonnée au profit d'un langage numérique défini à partir des réactions sérologiques obtenues avec chaque réactif utilisé.

La terminologie internationale repose sur cette terminologie numérique, qui est appliquée à l'ensemble des systèmes de groupes sanguins érythrocytaires.

En ce qui concerne le système RH la dénomination est la suivante :

Nom du système	Symbole du système	Terminologie Numérique système	Terminologie numérique antigènes				
			D	C	E	c	e
Rh	RH	004	001	002	003	004	005

Dénomination des antigènes		
Antigènes	Terminologie numérique complète	Terminologie numérique courante
D	004001	RH1
C	004002	RH2
E	004003	RH3
c	004004	RH4
e	004005	RH5

Dénomination des phénotypes					Terminologie du phénotype
Réactions sérologiques					
Anti-RH1	Anti-RH2	Anti-RH3	Anti-RH4	Anti-RH5	
+	0	0	+	+	RH : 1, -2, -3, 4,5

■ CONCLUSION

Le système RH demeure l'un des systèmes majeurs en terme d'implication clinique et notamment en contexte transfusionnel, obstétrical et auto-immun (anémie hémolytique auto immune).

Cette importance clinique est liée à la forte immunogénicité des antigènes qui le constituent ainsi qu'aux propriétés fonctionnelles de ses molécules au niveau de la membrane érythrocytaire.

Les modalités de son exploration (typage, détection titrage et dosage des anticorps) en contexte obstétrico-transfusionnel, le développement de l'immunoprophylaxie anti-RH1, l'application en routine des techniques de génotypage fœtal et les recommandations en terme de sélection de produits sanguins labiles (bonnes pratiques de distribution, recommandations ANAES) ont largement contribué à maîtriser le risque sanitaire lié à ce système.

En dépit d'avancées considérables réalisées au cours de ces dix dernières années en terme de compréhension des bases moléculaires du système RH, la fonction érythrocytaire réelle de ses molécules demeure toujours incertaine.

Bien que l'étendue de la diversité génétique de ce système ne soit accessible de manière précise que par des techniques de génotypages, les techniques sérologiques, compte tenu de leur praticabilité, sensibilité, spécificité et coût, demeurent toujours appropriées pour les applications cliniques.

LES ANTIGÈNES DE GRANDE FRÉQUENCE OU « ANTIGÈNES PUBLICS »

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Les antigènes de grande fréquence ou « antigènes publics » sont présents chez la grande majorité des individus.

Plusieurs de ces antigènes font partie intégrante de systèmes de groupes sanguins classiques : antigène H (système H, anciennement HhSese), antigènes GLOB 1 et GLOB 2 (anciennement P et Pk) (antigènes du « globoside » associés au système P1), antigène MNS5 (anciennement U) (système MNS), antigènes FY3 et FY5 (système FY), antigène JK3 (système JK), antigènes KEL2 (anciennement Cellano) et KEL4 (anciennement Kpb (système KEL)). Chacun d'entre eux correspond à un anticorps spécifique présent chez des individus exceptionnels dépourvus de l'antigène concerné et appelés « publics négatifs ». De même il convient d'en rapprocher des phénotypes particuliers, appelés phénotypes « null », caractérisés par l'absence totale d'antigènes spécifiques d'un système donné (RH null, KEL null...).

D'autres antigènes de grande fréquence, n'ayant pas acquis le statut de système ou n'ayant pas rejoint un système déjà répertorié, sont regroupés, par la Société Internationale de Transfusion Sanguine, dans une série nommée 901. Cette série comporte par exemple les antigènes Vel, Lan, JMH, Sid, Duclos, Anton, PEL, August, Cad. Parmi ces antigènes, celui dont l'impact clinique est le plus important est l'antigène Vel compte tenu du caractère hémolysant de son anticorps qui représente un risque majeur en transfusion sanguine.

Le danger des phénotypes « public négatif » est lié à la présence d'anticorps impliqués dans des accidents hémolytiques transfusionnels et dans des maladies hémolytiques fœtales ou néonatales. Ces anticorps « naturels » anti-H, anti-GLOB1 (anciennement anti-P), anti-GLOB1+2+P1 (anciennement anti-Tja) ou allo-immuns (les autres spécificités) sont, compte tenu de la fréquence des hématies ne possédant l'antigène correspondant, sources de blocage transfusionnel immédiat. Ces receveurs, considérés comme dangereux, doivent être dépistés et identifiés avec précision dans des laboratoires de référence, afin de sélectionner les unités de sang les plus compatibles. Le profil réactionnel classique obtenu lors de l'épreuve d'identification, est l'agglutination de l'ensemble des hématies courantes de la gamme d'hématies-tests avec une négativité du témoin autologue. Seules les hématies ne possédant pas l'antigène correspondant donne des réactions négatives. Par ailleurs, après la mise en évidence de tels phénotypes, il convient de dépister d'éventuels phénotypes identiques dans la fratrie du sujet et de sensibiliser ces personnes au don de sang pour qu'ils puissent, dans un souci d'anticipation, participer à la constitution de la banque nationale de sangs rares congelés en azote liquide.

LES ANTIGÈNES DE FAIBLE FRÉQUENCE OU « ANTIGÈNES PRIVÉS »

Ces antigènes, qui sont définis par un anticorps spécifique, ont une fréquence inférieure à 1 %. Certains de ces antigènes rares appartiennent à des systèmes de groupe sanguins déjà répertoriés : Far (MNS), KEL21 (anciennement Kpc (KEL), Wra DI3 dénommé anciennement Wra et appartenant désormais au système dénommé anciennement Diégo). D'autres, en attente de statut, sont répertoriés comme les antigènes de grande fréquence, dans une série nommée 700 (Swann, Bishop, Radin...). Ces antigènes peuvent susciter, après transfusion ou grossesse incompatibles, l'apparition d'anticorps correspondants dont certains ont été impliqués dans des maladies hémolytiques néonatales plus ou moins sévères (HJK, ELO). De même, des cas d'anticorps naturels ont été décrits. Fréquemment ces anticorps sont associés à d'autres spécificités au sein de mélanges complexes d'anticorps. En contexte d'incompatibilité fœto-maternelle, après la prise en compte de la compatibilité ABO, la confrontation des hématies du conjoint au sérum maternel ou à l'éluat néonatal est déterminante pour le diagnostic. En contexte transfusionnel l'épreuve directe de compatibilité au laboratoire permet, dans certains cas, la prévention d'un éventuel conflit.

SYSTÈME KEL ISBT 006 (anciennement Kell)

■ INTRODUCTION

Coombs découvre en 1946, un nouvel anticorps chez un sujet dont le nom fut donné au système : KEL (K, Kell). Trois ans plus tard Levine décrit l'anticorps antithétique : KEL2 (k, Cellano). Parmi les antigènes immunogènes de groupes sanguins, les antigènes KEL sont peut être les seconds derrière l'antigène RH1. Le système KEL est important non seulement en transfusion mais aussi en obstétrique puisque l'antigène KEL1 est développé très tôt chez le fœtus au niveau des cellules érythroïdes et qu'une incompatibilité foeto-maternelle par allo-immunisation anti-KEL1 peut conduire à une maladie hémolytique néo-natale avec mort in utero.

■ I. LES ANTIGÈNES

Le système KEL est caractérisé par sa complexité : 25 antigènes ont été identifiés dont 10 forment 5 couples d'antigènes antithétiques : KEL1 et KEL2, KEL3 et KEL4, KEL6 et KEL7, KEL17 et KEL11, KEL14 et KEL24.

I.1- Les antigènes KEL1 et KEL2

Les deux antigènes principaux et antithétiques sont KEL1 et KEL2.

Les 3 phénotypes essentiels sont KEL : -1, 2, KEL : 1, 2 et KEL :1, -2.

La fréquence du phénotype KEL1 est de 9 % en France, elle est 2 fois moindre en Finlande et d'environ 2,5 % chez les Noirs.

Réactions		Phénotype	Génotype	Fréquence
anti-KEL1	anti-KEL2			
+	+	KEL :1, 2	KEL1KEL2	8,8 %
+	-	KEL :1,-2	KEL1KEL1	0,2 %
-	+	KEL :-1, 2	KEL2KEL2	91 %

I.2- Les autres antigènes KEL : KEL3 (Kpa), KEL4 (Kpb) ET KEL21 (Kpc, Levay), KEL6 (Jsa) ET KEL7 (Jsb), KEL10 (Ula), KEL17 (Weak) ET KEL11 (Côté), KEL14 et KEL24

Les différents antigènes, à l'exception de KEL10 forment 4 couples d'antigènes antithétiques.

KEL3 est présent chez 2,5 % des Caucasiens mais absent chez les Noirs et les Orientaux. Ces 2 antigènes ont une faible fréquence. Par contre KEL4 est un antigène de très grande fréquence. Les individus homozygotes KEL3KEL3 ou KEL21KEL21 sont KEL : -2. KEL21 a été observé presque exclusivement chez les Orientaux.

KEL6 est un marqueur spécifique des Noirs avec une fréquence d'environ 15 % et KEL7 est l'antigène antithétique de grande fréquence.

KEL10 a été découvert en 1968 chez les Finlandais avec une fréquence de 2,6 %. Ce marqueur est présent aussi chez les Suédois, les Chinois et les Japonais. Il est bien développé chez le nouveau-né. L'antigène antithétique n'a encore jamais été observé.

KEL17 et KEL24 sont des antigènes rares et leur antigène antithétique fréquent sont respectivement KEL11 et KEL14.

I.3- Le phénotype silencieux et l'antigène KEL5 (Ku)

Le phénotype silencieux : KEL nul ou Ko découvert en 1957 est caractérisé par :

- l'absence de l'ensemble des antigènes du système KEL,
- la présence d'un antigène particulier XK1 (Kx).

La transmission de ce phénotype est récessive. Par transfusion ou grossesse, les Ko développent un anti-KEL5 (anti-« KEL-total », anti-K^u) qui réagit avec tous les antigènes KEL connus.

I.4- Les phénotypes KEL MOD

Il existe plusieurs types de phénotype KEL mod qui sont caractérisés par une expression extrêmement déprimée des antigènes KEL. Ces derniers sont démontrables parfois uniquement par fixation-élution. Certains individus sont considérés comme étant de phénotype Ko et expriment un puissant antigène XK1.

Il y a une relation inverse entre l'expression des antigènes KEL et celle de l'antigène XK1. Par transfusion, les patients peuvent développer un anticorps ressemblant à l'anti-KEL5. Ces phénotypes diffèrent les uns des autres.

I.5- Les autres antigènes KEL : KEL12, KEL13, KEL16, KEL18, KEL19 et KEL22

De rares individus de phénotype classique KEL : -1, 2, -3, 4 peuvent produire un allo-anticorps qui reconnaît toutes les hématies sauf les leurs ainsi que celles des Ko. L'ensemble de ces individus possèdent la glycoprotéine KEL.

I.6- L'antigène KEL23

L'antigène KEL 23 est un antigène rare du système KEL qui a été découvert en 1987.

I.7- Particularités des antigènes

Les antigènes KEL sont strictement érythrocytaires et bien développés à la naissance. Ils ont pu être mis en évidence dès la 6^e semaine d'aménorrhée. L'antigène KEL1 est le plus immunogène. D'après Giblett environ 5 % des sujets KEL : -1 transfusés avec une seule unité globulaire KEL1 développent un anti-KEL1 de type IgG.

Le nombre de sites KEL1 par hématie d'expression hétérozygote KEL : 1, 2 varie entre 2 300 et 6 000. Celui des sites KEL2 par hématie d'expression homozygote et hétérozygote KEL2 varie entre 2 000 et 5 000.

L'action des enzymes protéolytiques sur les antigènes KEL est variable mais aucune enzyme n'altère les antigènes KEL. Cependant la réaction préférentielle de mise en évidence des anticorps est le test indirect à l'antiglobuline en basse force ionique.

Le traitement des hématies normales par du bromide d'aminoéthylisothioronium (AET) n'altère pas l'antigène XK1, mais détruit totalement les antigènes du système KEL, comme si les hématies étaient de phénotype Ko. Il en est de même avec le dithiothreitol (DTT) qui détruit les ponts disulfures nécessaires à l'expression des antigènes du système KEL.

■ II. LES ANTICORPS ANTI-KEL

Ce sont essentiellement des anticorps immuns IgG. Ils sont décelables par test indirect à l'antiglobuline. L'anti-KEL1 est l'anticorps le plus fréquent et le plus souvent de nature IgG1. Cet anticorps peut entraîner des accidents hémolytiques de transfusion très sévères ainsi que des maladies hémolytiques avec mort in utero lorsque le titre excède 1/16^e.

Des anti-KEL1 de nature IgM ont été décrits en dehors de tout contexte transfusionnel ou obstétrical. Ils ont été stimulés par des virus, ou des bactéries : *Escherichia coli* 0 125 : B15, *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecalis*...

L'anti-KEL2 est peu fréquent. La rareté de cet anticorps est en partie due au fait que seulement 0,2 % des individus sont KEL : -2. Il peut être stimulé par transfusion et moins fréquemment par grossesse. Il est le plus souvent de nature IgG et peut entraîner des accidents hémolytiques de transfusion et des incompatibilités fœto-maternelles gravissimes.

Les anti-KEL4 et anti-KEL7 sont rares et d'origine immune. Les anti-KEL6 ne sont pas rares et peuvent, comme les anti-KEL4 et anti-KEL6, entraîner des accidents hémolytiques de transfusion et des maladies hémolytiques néo-natales.

L'anti-KEL3 est peu fréquent, il peut être d'origine immune mais il est le plus souvent naturel.

■ III. LE PHÉNOTYPE MAC LEOD ET LE SYSTÈME XK

III.1- Le phénotype Mac Leod

Découvert en 1961 par Allen, ce phénotype est caractérisé par un affaiblissement sévère de l'expression des antigènes du système KEL, l'absence d'antigène XK1 et une acanthocytose des érythrocytes.

Les cas recensés sont :

- KEL : -1, 2w, -3, 4w, -, 6, 7w ;
- de sexe masculin.

Ce phénotype particulier est lié au chromosome X et n'est pas contrôlé par le locus KEL. Certains sujets Mac Leod sont par ailleurs atteints de granulomatose septique (GS), elle-même liée au chromosome X, et/ou de myopathie de Duchenne. Cette association reflète le fait que ces gènes sont contigus sur le bras court du chromosome X. Le produit du gène Mac Leod n'est pas connu, mais il pourrait coder une protéine de membrane érythrocytaire portant l'antigène XK1. La protéine XK n'est pas glycosylée, mais elle est associée dans la membrane des globules rouges à la glycoprotéine KEL par l'intermédiaire d'un ou deux ponts disulfures, ce qui pourrait masquer la réactivité antigénique XK1. Ces patients peuvent par transfusion incompatible développer un anticorps anti-public.

III.2- Le système XK

III.2.1- L'antigène XK1 et l'anti-XK1

L'anti-public des Mac Leod immunisés ayant une granulomatose septique est appelé anti-KEL9 (anti-KL). Il contient 2 activités séparables : anti-KEL20 (anti-Km) + anti-XK1. L'anti-KEL20 reconnaît toutes les hématies sauf celles des Ko et Mac Leod. L'anti-XK1 reconnaît toutes les hématies surtout les Ko mais ne reconnaît pas les Mac Leod. Les sujets Mac Leod sont dépourvus de l'antigène XK1 sur lequel se fixeraient les antigènes du système KEL.

III.2.2- Le syndrome Mac Leod

Les hématies des sujets Mac Leod présentent des anomalies morphologiques : anisocytose et **acanthocytose**. Les sujets Mac Leod sont tous atteints d'une anémie hémolytique en général bien compensée avec diminution de l'haptoglobine, réticulocytose, moelle osseuse hyperplasique et splénomégalie. Les hématies Mac Leod manquent des antigènes XK1 et KEL20 et expriment faiblement les antigènes KEL.

Les hématies Ko manquent de l'antigène KEL20 et de l'ensemble des antigènes du système KEL mais elles expriment fortement l'antigène XK1. Elles ont une morphologie normale et les sujets Ko ne montrent aucun signe clinique ou hématologique d'hémolyse in vivo.

Ainsi, il apparaît que les anomalies des Mac Leod seraient dues à l'absence d'une protéine érythrocytaire XK ayant une importance biologique et dont la transmission est contrôlée par un gène situé sur le chromosome X.

	Phénotype KEL	Globules rouges	
		Morphologie	Antigène Kx
Sujets normaux	commun	N	(+)
	Ko	N	+++
	M. Leod	aN	-
Malades atteints de : - G.S. de type 1 - G.S. de type 2	commun	N	(+)
	M. Leod	aN	-

Antigène XK1, phénotype KEL et morphologie des hématies

■ IV. BIOCHIMIE ET GÉNÉTIQUE

La protéine KEL est une glycoprotéine de 93 kDa comportant 731 AA. et des ponts disulfures, sur laquelle s'accroche les différents antigènes KEL. Ceux-ci sont donc détruits par les agents coupant les ponts disulfures comme l'AET et le DTT.

Il existerait une relation entre l'expression des antigènes KEL et XK1 :

- ↘ les érythrocytes Ko (KEL nul) sont dépourvus de la protéine KEL et possèdent beaucoup d'antigène XK1,
- ↘ les antigènes KEL sont très faiblement exprimés chez certains individus appelés KEL mod qui expriment aussi beaucoup d'antigène XK1,
- ↘ enfin le phénotype Mac Leod est caractérisé par l'absence de l'antigène XK1 et la diminution de l'expression des antigènes KEL.

De ce fait, on considère que XK pourrait être une protéine localisée au voisinage de la protéine KEL.

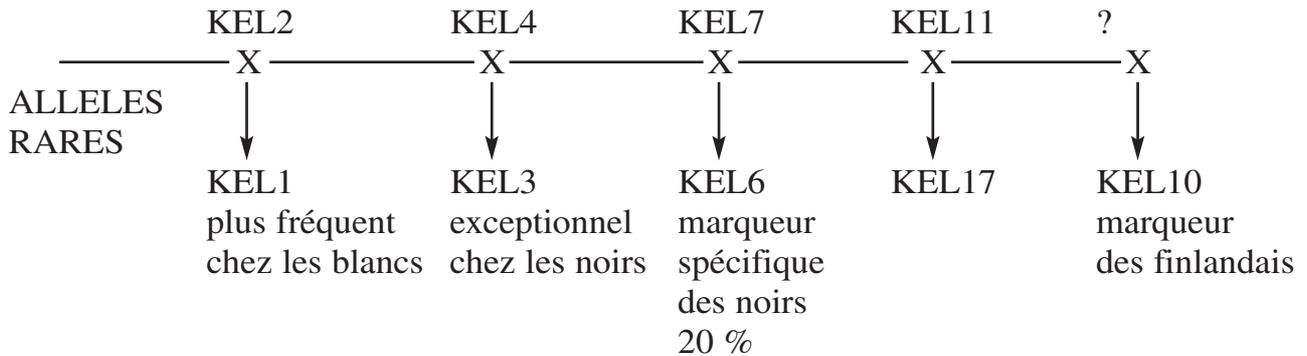
Le gène KEL, situé sur le chromosome 7 est composé de 19 exons et l'ensemble des antigènes KEL résulte de mutations portant sur un seul nucléotide au niveau d'un des exons. Les spécificités KEL1 et KEL2 par exemple résultent d'un polymorphisme Méth → Thr en position 193

Il y a au locus KEL, toute une série d'allèles et de pseudo-allèles. KEL1 et KEL2, KEL3, KEL4 et KEL 21, KEL6 et KEL7, KEL10 dont le partenaire n'a pas encore été identifié, KEL17 et KEL11, KEL14 et KEL24 sont des allèles. Les gènes du système KEL sont étroitement liés et se transmettent en bloc lors de la méiose. Par exemple, un sujet de génotype KEL : 1, 4,7 / KEL : 2, 3, 7 transmettra toujours KEL1 avec KEL4 et KEL7 ou KEL2 avec KEL3 et KEL7.

KEL1 et KEL3 sont des pseudo-allèles et jusqu'à présent l'existence de crossing-over où KEL1 et KEL3 seraient transmis ensemble n'a pas encore été observée. De même KEL1 et KEL6, KEL1 et KEL10, KEL3 et KEL6 sont des pseudo-allèles.

L'haplotype le plus répandu est : KEL : 2,4,7,11. Ce serait l'haplotype originel et à partir de lui sont apparus des mutants qui codent pour un seul antigène rare à la fois. Donc un individu de phénotype KEL : 1,2,3,4 est obligatoirement de génotype KEL : 1, 4/KEL : 2, 3. De même, il n'existe pas de sujets KEL : 1,2,3,-4.

Haplotype originel



L'haplotype nul

Les sujets Ko n'expriment aucun antigène KEL, ils ont reçu 2 haplotypes KEL silencieux.

BIBLIOGRAPHIE

1. CUTBUSH M., MOLLISON P.L., PARKIN D.M. A new human blood group. *Nature*. 1950, 165, 188-189.
2. DANIELS G. *Human Blood Groups*. Blackwell Science. 1995.
3. ISSITT P., ANSTEE D. *Applied Blood Group Serology*. 4th ed. 1998. Montgomery Scientific Publications.
4. MOLLISON P.L., ENGELFRIET C.P., Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 9th ed. 1993. Blackwell Scientific Publications.
5. CARTRON J.P., ROUGER Ph. *Bases moléculaires des antigènes de groupes sanguins*. 1997, Ed. Masson.
6. GOUDEMAM M., SALMON Ch. *Immuno-hématologie et immunogénétique*. 1980, Flammarion Médecine-Sciences.
7. RACE R.R., SANGER R. *Blood Groups in an*. 6th ed. Oxford . Blackwell Scientific Publications, 1975.

SYSTÈME FY ISBT 008 (anciennement Duffy)

■ INTRODUCTION

En 1950 Cutbush découvre un nouvel anticorps chez un hémophile polytransfusé dont le nom fut donné au système. L'année suivante Ikin décrit l'anticorps antithétique dans le sérum d'une Berlinoise. Chez les Caucasiens, ces deux anticorps anti-FY1 (anti-Fya) et anti-FY2 ((anti-Fyb) définissent trois phénotypes FY : 1, 2, FY : -1, 2 et FY : 1, -2 correspondant aux génotypes FY1FY2, FY2FY2 et FY1FY1 respectivement.

Ce système est important en pathologie humaine car l'antigène FY1, très immunogène peut être responsable d'accident hémolytique de transfusion gravissime et d'incompatibilité foëto-maternelle.

En 1955 Sanger constate que le phénotype FY : -1, -2 est très fréquent chez les Noirs et qu'il correspondrait au génotype FYFY, FY étant un allèle silencieux aux gènes FY1 et FY2. On sait désormais que le gène FY est un mutant du gène FY2 capable de coder pour la production de la glycoprotéine FY dans les cellules des tissus mais pas au niveau de la lignée érythroïde.

Le phénotype FY : -1, -2 a été aussi observé, bien que rarement, chez les Caucasiens mais il correspond à un déterminisme génétique différent du phénotype FY : -1, -2 des Noirs.

■ I. LES ANTIGÈNES FY

Le système comporte à ce jour 5 antigènes.

I.1- Les antigènes principaux FY1 et FY2

Les deux antigènes principaux et antithétiques sont FY1 et FY2. Ils permettent de définir 3 phénotypes essentiels : FY : 1, 2 ; FY : -1, 2 et FY : 1, -2. Des variants FY2 faibles ont été décrits.

Chez les Asiatiques, l'antigène FY1 est un antigène public.

Réactions		Phénotype	Génotype probable	Fréquence
Anti-FY1	Anti-FY2			
+	+	FY : 1, 2	FY1FY2	48 %
-	+	FY : -1, 2	FY2FY2	37 %
+	-	FY : 1, -2	FY1FY1	15 %

Fréquence des phénotypes FY chez les Caucasiens

I.2- Les phénotypes « silencieux »

Un 4^e phénotype est très fréquent chez les Noirs et exceptionnel en dehors de la race noire : le phénotype FY : -1, -2. Il proviendrait de la transmission en double dose de 2 gènes FY « silencieux ». De ce fait, la fréquence des 3 autres phénotypes est différente de celle des Caucasiens.

Réactions		Phénotype	Génotype probable	Fréquence
Anti-FY1	Anti-FY2			
-	-	FY : -1, -2	FYFY	70 %
+	-	FY : 1, -2	FY1FY	10 %
-	+	FY : -1, 2	FY2FY	20 %
+	+	FY : 1, 2	FY1FY2	exceptionnel

Fréquence des phénotypes FY chez les Noirs américains

I.3- Les autres antigènes : FYX, FY3, FY4, FY5 et FY6

L'antigène FYX : un variant de l'antigène FY2. Le gène FYX est un variant de FY2. Il n'y a pas d'anticorps spécifique anti-FYX. L'antigène FYX est défini par une réaction faible avec les anti-FY2.

L'antigène FY3 est un antigène public présent chez tous les individus quel que soit leur phénotype FY sauf les FY : -1, -2. Il est défini par l'anti-FY3 (qui n'est pas un mélange d'anti-FY1 et d'anti-FY2) qu'élaborent les rares individus caucasiens FY : -1, -2.

L'antigène FY4 avait été défini comme étant le produit du gène FY « silencieux » des Noirs. Ceci est controversé désormais, d'autant qu'un seul exemple d'anti-FY4 a été décrit.

L'antigène FY5 a été décrit comme étant reconnu par un anticorps, élaboré par des sujets de race noire de phénotype FY : -1, -2, qui ressemble à l'anti-FY3, mais qui a un comportement différent vis-à-vis des hématies en délétion RH partielle ou totale. Les résultats obtenus avec l'anti-FY5 sont probablement erronés. Comme l'antigène FY4, FY5 n'est pas codé par le locus FY.

L'antigène FY6, découvert par un anticorps monoclonal, est présent sur tous les érythrocytes de phénotype FY commun mais pas ceux de phénotype FY : -1, -2. Cet anticorps définit un nouvel antigène FY appelé FY6 : il a permis la caractérisation du complexe FY.

I.4- Les particularités des antigènes

La glycoprotéine qui porte les antigènes FY est présente au niveau des tissus. Les antigènes sont bien développés à la naissance et ont pu être mis en évidence dès la 6^e semaine d'aménorrhée. L'antigène FY1 est le plus immunogène.

Le nombre de sites par hématie d'expression homozygote FY : 1, -2 et FY : -1, 2 a été estimé à 13 000 et 14 000 respectivement. **Il est de moitié à la surface des hématies d'expression hétérozygote.**

Les antigènes FY1 et FY2 sont des polypeptides altérables par l'ensemble des enzymes protéolytiques : chymotrypsine, pronase, ficine, broméline et en particulier la papaïne qui

les détruit totalement. La seule enzyme n'entraînant aucune altération de l'antigène FY1 est la trypsine pure dénuée de toute trace de chymotrypsine, par contre l'antigène FY2 est modifié.

Enfin, Williams a observé la perte progressive des antigènes FY1, FY2 et FY3 au cours de la conservation des hématies dans une solution de faible pH ou de basse force ionique.

■ II. LES ANTICORPS ANTI-FY

L'anti-FY1 est un anticorps, fréquent chez les Blancs et rare chez les Noirs (environ 3 % des anticorps immuns isolés). Chez les asiatiques, la présence d'un anti-FY1 pose d'énormes problèmes transfusionnels de type anti-public. L'anti-FY1 est de nature IgG et appartient très souvent à la sous-classe des IgG1.

L'anti-FY2 est plus rare et souvent associé à d'autres anticorps.

La technique préférentielle de mise en évidence des anticorps anti-FY est le test indirect à l'antiglobuline vis à vis d'hématies en solution saline 0,15M ou en milieu de basse force ionique. En effet les protéases détruisent les antigènes FY1 et FY2.

Les anti-FY1 et anti-FY2 peuvent entraîner des accidents hémolytiques immédiats et gravissimes de transfusion.

L'anti-FY1 peut provoquer des incompatibilités fœto-maternelles nécessitant un traitement transfusionnel in utero ou à la naissance. Par contre l'anti-FY2 est rarement impliqué.

■ III. LA BIOCHIMIE ET LA GÉNÉTIQUE

La glycoprotéine exprimant les antigènes FY a été purifiée grâce à l'anticorps monoclonal anti-FY6. Le gène FY (appelé aussi DARC pour Duffy Antigen Receptor of Chemokines), situé sur le chromosome 1, code pour une protéine composée de 338 acides aminés et possédant un PM apparent de 36-45 kDa. Les spécificités FY1/2 résultent d'un polymorphisme Gly → Asp en position 44 du fragment N-terminal extracellulaire protéase-sensible (sauf à la trypsine) de la protéine.

Les études réalisées à partir des individus possédant le gène FYX ont permis de postuler que les 3 gènes FY2, FYX et FY étaient identiques au niveau de leur région codante. Cependant la mutation que le gène FY a subi, confère à ce dernier la possibilité de coder pour la glycoprotéine FY seulement au niveau des cellules tissulaires. La présence de la glycoprotéine FY au niveau des tissus explique pourquoi les Noirs FY : -1, -2 ne développent pas d'anticorps anti-FY. Ceux ayant développé un anti-FY seraient de même déterminisme génétique que les non Noirs c'est-à-dire qu'ils auraient reçu des gènes FY totalement silencieux.

■ IV. LA FONCTION DES ANTIGÈNES FY

Les antigènes FY présentent un double intérêt biologique. Leur forme érythrocytaire constitue les récepteurs, *in vivo* ou *in vitro*, pour les mérozoïtes de *Plasmodium vivax* et *Pl. knowlesi*, agents responsables de différentes formes de malaria chez l'homme et chez le singe respectivement. Ce sont également des récepteurs pour une famille de polypeptides chimiotactiques (IL 8) leur conférant ainsi un rôle régulateur dans la réponse inflammatoire.

BIBLIOGRAPHIE

1. CUTBUSH M., MOLLISON P.L., PARKIN D.M. A new human blood group. *Nature*. 1950, 165, 188-189.
2. DANIELS G. *Human Blood Groups*. Blackwell Science. 1995.
3. ISSITT P., ANSTEE D. *Applied Blood Group Serology*. 4th ed. 1998. Montgomery Scientific Publications.
4. MOLLISON P.L., ENGELFRIET C.P., CONTRERAS M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 9th ed. 1993. Blackwell Scientific Publications.
5. CARTRON J.P., ROUGER Ph. *Bases moléculaires des antigènes de groupes sanguins*. 1997, Ed. Masson.
6. GOUDEMAM M., SALMON Ch. *Immuno-hématologie et immunogénétique*. 1980, Flammarion Médecine-Sciences.
7. RACE R.R., SANGER R. *Blood Groups in an*. 6th ed. Oxford . Blackwell Scientific Publications, 1975.
8. MANNESSIER L., HABIBI B., SALMON Ch. Un nouvel exemple anti-FY3 comportant une réactivité pseudo anti-Fya. *Rev. Fr. Transf. et Immuno-Hém.*, 1979, XXII, 2, 195-197.
9. MILLER L.H., MASON S.J., DVORAK J.A., SHIROISHI R., MCGINNIS M.H. Erythrocytic receptor for malarial merozoïtes and the Duffy blood group system. In *Human Blood Group Groups*, 57^{me} Int. Convoc. Immunol. Buffalo, 1977, Karger, éd., p. 394.
10. SALMON CH., CARTRON J.P., ROUGER Ph. *Les groupes sanguins chez l'homme*. 2^e éd. Masson, 1991.

SYSTÈME JK ISBT 009 (anciennement Kidd)

■ INTRODUCTION

En 1951 Allen découvre un nouvel anticorps chez une femme, à la suite d'une incompatibilité fœto-maternelle. Deux ans plus tard, Plaut décrit l'anticorps antithétique. Ces deux anticorps anti-JK1 (anti-Jka) et anti-JK2 (anti-Jkb) définissent trois phénotypes JK : 1, 2, JK : -1, 2 et JK : 1, -2 représentant les génotypes JK1JK2, JK2JK2 et JK1JK1 respectivement. En 1959 Pinkerton décrit le phénotype silencieux JK : -1, -2 correspondant au génotype JKJK.

■ I. LES ANTIGÈNES

I.1- Les antigènes JK1 et JK2

JK1 et JK2 sont les deux antigènes principaux du système. Ils sont strictement érythrocytaires et bien développés à la naissance. Ils ont pu être mis en évidence respectivement dès les 7^e et 6^e semaines d'aménorrhée. L'antigène JK1 est l'antigène le plus immunogène.

Réactions		Phénotype	Génotype	Fréquence en France
Anti-JK1	Anti-JK2			
+	+	JK :1, 2	JK1JK2	50 %
+	-	JK :1, -2	JK1JK1	28 %
-	+	JK :-1, 2	JK2JK2	22 %

L'antigène JK1 est présent chez 95 % des Noirs, 77 % des Blancs et 50 % des Chinois.

Il existe des antigènes affaiblis détectés uniquement par certains réactifs.

Le nombre de sites antigéniques JK1 serait de $11\,300 \pm 3\,100$ par érythrocyte JK :1, -2 et 1100 ± 370 par érythrocyte JK :1, 2.

Les antigènes JK1 et JK2 résistent à la plupart des protéases.

I.2- Les phénotypes JK : -1-2 (Jk (a-b-))

I.2.1- récessif

Le premier exemple de phénotype JK : -1, -2 a été découvert chez une femme originaire des Philippines, ayant présenté une réaction retardée après une transfusion. Ce phénotype exceptionnel est observé aux Philippines, aux Iles Hawaï, en Thaïlande, en Polynésie et chez les indiens du Mato-Grosso. Chez les polynésiens, l'incidence de ce phénotype est d'environ 0,9 %. Le phénotype JK : -1, -2 est de manière frappante absent dans la population caucasienne, cependant quelques cas ont été décrits dans des familles françaises (Habibi, Mannessier), australienne (Klarkowski) et finlandaises (Sistonen). La plupart des sujets JK : -1, -2 semblent résulter de l'homozygotie d'un allèle récessif silencieux JK au locus Kidd.

I.2.2- dominant

Un second mécanisme a été découvert en 1986 par Okubo : l'étude de 2 familles japonaises a fait émettre un parallélisme avec les sujets LU : -1, -2 (Lu (a-b-)) dominant et l'inhibiteur In (LU) ; dans ces 2 familles, les antigènes JK3, JK1 et JK2 sont mis en évidence par fixation-élution. Le gène dominant fut appelé In (JK).

I.3- L'antigène JK3 et l'anticorps anti-JK3

L'antigène JK3 défini par l'anticorps des JK : -1, -2 immunisés par transfusion ou grossesse incompatible est présent sur toutes les hématies quel que soit leur phénotype JK sauf les JK : -1, -2. L'anti-JK3 n'est pas un mélange d'anti-JK1 et d'anti-JK2. Il est responsable d'accident hémolytique de transfusion et de maladie hémolytique néonatale généralement bénins.

■ II. LES ANTICORPS

L'anti-JK1, presque toujours de nature IgG, est l'anticorps le plus fréquent, il est dit « perfide et dangereux ». Cet anticorps est responsable d'accident hémolytique sévère de transfusion et de maladie hémolytique néonatale. L'anti-JK2, plus rare et souvent associé à d'autres anticorps, est lui aussi capable de différencier les hématies d'expression homozygote des hématies d'expression hétérozygote.

La détection et l'identification des anti-JK sont très délicates et difficiles. En effet, il n'est pas rare que ces anticorps ne reconnaissent pas toutes les hématies d'expression homozygote JK : 1, -2 et soient parfaitement incapables d'agglutiner toutes les hématies d'expression hétérozygote. La sous classe des anti-JK est à prédominance IgG3.

L'anti-JK3 est exceptionnel et peut être naturel.

Les auto anti-JK1 sont peu fréquents et sont souvent associés à la prise de médicament (méthyl-dopa).

■ III. LA BIOCHIMIE ET LA GÉNÉTIQUE

La faible réactivité sérologique observée dans la plupart des sérums anti-JK1 a initialement été attribuée à un faible nombre de sites antigéniques à la surface de la membrane érythrocytaire. Or Masouredis a montré que la densité en sites JK1 et JK2 était comparable à celle des systèmes KEL et FY : la faible réactivité des anti-JK1 serait donc due à un autre facteur que le nombre de sites.

La molécule portant les antigènes JK est une glycoprotéine de 46-60 kDa ne contenant pas de ponts disulfures et qui est absente chez les JK : -1, -2.

L'étude des hématies de phénotype JK : -1, -2 a montré qu'elles étaient beaucoup plus résistantes à la lyse en présence d'urée que celles de phénotype JK : 1, 2, JK : -1, 2 et JK : 1, -2. Cette constatation suggère que la molécule exprimant les antigènes JK est un transporteur d'urée.

Le gène JK est situé sur le chromosome 18. You a montré que le transporteur d'urée des érythrocytes humains est le produit direct du gène de groupe sanguin JK. Les spécificités JK1/2 résultent d'un polymorphisme Asp → Asn en position 280 du transporteur d'urée HUT 11.

SYSTÈME MNS ISBT 002 (anciennement MNSs)

Le système MNSs est le deuxième système de groupe sanguin découvert par Landsteiner et Levine à l'aide d'hétéro-anticorps. Il comporte de très nombreux antigènes dont les plus importants sont abordés : MNS1, MNS2, MNS3 et MNS4.

■ I. LES QUATRE ANTIGÈNES : MNS1, MNS2, MNS3 ET MNS4

Les antigènes MNS1 (M) et MNS2 (N) sont des produits antithétiques d'allèles codominants, ils sont détectés à l'aide d'hétéro-anticorps de lapin le plus souvent. Les hématies MNS :1, -2 sont faiblement reconnues par les anti-MNS2 car elles possèdent une activité « N-like ».

Les antigènes MNS3 (S) et MNS4 (s) sont aussi des produits antithétiques d'allèles codominants, ils sont détectés par des allo-anticorps d'origine humaine.

Le système MNS est donc constitué de deux paires de pseudo-allèles qui se groupent pour former quatre haplotypes : MS, Ms, NS et Ns qui se transmettent en bloc lors de la méiose. Néanmoins, des crossing-over peuvent survenir. L'association deux par deux de ces quatre haplotypes déterminent dix génotypes correspondant à neuf phénotypes.

Phénotype	Réactions avec				Génotype	% en France
	Anti-M	Anti-N	Anti-S	Anti-s		
MS	+	((+))	+	-	MS/MS	7.30 %
MSs	+	((+))	+	+	MS/Ms	16.25 %
Ms	+	((+))	-	+	Ms/Ms	9.04 %
MNS	+	+	+	-	Ms/NS	4.04 %
MNSs	+	+	+	+	MS/Ns ou Ms/NS	19.15 % 4.5 %
MNs	+	+	-	+	Ms/Ns	21.31 %
NS	-	+	+	-	NS/NS	0.56 %
NSs	-	+	+	+	NS/Ns	5.29 %
Ns	-	+	-	+	Ns/Ns	12.56 %

Fréquence des phénotypes et génotypes MNSs

■ II. LES ANTICORPS

II.1- Les anti-MNS1 et anti-MNS2

II.1.1- Les anticorps pour le phénotypage

Les anticorps habituellement utilisés pour le phénotypage sont des hétéro-anticorps ou des anticorps monoclonaux qui montrent un effet de dose.

II.1.2- Les allo-anticorps naturels

Il existe des anticorps humains, anti-MNS1 surtout, qui sont la plupart naturels, froids et ne fixant pas le complément. Les anti-MNS1 sont très fréquents chez les enfants présentant une infection bactérienne aiguë. Les particularités de ces anticorps suggèrent qu'ils sont de nature IgM. Ces anticorps sont rarement responsables de M.H.N.N. en particulier l'anti-MNS2. Il a été cependant décrit quelques cas sévères dus aux anti-MNS1 avec mort in utero.

II.2- L'anti-MNS3 et l'anti-MNS4

Ces anticorps exclusivement humains, essentiellement de nature IgG et ne fixant pas le complément ont une signification clinique plus importante que les anti-MNS1 et anti-MNS2. Ils peuvent être responsables d'accident hémolytique sévère de transfusion et de maladie hémolytique néonatale.

II.3- L'anti-MNS5 (anti-U) et l'antigène MNS5

Il existe de rares sujets, exclusivement de race noire, qui sont MNS : -3, -4, -5. Ils peuvent par transfusion ou grossesse incompatible développer un anti-MNS5.

■ III. LA BIOCHIMIE

Il s'agit de polypeptides dont la séquence d'acides aminés est déterminée. Les études ont permis de montrer que les antigènes MNS1 et MNS2 sont portés par une structure et les antigènes MNS3 et MNS4 par une autre. Ces deux structures sont des sialoglycoprotéines (SGP). La SGP MN ou glycophorine A porte les antigènes MNS1 et MNS2. Les seules différences entre les SGP des sujets MNS : 1, -2 et MNS : -1, 2 portent sur 2 A.A. en position 1 et 5 de la partie N terminale. Ceci illustre la fonction des deux gènes induisant la synthèse des antigènes MNS1 et MNS2 :

	1	2	3	4	5
MM	Ser	Ser	Thr	Thr	Gly
NN	Leu	Ser	Thr	Thr	Glu

La SGP Ss ou glycophorine B porte les antigènes MNS3 et MNS4.

La seule différence entre les SGP des sujets MNS : 3, -4 et MNS : -3, 4 porte sur un AA en position 29 qui est une méthionine pour S et une thréonine pour s.

BIBLIOGRAPHIE

1. LANDSTEINER K, LEVINE P. A new agglunable factor differentiating individual human bloods. Proc. Soc. Exp. Biol NY. 1927, 24, 600-602.
2. SANGER R., RACE RR, WALSCH RJ, MONTGOMERY C. An antibody which subdivides the human MN blood groups. Heredity. 1948, 2, 131-139.
3. LEVINE P., KUHMICHEL AB, WIGOD M., KOCH E. A new blood factor s, allèle to S. Proc. Soc. Exp. Biol. NY. 1951, 78, 218-220.
4. HUANG CH, BLUMENFELD OO, MNSs blood groups and major glycoporphins : molecular basis for allelic variation. In : Cartron J.P., Rouger Ph. Eds Blood Cell Biochemistry, vol. 6. NY : Plenum Press, 1995, 153-188.
5. DAHR W, BEYREUTHER K, STEINBACH H, GIELEN W AND KRUGER J. Structure of the Ss blood group antigens. Hoppe-Seyler's. Physiol Chem Bd. 1980, 361, 895-906.
6. HUANG CH, JOHE KK, SEIFTER S AND BLUMENFELD OO. Biochemistry and molecular biology of MNSs blood group antigens. Baillere's Clin Haemat. 1991, 4, 821-848.

SYSTÈME XG ISBT 012 (anciennement Xg) LIÉ AU SEXE

I. GÉNÉRALITÉS

L'antigène XG1 (anciennement Xga) est un antigène produit par le chromosome X. Il montre une relation avec le sexe dès que l'on examine les fréquences des phénotypes chez l'homme et chez la femme.

La transmission génétique est celle d'un caractère dominant lié au sexe et porté par le chromosome X (à la différence de l'hémophilie qui est un caractère récessif lié au sexe) ; mais la fréquence génique est la même chez l'homme et chez la femme.

Le locus XG ne participe pas à l'inactivation de l'X.

XG1 est présent dans d'autres cellules que le globule rouge.

L'anticorps anti-XG1 est exceptionnel.

II. FRÉQUENCE DES PHÉNOTYPES

II.1- Fréquences géniques de XG1 et XG

Gènes	Fréquence (identiques hommes/femmes)
XG1	0,659
XG	0,341

II.2- Fréquences phénotypiques

Sexe	Génotypes	Phénotypes	Fréquences
Hommes	XG1Y	XG1	63,1 %
	XG Y	XG : -1	36,9 %
Femmes	XG1XG1	XG1	89,3 %
	XG1XG	XG : -1	10,7 %
	XG XG		

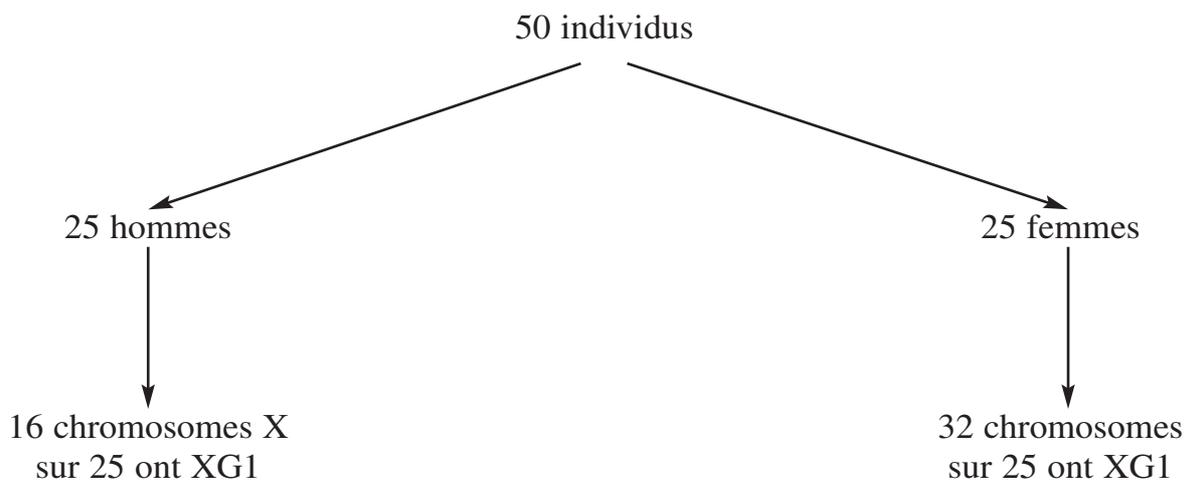
III. GÉNÉTIQUE

III.1- Le groupe sanguin XG1 se comporte comme un caractère dominant porté par l'X.

- Un père XG1 transmet le caractère à TOUTES ses filles mais JAMAIS à ses garçons.

- Une mère XG1
 - Hétérozygote transmet le caractère à la moitié de ses enfants (garçons ou filles).
 - Homozygote transmet le caractère à tous ses enfants.
- Donc :
 - + XG1 x, XG : -1
 Tous les garçons sont XG : -1
 Toutes les filles sont XG1
 - + XG : -1 x, XG1
 tous les enfants peuvent être XG1 ou XG : -1
 - + XG1 + x, XG1
 Les garçons peuvent être négatifs
 Les filles ne sont jamais négatives (toujours positives)
- Ou :
 - Si un homme est positif : sa mère et ses filles doivent être positives.
 - Si une femme est négative : son père et ses fils doivent être négatifs.
 C'est le modèle de transmission dominante et récessive liée à l'X (XG1 et daltonisme).

III.2- La fréquence génique ne diffère pas d'un sexe à l'autre. Ce qui différencie l'homme et la femme, c'est la distribution de l'X et non la fréquence de tel ou tel gène qu'il porte.



Donc 2/3 des gènes XG1 sont portés par les femmes puisqu'il y a deux fois plus de chromosomes X chez les 25 femmes que chez les 25 hommes. Dans les deux cas, la fréquence génique de XG1 est la même.

III.3- Le locus XG ne participe pas à l'inactivation de l'X. L'un des deux chromosomes X de chaque cellule somatique chez la femme est inactivé à un stade précoce du développement embryonnaire (apparemment au hasard) c'est-à-dire que l'inactivation peut porter sur le chromosome paternel ou maternel.

En ce qui concerne XG, aucune preuve de l'inactivation de XG n'a été fournie, ainsi on n'observe pas de mosaïcisme chez les globules rouges des femmes hétérozygotes XG1XG.

■ IV. L'ANTIGÈNE XG1

IV.1- Localisation

Le globule rouge mais aussi sur les fibroblastes, certaines lignées de lymphocytes en culture, les spermatozoïdes.

IV.2- Pouvoir immunogène

L'anticorps anti-XG1 peut être présent chez les polytransfusés mais très rarement. Ils sont reconnus pour la plupart à l'aide du test indirect à l'antiglobuline et non par les enzymes (antigène détruit).

I. GÉNÉRALITÉS

Les polyagglutinabilités sont la conséquence d'une réaction antigène-anticorps, l'antigène étant porté par les érythrocytes et les anticorps se trouvant dans le sérum humain. Des hématies sont dites polyagglutinables lorsqu'elles sont agglutinées par la plupart des **sérums humains** normaux (par ailleurs compatibles dans le système ABO).

On distingue deux types de polyagglutinabilité :

- les polyagglutinabilités congénitales dont on connaît deux catégories :
 - la polyagglutinabilité de type Cad dont les hématies de type 1 sont effectivement polyagglutinables,
 - la polyagglutinabilité de type HEMPAS observée au cours de la dysérythropoïèse de type 2 (caractérisée par une anomalie de la membrane érythrocytaire ainsi que par la présence d'érythroblastes binucléés). Ceci pose le problème des relations entre l'antigène responsable de cette polyagglutinabilité et les troubles de maturation de la lignée érythroblastique.
- les polyagglutinabilités acquises peuvent être liées ou non à une infection. Elles sont alors d'intensité variable. Quatre polyagglutinabilités acquises ont été décrites à ce jour : T, Tk, B acquis, Tn et Va.

II. LES POLYAGGLUTINABILITÉS CONGÉNITALES

II.1- Le type Cad

L'antigène Cad a été décrit en 1968 par CAZAL et Coll.

Il est défini par sa réactivité avec la lectine anti-A1 extraite de *Dolichos Biflorus* ainsi qu'avec un anti-Cad extrait également de *Dolichos Biflorus*. L'antigène Cad réagit également avec l'anti-Cad de poulet, l'anti-A d'*Helix Pomatia* et l'anti-Tn + Cad de *Salvia Horminum*.

En fait, l'antigène Cad n'est pas univoque et on connaît actuellement trois variétés d'antigènes Cad : Cad 1, 2 et 3 définis par leurs réactions sérologiques et par ordre décroissant de leur polyagglutinabilité.

RÉACTIFS	PHÉNOTYPES		
	CAD 1	CAD 2	CAD 3
ANTI A1 (Dolichos Biflorus)	+	+	+
ANTI A (Helix Pomatia)	+	+	+
ANTI Cad (Dolichos Biflorus)*	+	+	–
SÉRUM AB	+	–	–

* *Anti Cad (Dolichos Biflorus) = extrait de Dolichos Biflorus absorbé sur des globules rouges A1.*

En 1971, il est démontré que cet ordre de réactivité décroissante conduit à l'antigène Sda. En 1971, SANGER met en évidence une association phénotypique entre Cad et Sda. L'antigène Sda est un antigène de grande fréquence (90 % sujets Sda +), l'anticorps est présent (régulièrement) chez 1 % des sujets Sda–. Les relations Cad-Sda sont simples, tous les sujets Cad (+) renferment davantage d'antigènes Sda que les Cad (–), c'est pourquoi ils sont dits « super sda ». Cad 1 serait à Sda ce que A1 est à A2.

Sur le plan biochimique, le sucre immuno-dominant des antigènes Cad et Sda est la N-acétyl-galactosamine tout comme d'ailleurs celui des antigènes A1, A2 et Tn ; ceci explique l'action des lectines et réactifs que nous venons d'évoquer.

Toutefois, les antigènes Cad et Sda sont différents car les épreuves de fixation-élution de sérum AB, des épreuves d'inhibition de l'hémagglutination des hématies Cad par de la salive de sujets Sda + et Sda – ont pu le mettre en évidence.

Fréquence de l'antigène Cad : variable (0,3 pour mille en France à 2,4 pour mille en Thaïlande). Cad 1 : exceptionnel.

Transmission génétique : mode dominant et indépendamment du système ABO et autres systèmes. Mais il existe une expression variable de l'antigène Cad d'un sujet à l'autre à l'intérieur d'une même famille.

II.2- Le type HEMPAS (acronyme)

Hereditary Erythroblastic Multinuclearity with a Positive Acidified Serum.

Il a été décrit par CROOKSTON en 1969 chez des sujets atteints de dysérythropoïèse de type II. Cette polyagglutinabilité est en rapport avec un anticorps public de nature IgM présent dans tous les sérums humains sauf le propre sérum du sujet. La nature biochimique de l'antigène HEMPAS n'est pas actuellement connue. Nous savons par ailleurs que les sujets HEMPAS présentent une série de modifications des antigènes de groupes sanguins caractérisées par :

- une diminution quantitative de l'antigène H,
- des réactivités antigéniques A et B différentes de celles de sujets normaux (le B se comportant comme un B acquis ou un Cis AB),
- l'antigène i est considérablement augmenté (5 à 6 fois la normale) ainsi que l'antigène I mais plus modérément.

En pratique, les hématies HEMPAS ne sont reconnues par aucun réactif : anti-T, anti-A1 (Dolichos Biflorus), anti-Tn, anti-Cad...

Il existe, au cours de la dysérythroïèse de type II accompagnant l'antigène HEMPAS, d'autres anomalies sérologiques caractéristiques :

- tests de Ham et Dacie et test de Crosby positifs en sérum étranger et négatifs en sérum autologue, donc LYSE en milieu acide mais seulement en sérum étranger contrairement à la maladie de MARCHIAFAVA-MICHELI, ou hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN)
- test au sucrose négatif,
- hémolyse importante en présence d'anticorps anti-I et anti-i. Cette hémolyse n'est pas due à une sensibilité particulière des hématies au système complément. Ce dernier est activé par la fixation d'anticorps froids reconnaissant un antigène particulier propre aux malades atteints de dysérythroïèse de type II,
- agglutinabilité après traitement enzymatique.

Pathogénie : les dysérythroïèses de type II sont caractérisées par des anomalies nucléaires, des anomalies de membrane du globule rouge et par l'apparition d'un phénomène de polyagglutinabilité. Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer ces phénomènes :

- existence d'un allèle exceptionnel d'un gène responsable de l'anomalie héréditaire (transmission autosomale récessive),
- anomalie de l'enzyme habituellement responsable de la lyse de la membrane nucléaire au moment de la formation du fuseau.

*Caractéristiques sérologiques différentielles
des globules rouges HEMPAS et d'HPN*

TEST AU SUCROSE		Test de Ham et Dacie Test de Crosby	
		Sérum autologue	Sérum étranger
HEMPAS	-	-	+
HPN	+	+	+
TEMOINS • GR nouveau-né • GR adulte	-	-	-

■ III. LES POLYAGGLUTINABILITÉS ACQUISES

III.1- Le type T

- C'est le premier type de polyagglutinabilité décrit. L'antigène T est un élément antigénique normal de l'hématie qui est habituellement masqué par d'autres structures, c'est un antigène cryptique. L'anticorps correspondant, l'anti-T est pour sa part présent dans tous les sérums humains normaux (sucré Immuno Dominant : β Galactose).

- Mécanisme d'apparition : il est d'origine infectieuse. De nombreuses bactéries possédant une activité enzymatique (neuraminidase) peuvent être à l'origine de la polyagglutinabilité de type T. L'enzyme intervient en coupant les chaînes glycoprotéiques et glycolipidiques de la membrane érythrocytaire pour laisser apparaître l'antigène T. Il s'agit là d'un phénomène transitoire contemporain de l'infection et disparaissant avec elle.
- Diagnostic de la polyagglutinabilité de type T. Il est aisé depuis que l'on a reconnu une activité spécifique anti-T dans la lectine extraite d'*Arachis Hypogea* et glycine Soja. Un réactif d'origine humaine peut être obtenu en fixant et éluant un sérum AB sur des hématies OT.
- Fréquence : assez rare mais difficilement estimable, toutes les observations n'étant pas publiées.
- Incidence théorique : c'est la diminution du potentiel électrocinétique érythrocytaire caractérisé par la réduction de la mobilité électrophorétique érythrocytaire en milieu salin ou en sérum AB.
- Incidences pratiques :
 - La polyagglutinabilité de type T pose indiscutablement des problèmes de groupage sanguin et peuvent être à l'origine d'accidents et d'incidents transfusionnels de nature immunologique.
 - Le démasquage de l'antigène T peut constituer une difficulté de groupage lorsqu'on utilise des sérums-tests humains polyclonaux non débarrassés de leur activité anti-T ; on note le plus souvent une discordance entre les épreuves de Beth-Vincent et de Simonin. L'anti-T végétal facilite le diagnostic. L'utilisation d'anticorps monoclonaux permet de lever cette difficulté.
 - Sur le plan transfusionnel, il est impératif de ne transfuser, si nécessaire, les malades présentant une polyagglutinabilité acquise qu'avec des culots érythrocytaires isogroupes ABO-Rh compatibles et déplasmatisés pour éviter entre autre l'apport d'un anti-T présent dans tout plasma humain normal.
 - Ces phénomènes de polyagglutinabilité sont souvent accompagnés de stigmates cliniques et biologiques d'une hémolyse. Ainsi, il est fréquent d'observer un test de Coombs direct positif, l'éluion permettant d'isoler un anticorps anti-T.

III.2- Le type TN

Il a été rapporté pour la première fois en 1957 par MOREAU.

- L'antigène Tn responsable de cette polyagglutinabilité est très mal connu de même que son mécanisme d'apparition qui n'a jamais pu être reproduit « in vitro ».

Il s'agit d'une absence de conversion du substrat Tn (N-Ac-Gd) par absence de l'enzyme T, d'où une image de double population pseudo A, peut être considérée comme un stigmate d'état pré-leucémique. Certains anticorps puissants peuvent déceler cette anomalie (particularité devant être mentionnée sur la notice du producteur).

Nous savons qu'il s'agit d'une polyagglutinabilité acquise car elle est apparue chez des sujets initialement normaux et elle a, dès lors qu'elle est apparue, un caractère permanent ou, très durable, mais elle n'est jamais d'origine infectieuse.

- Cette polyagglutinabilité s'intègre habituellement dans un tableau clinique bien particulier comportant une leucopénie ou/et une thrombopénie.
- Une activité anti-Tn existe dans tous les sérums humains normaux ; elle existe également dans la lectine extraite de *Dolichos Biflorus* quel que soit le groupe ABO. Enfin, une activité spécifique anti-Tn a pu être reconnue dans une lectine extraite de *Salvia Sclarea* (spécifique) mais aussi *Salvia Horminum* et toutes les lectines avec activité anti-A.
- Nature biochimique de l'antigène Tn. Le déterminant spécifique serait le radical N-Acétyl-Galactosamine et serait lié à la sérine ou à la thréonine de la glycophorine (Tn = étape intermédiaire dans l'appartenance des AG MN).
- Mécanisme d'apparition. Les hypothèses suivantes ont été avancées. L'apparition de l'antigène Tn pourrait être la conséquence d'une modification dans la biosynthèse des β galactosyltransférases ou de l'action d'une glycosidase. Ainsi, le traitement de globules rouges O par de la neuraminidase fait apparaître une structure réactive de type T qui, soumise à une β galactosidase met en évidence une spécificité de type Tn. Tn substrat de T, M et N.

Il s'agit de modifications somatiques affectant les cellules souches médullaires d'où modification antigénique d'un ou plusieurs clones de cellules par incapacité de produire de la β galactosyltransférase fonctionnelle.

III.3- Le type TK

C'est une polyagglutinabilité d'origine infectieuse décrite pour la première fois en 1972 par BIRD chez une femme présentant une infection urinaire à *E. Coli*. C'est une polyagglutinabilité acquise, transitoire, disparaissant avec la guérison de l'épisode infectieux.

Sur le plan sérologique, les caractéristiques de la transformation Tk sont identiques à celles de la transformation T à la différence que les hématies Tk sont agglutinées par le polybrène et non les T. Il semblerait que Tk soit une forme mineure de transformation T.

III.4- Le type B acquis

Il a été mis en évidence en 1959 par CAMERON.

Ces cas de polyagglutinabilité sont généralement observés chez des sujets de phénotypes A1. Cette polyagglutinabilité est d'origine infectieuse et a un caractère transitoire. Certains anti-B monoclonaux peuvent déceler cette anomalie (particularité devant être mentionnée sur la notice du producteur).

Mise en évidence de la polyagglutinabilité :

- apparition d'une réactivité anti-B chez un sujet de phénotype A avec un anti-B dans le sérum,
- test de fixation-élution d'un anti-B : positif,
- réaction négative avec l'anti-T, anti-Tn, anti-Cad, sérum AB.
- la réactivité B anormale s'accompagne d'une diminution de la réactivité de l'antigène A.

Mécanisme d'apparition : une désacétylase bactérienne pourrait rendre compte de ce phénomène. Elle serait responsable du clivage des radicaux acétyl du sucre immuno dominant de l'antigène A (N-acétyl-galactosamine) pour laisser apparaître des molécules de type galactose supportant la spécificité B (pseudo B se formant aux dépens de A).

	T	Tn	B acquis	CAD	HEMPAS
Anti T _{AH}	+++	-	+ ou - (rare)	-	-
Anti Tn _{SS}	-	+++	-	-	-
Anti Cad _{Db}	-	-	-	+++	-
Fixation Elution Anti B	-	-	+++	-	-
Sérum AB (5)	+++	+++	++	+++	+++
Polybrène	-	±+	+++	+++	+++

	T	Tn	Cad
Sérum AB	+++	+++	++
Anti T de cacahuète (Arachis Hypogea)	++	-	-
Anti A1 (Dolichos Biflorus)	-	± ±	+++ ou ± ±
Anti A escargot (Helix pomatia)	-	± ±	+++ ou ± ±
Polybrène	-	± ±	+++
Papaïne	-	-	+
Inhibition sucre N-Acétyl-Galactosamine	-	++	++

Caractères des antigènes de polyagglutinabilité Tn, Cad et HEMPAS

	Tn	Cad ₁	Hempas
Fréquence	Exceptionnelle	Rare	Rare
Héréditaire ou acquis	Acquis	Familial	Familial
Antigène soluble	0	0	0
Test à l'antiglobuline	–	–	–
Présence d'auto-anticorps dans le sérum	+ (hématies trypsinées)	0	0
Agglutination par sérum de cordon	–	NT	–
Optimum thermique	4° C	4° C	4° C
Titre des sérums AB agglutinants	2 à 128	8 à 64	2 à 32
Action de la papaine	↘	↗	↗
Action de la trypsine	=	NT	↗
Agglutination par lectines Dolichos Biflorus	+	+	–
Arachis Hypogea	–	–	–
Phaseolus lunatus	+	–	NT
Ulex Europaeus	+	–	–
Agglutination par hétéroanticorps	+	–	+
Contenu en acide sialique	↘	Normal	↘
Action du polybrène	±	n'	Normal
<u>Autres antigènes :</u> I i H MN	Normal Normal Normal ou ↗ ↘	NT NT Légèrement ↘ Normal	Normal ↗ ↘ Normal

INCOMPATIBILITÉS FŒTO-MATERNELLES ÉRYTHROCYTAIRES NON ABO (IFM)

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

■ HISTORIQUE

C'est en 1609 qu'une sage femme française, Louyse Bourgeois, décrit pour la première fois la maladie hémolytique périnatale à l'occasion de la naissance de jumeaux : le premier présentant un hydrops mourut immédiatement après la naissance et le second quelques jours plus tard après avoir développé un ictère intense. En 1932, Diamond démontre que l'hydrops fœtal, l'ictère grave et l'ictère nucléaire sont trois formes différentes de la même pathologie dénommée érythroblastose fœtale. La théorie selon laquelle, il y aurait un passage d'hématies fœtales à travers le placenta, stimulant la production maternelle d'anticorps anti-hémoglobine fœtale, retraversant ensuite le placenta et détruisant les hématies fœtales a été émise par Darrow en 1938. Un an plus tard, Levine et Stetson découvrent un anticorps après une réaction hémolytique transfusionnelle : il s'agissait d'une femme de groupe sanguin O qui venait d'être transfusée avec le sang de son mari, lui aussi de groupe sanguin O, juste après la naissance d'un enfant atteint d'érythroblastose fœtale. L'anticorps reconnaissait un antigène présent sur les hématies du père et de l'enfant. Ils postulèrent que la mère s'était allo-immunisée contre l'antigène que le fœtus avait hérité de son père.

En 1940, Landsteiner et Wiener déterminent l'antigène responsable de cette allo-immunisation. Par hétéro-immunisation de lapins avec des hématies de *Macacus Rhésus*, ils obtiennent un anticorps reconnaissant 85 % des hématies humaines qu'ils appelèrent anti-Rhésus. Levine confirma à l'aide de cet anticorps que le père et l'enfant possédaient l'antigène Rhésus et que la mère ne le possédait pas.

■ I. ANTICORPS ET ANTIGÈNES CONCERNÉS

Les anticorps pouvant entraîner une IFM résultent d'une allo-immunisation par transfusion ou hémorragie fœto-maternelle. Ils doivent être de nature IgG, avoir une concentration élevée, une affinité suffisante pour l'antigène et être aptes à activer les récepteurs Fc des macrophages. Plus de 250 antigènes ont été décrits et une centaine impliqués dans des IFM. Certains sont des antigènes privés, d'autres des antigènes publics, mais les plus impliqués sont ceux des systèmes RH, KEL, FY, JK et MNS. Ces derniers sont exclusivement érythrocytaires et bien développés chez le fœtus entre les 4^e et 6^e semaines d'aménorrhée.

I.1- Système RH

Le système RH est à l'origine de la majorité des allo-immunisations fœto-maternelles. Les anticorps impliqués sont par ordre décroissant : anti-RH1, anti-RH3, anti-RH4, anti-RH2, anti-RH5, anti-RH8...avec un risque majeur en présence d'anti-RH1 ou anti-RH4.

I.2- Système KEL

L'antigène KEL1 est le plus immunogène après l'antigène RH1. Les anticorps anti-KEL1 représentent environ 13 % des anticorps immuns. En cas d'IFM les anémies fœtales peuvent être gravissimes et nécessiter un traitement transfusionnel in utero en raison d'une anémie profonde due à une altération de l'érythropoïèse, alors que le résultat de l'amniocentèse n'est pas inquiétant.

I.3- Système FY

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

I.4- Système JK

L'antigène JK1 est plus immunogène que l'antigène JK2. Les IFM dues à ces antigènes sont rares mais peuvent être très sévères.

I.5- Système MNS

Les antigènes du système MNS sont rarement impliqués dans les incompatibilités fœto-maternelles. Ont été décrites quelques IFM par anti-MNS3 mais elles sont presque toujours bénignes. Cependant de rares cas sévères ont été rapportés.

■ II. PHYSIO-PATHOLOGIE

La maladie hémolytique périnatale résulte d'une suite de phénomènes liés à l'introduction d'un antigène étranger dans la circulation maternelle. Or l'antigène RH1 que nous prendrons comme exemple est bien développé chez le fœtus dès le 30^e jour de gestation.

II.1- Passage des hématies fœtales dans la circulation

Une hémorragie fœto-maternelle (HFM) peut survenir dès la 6^e semaine d'aménorrhée et certaines femmes peuvent après une HFM même très faible développer un anticorps anti-RH1. Elles sont appelées « bonnes répondeuses ». Grâce au test de Kleihauer pratiqué régulièrement tout au long de la grossesse chez des femmes porteuses d'un fœtus ABO compatible, il a été montré que l'on pouvait mettre en évidence des hématies fœtales chez 4 % d'entre elles dès le 1^{er} trimestre, 12 % pendant le 2^e, 45 % durant le 3^e et chez plus de 60 % au moment de l'accouchement.

II.2- Transfert des anticorps maternels vers le fœtus

Seuls les anticorps maternels de nature IgG sont capables de franchir la barrière placentaire. Ce transfert est précoce (à partir du 2^e mois), mais peu important avant le 4^e mois, actif et réalisé via les récepteurs pour le Fc des IgG situés sur la face maternelle du trophoblaste et fonction de la concentration en anticorps qui peut varier de quelques ng à quelques µg.

II.3- Formation des complexes antigène-anticorps sur les hématies fœtales

Tout d'abord, les anticorps maternels vont se fixer sur les antigènes spécifiques de la surface des hématies fœtales. Le nombre des complexes ainsi formés dépend du nombre de sites antigéniques RH1 des hématies fœtales et de la constante d'affinité des anticorps.

II.4- Mécanisme de la destruction des globules rouges

Il se produit une phagocytose, suivie d'une lyse des hématies fœtales sensibilisées par les anticorps IgG via les récepteurs Fc des IgG. La pathogénicité des anticorps dépend de plusieurs facteurs comme la quantité d'anticorps, l'avidité de l'anticorps pour son antigène spécifique et la distribution des antigènes sur le globule rouge et leur nombre. Intervient aussi le transfert actif des anticorps à travers le placenta, la maturité fonctionnelle de la rate fœtale à phagocyter les hématies sensibilisées et la présence d'anti-HLA bloquant la phagocytose splénique.

II.5- Rôle des sous-classes d'IgG

La concentration des quatre sous-classes d'IgG à terme est toujours supérieure dans le sang de cordon que le sang maternel. Les IgG1 traversent le placenta de façon massive dès la 20^e semaine d'aménorrhée tandis que les IgG3 atteignent le taux de celui du sang maternel vers la 28-32^e semaine. Les anti-RH provoquant la maladie hémolytique périnatale sont uniquement des IgG1 et des IgG3. Les cas dus aux IgG1 sont réputés entraîner une anémie plus sévère que ceux dus aux IgG3. Mais quand l'enfant est né, l'augmentation de la bilirubine est souvent plus élevée en présence d'IgG3 que d'IgG1. En cas d'anémie profonde, la mort de l'enfant peut survenir in utero dans le dernier trimestre de la grossesse, voire même dans les cas extrêmes avant la fin du 4^e mois de la grossesse.

■ III. ÉPIDÉMIOLOGIE

Malgré l'introduction de la prévention spécifique par les « immunoglobulines anti-D » l'IFM la plus fréquente et la plus grave, en dehors de l'IFM ABO, est celle liée à l'antigène RH1. Elle concerne 1 à 3 grossesses pour 1 000 naissances vivantes. Elle frappe surtout les enfants de rang supérieur ou égal à 2, elle est symptomatique dans 50 % des cas dont un quart développe une anémie fœtale sévère avant le terme de 34 semaines. Les autres IFM sont celles liées essentiellement aux antigènes RH4 et KEL1.

■ IV. SURVEILLANCE DE LA GROSSESSE

IV.1- Anamnèse

Le mode d'immunisation influe sur le pronostic : une allo-immunisation due à une transfusion incompatible est souvent plus grave qu'une immunisation uniquement transplacentaire. La connaissance des antécédents obstétricaux est essentielle dans la prise en charge d'une IFM : il faut préciser le terme de survenue des premiers symptômes et la sévérité de l'atteinte. L'IFM pour la grossesse actuelle survient en général au même terme et de façon au moins aussi sévère. Les explorations fœtales doivent être débutées 4 à 6 semaines d'aménorrhée (SA) avant la date d'apparition des premiers symptômes de la grossesse précédente ou dès 18–20 SA en cas d'atteinte sévère.

IV.2- Méthodes diagnostiques non invasives

Les tests immuno-hématologiques utilisés pour le diagnostic anténatal existent depuis 1940. Pratiqués depuis plus de 60 ans, ils ont bien sûr évolué, mais cependant à eux seuls, ils ne peuvent définir la sévérité d'une maladie hémolytique périnatale éventuelle. Les tests biologiques permettent d'aider les obstétriciens qui détiennent d'autres indicateurs pour prédire l'atteinte fœtale.

IV.2.1- Le dépistage de l'allo-immunisation

Il convient de respecter les textes réglementaires concernant les prescriptions obligatoires : la détermination des groupes sanguins ABO-RH1 et du phénotype RH-KEL1 au 3^e mois de la grossesse, la deuxième détermination des groupes sanguins ABO-RH1 au 6^e ou 7^e mois de la grossesse, et la recherche des anticorps anti-érythrocytaires (RAI).

La RAI doit être programmée :

- au moins à 2 reprises (1^{er} et 6^e ou de préférence au 7^e examens prénataux si la RAI était négative au 1^{er}) chez les femmes enceintes de phénotype RH1 et sans antécédent transfusionnel,
- au moins à 4 reprises (1^{er}, 4^e, 6^e et 7^e examens prénataux) chez les femmes enceintes de phénotype RH1 avec antécédent transfusionnel ou de grossesse et chez les femmes de phénotype RH :– 1,
- et à l'accouchement chez les femmes de phénotype RH :– 1 avant l'injection d'« immunoglobulines anti-D »,
- et chez les femmes RH1 en cas de besoin transfusionnel.

En cas de dépistage positif, il faut obligatoirement procéder à l'épreuve d'identification des anticorps anti-érythrocytaires (sans attendre l'examen prénatal ultérieur). Elle consiste à déterminer la spécificité des anticorps présents et à vérifier l'absence des antigènes correspondants pour reconnaître les patientes à risque d'IFM. Dans 40 % des cas, l'anticorps ne présente aucun risque car il s'agit d'un anticorps naturel. Par contre, en cas de présence d'anticorps susceptibles d'entraîner des accidents d'incompatibilité fœto-maternelle, la RAI avec identification et titrage (et dosage pondéral pour les anti-RH) doit

être effectuée à des périodes rapprochées de 3 à 4 semaines, voire 2 semaines à partir de la 20^e semaine d'aménorrhée.

IV.2.2- La surveillance de l'allo-immunisation

Détermination du phénotype paternel

Une allo-immunisation maternelle est sans risque, même si l'anticorps est puissant, si le fœtus est compatible. Il convient de déterminer le phénotype du géniteur pour savoir s'il possède l'antigène correspondant et si l'expression de ce dernier est hétérozygote ou homozygote.

Détermination du phénotype du fœtus

La détermination du phénotype érythrocytaire fœtal est possible par les méthodes invasives. Elle est utile en cas d'hétérozygotie paternelle et d'antécédents d'atteinte fœtale sévère. Celle-ci peut être réalisée précocement sur prélèvement de biopsie de trophoblaste avec un risque d'HFM de 50 % ou plus tardivement à partir du sang fœtal. Cependant la détermination isolée du phénotype à partir du sang fœtal est dangereuse et déconseillée en raison du geste iatrogène que le prélèvement nécessite.

Détermination du génotype du fœtus

Il est possible désormais de pratiquer le génotypage RHI, RH4, RH3, KEL1, FY, JK des cellules fœtales extraites du liquide amniotique à partir de la 14-15^e semaine d'aménorrhée par Polymérase Chaîne Réaction. Seuls, les laboratoires disposant d'un agrément pour le diagnostic anténatal peuvent pratiquer ce type de diagnostic. L'avantage est le moins grand risque d'aggravation de l'allo-immunisation. Quand le fœtus est RH : - 1, ceci permet de limiter les actes invasifs dans le suivi ultérieur de la grossesse. La détermination du génotype fœtal à partir du sang maternel est un espoir raisonnable : plusieurs équipes tentent d'extraire directement à partir du sang maternel le DNA fœtal libre afin de déterminer le génotype du fœtus. Les difficultés majeures concernent des problèmes d'amplification d'ADN et de contaminations qui sont en voie d'être résolus.

Méthodes d'évaluation du risque hémolytique in utero

Le risque d'hémolyse *in utero* est estimé par l'étude des antécédents obstétricaux et surtout celle des anticorps dont le titre et la concentration augmentent généralement de façon significative en cours de grossesse, si le fœtus est incompatible. Quelle que soit la spécificité, tout anticorps IgG de titre égal ou supérieur au 1/16^e ou de concentration égale ou supérieure à 1 µg/ml (pour les anti-RH) peut entraîner une anémie fœtale. C'est pourquoi, il est indispensable que toute femme enceinte immunisée soit prise en charge dans un service spécialisé dans le diagnostic anténatal ou le centre régional de thérapie fœtale et un service d'immuno-hématologie référent en ce domaine d'activité.

L'étude des anticorps comporte le titrage en test indirect à l'antiglobuline (IAT) et le dosage pondéral

Le titrage des anticorps est obligatoire pendant la grossesse et doit être réalisé après dilution géométrique de raison 2 en IAT par la technique traditionnelle en tube et vis à vis d'hématies en solution saline. L'utilisation des nouveaux procédés est dangereuse dans la

mesure où elle augmente artificiellement et de façon aléatoire en fonction des anti-RH leur titre de 1 à 5-6 dilutions. Cet examen qui doit être pratiqué dès la 12^e semaine d'aménorrhée dépend de nombreux paramètres comme les concentrations en anticorps et en antigène, les réactifs et la méthode de lecture et surtout la constante d'affinité de l'anticorps. Le titrage est de ce fait une méthode insuffisante et peu performante car il ne mesure que la quantité d'anticorps capable de se fixer *in vitro* sur les hématies-tests (quantité qui dépend de la constante d'affinité) et non pas la quantité totale d'anticorps. Surtout, il est peu reproductible d'un laboratoire à un autre, c'est pourquoi l'évolution du titre doit être estimée dans un même laboratoire, par rapport à un standard anti-RH1 de titre et concentration connus, en parallèle avec l'échantillon de sérum maternel précédent. Néanmoins, le seuil dangereux est fixé au 1/32^e.

Le dosage pondéral permet d'exprimer la concentration en $\mu\text{g/ml}$ des IgG anti-RH. Il est à réaliser dès la 12^e semaine d'aménorrhée pour permettre une approche de la concentration réelle en IgG anti-RH1 (anti-RH4, anti-RH3...) dans le sérum maternel. Il s'agit d'une technique d'agglutination automatisée et donc reproductible, où la constante d'affinité intervient peu. Elle consiste en un dosage comparatif par rapport à un standard anti-RH1 de concentration connue. Le seuil dangereux est de 1 $\mu\text{g/ml}$. D'autres procédés ont été décrits comme les méthodes radio-isotopiques, les tests immuno-enzymatiques et en cytométrie de flux. Néanmoins la méthode semi quantitative sur auto analyseur à flux continu reste la plus simple et la plus adaptable pour des séries d'analyses.

L'association dosage pondéral et titrage des anticorps, à condition que ces examens soient évidemment effectués par le même laboratoire, permet une meilleure appréciation du risque d'immuno-hémolyse *in utero* car l'activité fonctionnelle d'un anticorps dépend de sa concentration et de son affinité. L'association de ces deux examens permet aussi de limiter les gestes invasifs que représentent les ponctions de liquide amniotique et de sang fœtal, de mieux préciser le moment où il faudra les pratiquer et de détecter les réactivations qui se produisent 1 fois sur 2, mais de façon imprévisible (moment et intensité). C'est pourquoi ces examens doivent être réalisés dès le début de la grossesse et reprogrammés régulièrement tous les mois jusqu'à la 20^e semaine d'aménorrhée puis tous les 15 jours au-delà, voire toutes les semaines en cas d'immunisation sévère.

Les tests de cytotoxicité cellulaire, phagocytose et cytolyse, reproduisant *in vitro* ce qui se passe *in vivo*, donnaient un bel espoir mais ils sont difficilement praticables en routine.

IV.2.3- Place des tests biologiques dans la surveillance des grossesses

Dans tous les cas, ce sont les méthodes biologiques d'évaluation du risque hémolytique qui permettent de définir le mode de prise en charge de la grossesse qui consiste en :

- une simple surveillance biologique du titre des anticorps et de la concentration des anti-RH, associée à des méthodes non invasives d'évaluation de l'atteinte hémolytique fœtale : échographie, mouvements fœtaux, rythme cardiaque fœtal...
- une surveillance biologique associée à la mesure de la bilirubinémie après amniocentèse à partir de la 18^e semaine d'aménorrhée quand le titre et la concentration excèdent respectivement 1/16^e et 1 $\mu\text{g/ml}$,

- un accouchement provoqué en cas d'atteinte fœtale moyenne,
- des transfusions in utero lorsque l'atteinte fœtale est sévère.

■ V. PRÉVENTION DE L'ALLO-IMMUNISATION À L'ANTIGÈNE RH1

La prévention spécifique de l'allo-immunisation à l'antigène RH1 doit impérativement être mise en œuvre chez toute femme RH : – 1 non immunisée anti-RH1.

V.1- Pendant la grossesse

La prophylaxie RH doit être appliquée impérativement chez toute femme enceinte RH : – 1 non immunisée anti-RH1 : **après** toute fausse couche du 1^{er} trimestre ou interruption volontaire de grossesse, quelles que soient la date et les circonstances, mais aussi, après avortement tardif, grossesse extra-utérine, interruption médicale de grossesse, biopsie de trophoblaste, amniocentèse, ponction de sang fœtal, cerclage du col, version par manœuvre externe, mort *in utero*, intervention pelvienne, réduction embryonnaire, métrorragies (placenta inséré bas, hématome rétro-placentaire placenta praevia), appendicectomie, accident de la circulation, traumatisme abdominal.

Dans tous les cas, après avoir vérifié que la patiente n'est pas immunisée anti-RH1, une dose de 100 µg d'« immunoglobulines anti-D » est injectée. Une ou plusieurs doses supplémentaires sont injectées ultérieurement en fonction du résultat du test de Kleihauer qui doit être systématique à partir du 4^e mois de la grossesse. Dans les 24-48 heures suivant l'injection, sera réalisée une recherche d'agglutinines résiduelles. Un mois plus tard, une RAI sera demandée en précisant qu'il y a eu injection d'« immunoglobulines anti-D » et la date.

V.2- A l'accouchement

La prophylaxie RH doit être appliquée impérativement après tout accouchement d'enfant RH1 chez une femme RH : – 1 non immunisée anti-RH1. Ceci nécessite au préalable la double détermination des groupes sanguins ABO-RH1 du nouveau-né, la RAI sur le sang maternel au moment de l'accouchement et le test de Kleihauer sur le sang maternel prélevé au moins une heure après la délivrance.

L'injection d'« immunoglobulines anti-D » sera effectuée dans les 72 heures au plus tard suivant l'accouchement à raison d'une dose de 100 µg pour un test de Kleihauer inférieur ou égal à 5 ; au-delà de 5 : la dose à injecter est de 100 µg + (nombre d'hématies fœtales au-delà de 5 pour 10 000 × 5). Dans les 24 heures suivant l'injection d'« immunoglobulines anti-D », seront réalisés une recherche d'agglutinines résiduelles et un test de Kleihauer de contrôle si le premier est positif. Un contrôle 6 mois plus tard est recommandé : il consiste à rechercher l'apparition éventuelle d'anticorps anti-érythrocytaires.

BIBLIOGRAPHIE

1. BOWMAN JM. Alloimmune hemolytic disease of the foetus and newborn. *Wintrob Clinical Hematology*. Williams and Wilkis. Baltimore. 1999 ; 10th ed, vol 1, 1210-1232.
2. VAUGHAN JL, WARVICK RM, LETSKY EA, NICOLINI U, RODECK CH, FISK NM. Erythropoietic suppression in fetal anemia because of Kell alloimmunization. *Am. J. Obstet. Gynecol*, 1961, 82, 1359-1370.
3. DUFOUR P, VINATIER D, BERNARDI C, EZZEDINE M, FONTEYNE G, MIONNIER JC, MANNESSIER I. Allo-immunisation foeto-maternelle grave anti-Duffy. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 1991, 20, 809-814.
4. MERLOB P, LITWIN A, REISNER SH, COHEN IJ, ZAIQOV R. Hemolytic disease of the newborn caused by Anti-Jka. *Pediatr Hematol Oncol* 1987, 4, 357-360.
5. MONESTIER M., RIGAL D, JURON-DUPRAZ F., MEYER F. Maladies hémolytiques du nouveau-né par allo-immunisations maternelles contre les antigènes érythrocytaires autres que A, B et Rhésus D. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 1984, 13, 671-680.
6. HANN IM, GIBSON BES, LETSKY EA. *Fetal and Neonatal Haematology (Chapters 5 & 7)*. Baillière Tindall, 1991.
7. BOWMAN JM. The management of Rh-isoimmunization. *J Obstet Gynaecol*, 1978, 52, 1-16.
8. POISSONNIER MH, BROSSARD Y, SOULIÉ JC, MAYNIER M, LARSEN M, DE LACHAUX V, CHAVINIÉ J. Incompatibilité foetomaternelle érythrocytaire. *Encycl Méd Chir, (Elsevier, Paris),. Gynécologie/Obstétrique, 5-020-A-20, Pédiatrie. 4-002-R-25, 1998, 12 p.*
9. ANDERSON KC, NESS PM. *Scientific Basis of Transfusion Medicine. Implication for Clinical Practice (Chapters 5,6,19)*. WB Saunders Company, 2000.
10. Arrêté du 19 avril 1985 (JO du 30 mai 1985) relatif aux examens médicaux pré et post-natals.
11. Décret N° 92-143 du 14 février 1992 (JO du 18 février 1992) relatif aux examens obligatoires prénuptial, pré et post-natal.
12. MANNESSIER L., VALAT AS, CODACCIONI X, PUECH F, HUART JJ. La surveillance immuno-hématologique des femmes enceintes. *Rev Gynécol*. 1994, 2, 7, 425-430.
13. 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, 607-610.
14. MANNESSIER L, DOURIEUX S, DELSALLE A, HUART JJ, PUECH F. Groupage Rh par PCR sur cellules amniotiques. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod*, 1995, 24, 827-828
15. LO YM. Fetal DNA in maternal plasma : biology and diagnostic applications. *Clin Chem*. 2000, 46 (12), 1903-1906.

16. HOUFFLIN-DEBARGE V, O'DONNELL H, OVERTON T, BENNETT PR, FISK NM. High sensitivity of fetal DNA in plasma compared to serum nucleated cells using un-nested PCR in maternal blood. *Fetal Diagn Ther.* 2000, 15 (2), 102-107.
17. GOUDEMANT M, SALMON Ch ; *Immuno-hématologie et immunogénétique.* Chapitre XI. 1980, Flammarion Médecine-Sciences.
18. WHITECAR PW, MOISE KJ Jr. Sonographic methods to detect fetal anemia in red blood cell alloimmunization. *Obstet Gynecol Surv.* 2000 Apr, 55 (4), 240-250.
19. OEPKES D. Invasive versus non-invasive testing in red-cell alloimmunized pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000, 92 (1), 83-89.
20. MARI G, DETER RL, CARPENTER RL, RAHMAN F, ZIMMERMAN R, MOISE KJ JR, DORMAN KF, LUDOMIRSKY A, GONZALEZ R, GOMEZ R, OZ U, DETTI L, COPEL JA, BAHADO-SINGH R, BERRY S, MARTINEZ-POYER J, BLACKWELL SC. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *N Engl J Med.* 2000, 342 (1), 9-14.
21. ISKAROS J, KINGDOM J, MORRISON JJ, RODECK C. Prospective non-invasive monitoring of pregnancies complicated by red cell alloimmunization. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1998, 11 (6), 432-437.
22. QUEENAN J, TOMAI T, URAL S, KING J. Deviation in amniotic fluid optical density at a wavelength of 450 nm in Rh-immunized pregnancies from 14 to 40 weeks gestation : a proposal for clinical management. *Am J Obstet Gynecol.* 1993, 168, 1370-1376.

ASPECTS BIOLOGIQUES DES ACCIDENTS HÉMOLYTIQUES DE TRANSFUSION SANGUINE

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

La transfusion sanguine comporte un certain nombre de risques dont le plus fréquent et le plus grave est l'accident hémolytique par incompatibilité anti-érythrocytaire. Le plus souvent, c'est le sang transfusé qui est détruit parce qu'il apporte un antigène cible de l'anticorps correspondant présent chez le receveur. Exceptionnellement, c'est le sang transfusé qui contient un anticorps capable de détruire les hématies du receveur. La majorité des antigènes de groupes sanguins peuvent être impliqués dans un accident hémolytique. L'importance de l'hémolyse et la fréquence des incidents peuvent varier selon le système considéré.

■ I. ÉTIOLOGIE DES ACCIDENTS

I.1- Accidents par incompatibilité ABO

Les accidents par incompatibilité ABO sont les plus fréquents, les plus graves, les plus morbides et pourtant les plus faciles à éviter. Le risque d'incompatibilité ABO est permanent, il est dû à la présence constante d'anticorps naturels et réguliers anti-A ou anti-B dans le plasma des individus dont les hématies sont dépourvues des antigènes B ou A correspondants.

C'est une règle impérative que de ne jamais transfuser du sang possédant l'antigène correspondant à l'anticorps du receveur.

I.1.1- Règle de compatibilité érythrocytaire

Toutes les transfusions isogroupes sont compatibles. Le sang O peut être transfusé chez tous les receveurs quel que soit leur groupe sanguin ABO, puisqu'il est dépourvu des antigènes A et B et de ce fait inaccessible aux éventuels anti-A ou anti-B présents chez le receveur. Quant au receveur AB dépourvu d'anti-A et d'anti-B, il peut être transfusé avec le sang de tous les donneurs quel que soit leur groupe sanguin ABO.

I.1.2- Règle de compatibilité plasmatique

Toutes les transfusions isogroupes sont compatibles. Le plasma AB peut être transfusé chez tous les receveurs quel que soit leur groupe sanguin ABO, puisqu'il est dépourvu d'anti-A et d'anti-B. Le plasma A peut être transfusé aux receveurs A et O, le plasma B peut être transfusé aux receveurs B et O. Quant au plasma O, il est réservé aux receveurs de groupe sanguin O.

I.1.3- Exception : le donneur universel dangereux

Un certain pourcentage de sujets possède un anti-A immun (plus rarement un anti-B) qui est capable d'hémolyser les hématies du receveur A (ou B).

La prévention des accidents par « donneurs dangereux » repose sur la détection systématique de ces anti-A ou anti-B immuns sur chaque don par les plateaux de Qualification de l'Etablissement Français du Sang. Les unités provenant de ces donneurs comportent une étiquette « A ne transfuser qu'à un receveur isogroupe ».

■ II. ACCIDENTS PAR ANTICORPS ANTI-ÉRYTHROCYTAIRES

II.1- Anticorps naturels

Ces anticorps préexistent en dehors de toute stimulation fœto-maternelle ou transfusionnelle. Ils peuvent donc être dangereux dès la première transfusion.

II.1.1- Anticorps du système LE

Ces anticorps sont le plus souvent des anticorps froids et ne sont pas en cause. Cependant certains d'entre eux, en particulier les anti-LE1, sont actifs à + 37 °C et hémolysants. De ce fait, ils peuvent être dangereux sur le plan transfusionnel.

II.1.2- Anticorps des systèmes P et MNS : anti-P1, anti-MNS1, anti-MNS2

Ils ne sont pas dangereux car ce sont des anticorps de faible titre et généralement inactifs à + 37 °C.

II.1.3- Anticorps des « receveurs dangereux » : anti-H des hh sese, anti-GLOB1 (anti-P) des GLOB : -1, 2 (Pk), anti-P1+GLOB1+GLOB2 (anti-PP1Pk) de GLOB : -1, -2 (p)...

Les sujets dépourvus d'un antigène public et possédant l'anticorps correspondant naturel, régulier et actif à + 37 °C sont de véritables « receveurs dangereux ». Le risque d'incompatibilité transfusionnelle est constant et sévère dès la première transfusion comme en cas d'incompatibilité ABO.

II.2- Anticorps immuns

Les anticorps immuns apparaissent après stimulation par transfusion ou grossesse incompatible. Ils sont de nature IgG, toujours actifs à + 37 °C et donc toujours potentiellement dangereux en cas de transfusion incompatible, ainsi que pour le fœtus s'il possède l'antigène correspondant. Leur apparition est conditionnée par plusieurs facteurs.

II.2.1- Immunogénicité de l'antigène

Tous les antigènes ne possèdent pas la même immunogénicité. A cet égard, l'antigène RH1 est le plus important, et c'est une règle impérative que de ne jamais transfuser un

sujet RH : -1 avec du sang RH1. D'autres antigènes par ordre d'importance : KEL1, RH4, RH3, FY1, JK1, MNS3... peuvent induire la formation d'allo-anticorps immuns chez les polytransfusés et les femmes multipares.

II.2.2- Rôle des transfusions

L'immunisation anti-érythrocytaire augmente avec le nombre de transfusions et le rythme de celles-ci.

II.2.3- Rôle de la maladie

L'aptitude à s'immuniser dépend de l'état immunitaire du receveur. Ainsi les malades atteints d'hémopathie maligne produisent peu d'allo-anticorps anti-érythrocytaires, alors que les sujets atteints de cirrhose hépatique ou de thalassémie s'immunisent très facilement.

II.2.4- Rôle du sexe

A nombre égal de transfusions, les femmes, en excluant celles ayant eu des grossesses, s'immunisent deux fois plus que les hommes. Ceci est controversé désormais.

II.2.5- Allo-immunisation multiple

Certains individus s'immunisent plus facilement que d'autres et en général les premiers anticorps qu'ils développent sont des anti-HLA, d'où l'intérêt de rechercher ces anticorps chez les polytransfusés.

II.2.6- « Receveurs dangereux dits public négatif »

Les « receveurs dangereux » dépourvus d'un antigène de très grande fréquence (Vel, Lan, Gerbich...), développent dès la première transfusion ou grossesse incompatible l'anticorps immun correspondant à l'antigène qui leur fait défaut. Ils ne peuvent être transfusés qu'avec du sang de phénotype strictement identique au leur, provenant de la réserve nationale de sang congelé et donné généralement par le malade lui-même ou un membre de sa fratrie.

II.2.7- Apparition et disparition des anticorps

La présence des anticorps n'est pas constante. L'absence d'anticorps avant transfusion ne veut pas dire que le sujet ne s'est pas immunisé dans le passé à la suite de transfusions ou grossesses incompatibles. De même, il faut interpréter les résultats des recherches d'anticorps anti-érythrocytaires en fonction de la chronologie des examens par rapport aux transfusions.

II.3- Auto-anticorps

La présence d'auto-anticorps (agglutinant toutes les hématies testées) entraîne essentiellement des difficultés de typages érythrocytaires et de recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI). Il convient de les adsorber sur hématies autologues (à condition qu'il n'y ait pas eu transfusion ou grossesse dans les 3 mois précédents) pour déceler un éventuel allo-anticorps masqué.

■ III. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Il faut dans un premier temps démontrer l'origine hémolytique de l'accident (taux d'hémoglobine, bilan biochimique...), puis mettre en évidence l'anticorps responsable.

III.1- Renseignements concernant le malade

Certains renseignements sont utiles, tels que : identification correcte, âge, sexe..., maladie du receveur, circonstances de l'accident et signes cliniques observés, quantité exacte de sang transfusé, horaire de la transfusion par rapport au prélèvement, nombre et rythme des transfusions antérieures, en signalant la date exacte de la dernière s'il s'agit d'un polytransfusé et le nombre de grossesses s'il s'agit d'une femme. Ces divers éléments permettront déjà d'orienter le diagnostic.

III.2- Prélèvements

Il est nécessaire de disposer d'un prélèvement pré-transfusionnel dans la mesure du possible et de deux prélèvements post-transfusionnels du receveur (un tube sec et un tube citraté), d'un échantillon du sang transfusé et d'un nouveau prélèvement du patient dix à quinze jours après l'accident.

III.3- Examens

Les examens à pratiquer sont le groupage sanguin ABO-RH1 et le phénotypage RH-KEL1 a minima du receveur ainsi que des unités transfusées, la RAI sur le sérum du receveur, l'épreuve directe de compatibilité au laboratoire (EDC) entre le sérum du receveur et les hématies des unités transfusées, le test direct à l'antiglobuline (DAT) et l'élution. Souvent, il n'y a pas de sang du receveur prélevé avant la transfusion et de ce fait, l'enquête au laboratoire est difficile car l'anticorps responsable de l'accident est absent ou à des taux infra-déTECTABLES, il a été consommé totalement ou partiellement.

Le DAT peut être fortement positif, faiblement positif ou négatif, mais dans tous les cas, il faut pratiquer une élution directe qui permettra d'étudier la spécificité de l'anticorps en cause vis à vis d'une gamme d'hématies-tests O et du sang transfusé, ainsi que vis-à-vis d'hématies-tests A et B.

■ IV. PRÉVENTION

Il faut éviter :

- la rencontre d'un antigène avec son anticorps spécifique (anti-ABO, autres anticorps anti-érythrocytaires) présents dans le sérum du receveur,
- le plus longtemps possible l'allo-immunisation du receveur afin de préserver son avenir transfusionnel s'il s'agit d'un patient devant recevoir des transfusions qu'elles soient ou non itératives et son avenir obstétrical s'il s'agit d'une femme,

➤ si le patient possède (ou a possédé) un anticorps anti-érythrocytaire, il est impératif de ne le transfuser qu'avec du sang phénotypé RH-KEL1 a minima et pour certains anticorps tels que anti-JK1, anti-FY1, l'apport d'hématies négatives pour l'antigène correspondant par ailleurs soumis à une EDC.

IV.1- Avant la transfusion sanguine

Il faut respecter certaines normes de sécurité qui sont légiférées.

IV.1.1- Prélèvement

Le prélèvement doit être assuré selon des règles bien définies et réalisé avec du matériel stérile à usage unique, de préférence sous vide.

Deux déterminations de groupes sanguins ABO-RH1 sont nécessaires pour l'attribution du sang. Par conséquent, cela nécessite deux prélèvements effectués à des moments réellement différents.

- Etiquetage des tubes

L'étiquetage des tubes contenant les échantillons de sang doit se faire par la personne qui a prélevé, immédiatement après le prélèvement, sur le lieu de prélèvement, en contrôlant l'identité du patient en la lui faisant décliner chaque fois que cela est possible. Les contrôles seront particulièrement vigilants chez les sujets ininterrogeables.

L'étiquette doit comporter les indications suivantes, bien orthographiées et de façon lisible (en script) : nom patronymique (ou de jeune fille), nom marital s'il y a lieu, prénom(s), date de naissance et sexe, date de prélèvement, et heure si nécessaire. L'heure du prélèvement est obligatoire en cas de demande de deux déterminations de groupes sanguins ABO-RH1 ou de phénotype RH-KEL1 sur deux prélèvements effectués le même jour, ou pendant une période de garde portant sur deux jours.

- Demande d'examen

Dans tous les cas, il convient de joindre au tube étiqueté une fiche d'accompagnement sur laquelle figureront, en plus des mentions déjà portées sur l'étiquette : la date et le nom du prescripteur, le nom de l'établissement de soins, le nom du service et la date de prélèvement, le nom, la qualité et la signature du préleveur et les examens à réaliser. Seront aussi fournis des renseignements complémentaires comme les antécédents de RAI positive, de transfusion (en préciser les dates) ou de grossesse, de réactions transfusionnelles, d'ictère, d'anémie, les pathologies et les traitements en cours...

Cas particulier des nouveau-nés

En supplément des renseignements précédents, il convient de mentionner l'identité complète de la mère et son statut immuno-hématologique : groupes sanguins ABO-RH1, phénotype RH-KEL1, résultat et date de la dernière RAI.

Lorsque l'identité fait défaut, est incomplète ou incertaine ou encore lorsque l'anonymat est souhaité, une procédure de lien : patient-échantillon de sang doit être mise en place.

IV.1.2- Analyses

Typages érythrocytaires

Tout typage érythrocytaire doit être réalisé à distance des transfusions (4 mois) sur un échantillon de sang anticoagulé conservé dans de bonnes conditions à + 4 °C.

Les réactifs utilisés doivent avoir fait l'objet d'un enregistrement auprès de l'AFSSAPS (dont le numéro est mentionné sur la fiche technique ou le contenant du réactif) et d'un contrôle par le CNRGS qui délivre un N° de conformité, ce dernier devant apparaître sur l'étiquette de conditionnement du réactif.

Groupage sanguin ABO-RH1

Depuis la parution de l'arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale, la définition du groupage ABO est désormais indissociable du phénotypage RH1 (Rh D) du système RH et sa réalisation indissociable du phénotype RH KEL1.

La réalisation du groupe ABO repose sur les deux épreuves complémentaires :

- épreuve globulaire
- épreuve sérique.

La détermination du groupe ABO-RH1 dépend de l'environnement technique du laboratoire :

- Si les conditions d'automatisation et d'information prévues à l'article IV de l'arrêté du 26 avril 2002, sont respectées de manière à diminuer le risque d'erreur humaine, de garantir la traçabilité et permettre le traitement et l'identification des échantillons, la gestion des réactifs et des supports de réactions (microplaque ou filtration), la préparation, la distribution des échantillons, des réactifs et des CQI, la lecture des réactions, le traitement des informations, le transfert automatique des résultats et la confrontation avec l'historique des résultats du patient, alors la détermination repose sur une réalisation par un technicien avec un lot de réactif et un lot d'hématies tests,
- Dans tous les autres cas, une détermination repose sur deux réalisations effectuées par deux techniciens différents.

La saisie manuelle des résultats doit comporter une double saisie effectuée par deux personnes différentes.

Des CQI sont obligatoires :

Pour ABO :

au minimum :

- un échantillon de groupe A
- un échantillon de groupe B
- un échantillon de groupe O

Pour le groupe RH1 au minimum :

- un échantillon RH : 1
- un échantillon RH : - 1

Un groupe ABO RH1 valide est réalisé sur deux prélèvements différents à raison d'une détermination par prélèvement.

Le phénotypage RH-KE1 (Rh-K)

La détermination dépend comme pour ABO-RH1 de l'environnement du laboratoire :

- En cas d'automatisation respectant les éléments de l'article IV de l'arrêté du 26 avril 2002, une réalisation par un technicien et un lot de réactifs,

- sinon, dans tous les autres cas, une détermination repose sur deux réalisations effectuées par deux techniciens différents.

Le phénotype Rh-KEL1 valide est réalisé sur deux prélèvements différents à raison d'une détermination par prélèvement.

Les CQI obligatoires sont exactement spécifiés par l'arrêté.

Les mêmes principes de détermination et de validation sont appliqués au phénotypage étendu.

Les CQI comprennent pour chaque spécificité, un échantillon négatif et un échantillon d'expression hétérozygote.

Lors de la réalisation du groupe ABO-RH1, en l'absence de résultats valides du phénotype RH-KEL1, le groupage ABO-RH1 est obligatoirement complété par un phénotypage RH-KEL1.

Indications

Il est obligatoire chez la femme enceinte au premier examen prénatal. Il est vivement recommandé chez les sujets de sexe féminin non ménopausés, les enfants et adultes jeunes devant recevoir des transfusions, les patients polytransfusés potentiels et les futurs transplantés.

Autres phénotypages

Ils sont conseillés chez les patients immunisés et les polytransfusés, vis-à-vis des antigènes des systèmes les plus immunogènes FY (FY1 et FY2), JK (JK1 et JK2) et MNS (MNS3 et MNS4).

RAI

Cette analyse doit être réalisée dans le cadre de la prévention des accidents immuno-hémolytiques transfusionnels :

- chez tout patient susceptible à court terme d'être transfusé ;
- chez le transfusé itératif, en bonne place au cours des séries de transfusions ;
- chez le patient transfusé dans le cadre du suivi post-transfusionnel préconisé par la réglementation.

Elle doit être réalisée en contexte de greffe ou transplantation.

Elle doit être réalisée en contexte pré ou périnatal conformément aux dispositions réglementaires relatives au suivi de la grossesse.

En l'absence de prescription, ces analyses doivent être réalisées à l'initiative du biologiste.

La validité est dans la majorité des cas de 3 jours maximum, elle doit être diminuée s'il y a eu transfusion récente ou en cas de grossesse.

La RAI est un examen de réalisation difficile. La RAI doit être effectuée sur des échantillons de sang prélevé depuis moins de 72 heures et conservés dans de bonnes conditions à + 4 °C. Le dépistage des anticorps et leur identification seront effectués par la technique de Coombs Indirect. La technique enzymatique sera utilisée lors de difficultés d'identification telles que les mélanges d'anticorps ainsi que lors des bilans d'accidents transfusionnels immunohémolytiques.

EDC

Elle assure une sélection immunologique *in vitro* des unités de sang destinées à un patient. Elle doit être réalisée impérativement pour tout patient possédant (ou ayant possédé) un ou plusieurs anticorps anti-érythrocytaires et chez le nouveau-né présentant un DAT positif ou né de mère allo-immunisée, ainsi que chez les patients possédant un phénotype érythrocytaire public négatif. Elle peut être recommandée pour le fœtus même en cas de RAI négative.

La préparation de sang compatible est une qualification réalisée par les laboratoires d'Immuno-hématologie de l'Etablissement Français du Sang à partir d'unités phénotypées RH-KEL1 a minima, dans les conditions similaires à celles pratiquées lors de la RAI. La préparation de sang compatible nécessite un échantillon de sang du patient prélevé depuis moins de 72 heures (voire moins en cas de transfusion récente ou de grossesse) et conservé dans de bonnes conditions.

IV.2- Au moment de la transfusion

Il faut pratiquer :

IV.2.1- Prélèvement pré-transfusionnel juste avant la transfusion et le conserver 72 heures au réfrigérateur après la transfusion : en cas d'accident hémolytique, il sera de grande utilité ;

IV.2.2- Contrôle pré-transfusionnel ultime au lit du malade. Il comprend :

Le contrôle administratif qui consiste à vérifier la concordance entre :

- l'identité du receveur et les noms, prénoms et date de naissance portés sur la carte de groupes sanguins ;
- les groupes sanguins mentionnés sur la carte et l'unité de sang.

Le contrôle immunologique ultime qui consiste à vérifier l'épreuve globulaire du groupe ABO du donneur et du receveur.

Ce contrôle permet d'éliminer les erreurs les plus fréquentes et les plus graves que représentent les incompatibilités ABO. Son incidence sur la diminution des accidents par incompatibilité ABO n'est plus à démontrer.

IV.3- Pendant et après la transfusion

Pendant toute la durée de la transfusion, il est nécessaire d'assurer une surveillance afin de déceler toute réaction anormale et d'arrêter immédiatement la transfusion si tel était le cas. Il faut vérifier l'absence d'hémoglobinurie dans les heures qui suivent la transfusion et l'absence d'ictère dans les 48 heures.

En raison de leur gravité, la prévention des accidents hémolytiques doit rester la préoccupation majeure des transfuseurs et de tous ceux qui gravitent autour de la transfusion.

BIBLIOGRAPHIE

1. Arrêté du 19 avril 1985 (JO du 30 mai 1985) relatif aux examens médicaux pré et postnatals.
2. Circulaire DGS/3B/552 du 17 mai 1985 relative à la prévention des accidents transfusionnels et des accidents d'allo-immunisation.
3. RACHEL J.M., PLAPP F.V. Bedside Blood Grouping *Med. Lab. Sci.*, 1990, 4, 330-336.
4. ROSSE W.F. *Clinical Immunohematology. Basic concepts and clinical applications.* Blackwell Sc. Publ. Boston, 1990.
5. SALMON CH., CARTRON J.P., ROUGER Ph. *Les groupes sanguins chez l'homme.* Paris, Masson, 1991, 2^e éd.
6. Décret n° 92-143 du 14 février 1992 (JO du 18 février 1992) relatif aux examens obligatoires prénuptial, pré et postnatal.
7. MOLLISON P.L. *Blod Transfusion in Clinical Medicine* Blackwell Oxford, 1993, 9th ed.
8. Arrêté du 4 août 1994 (JO du 26 août 1994) portant homologation du règlement de l'agence française du sang relatif aux bonnes pratiques de distribution et pris en application de l'article L 668-3 du code de la santé publique.
9. Arrêté du 2 novembre 1994 (JO du 4 décembre 1994) relatif à la bonne exécution des analyses. de biologie médicale
10. Arrêté du 4 janvier 1995 (JO du 31 janvier 1995) portant homologation du règlement de l'agence française du sang relatif aux bonnes pratiques de qualification biologique du don et pris en application de l'article L.668-3 du code de la santé publique
11. TISSIER A.M., LE PENNEC P.Y., HERGON E., ROUGER Ph. Les accidents immunologiques transfusionnels : analyse, risques et prévention. *Transf. Clin. Biol.* 1996, 3, 167-180.

PRINCIPES GÉNÉRAUX DE LA TRANSFUSION SANGUINE ET PRODUITS SANGUINS LABILES

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

■ INTRODUCTION

La transfusion sanguine consiste à injecter à un patient « le Receveur » le sang ou l'un de ses composants prélevés chez un « Donneur ». Le principe de la transfusion sanguine moderne est celui de l'hémothérapie sélective. Le patient va en effet recevoir uniquement le composant dont il a besoin. La transfusion sanguine est aujourd'hui très réglementée et chaque étape du processus transfusionnel (prélèvement, qualification biologique, préparation et distribution) doit répondre obligatoirement à un certain nombre de règles définies dans les bonnes pratiques transfusionnelles.

On peut diviser les produits sanguins en deux groupes : les produits sanguins labiles (PSL) qui font l'objet de notre propos et les produits sanguins stables. Ces derniers (albumine, Immunoglobulines polyvalentes ou spécifiques, facteurs de la coagulation...) sont préparés industriellement à partir du plasma et ont le statut de médicaments dérivés du sang. Ils font donc l'objet d'une Autorisation de mise sur le marché et sont distribués par le réseau pharmaceutique.

Les produits sanguins labiles sont quant à eux préparés et distribués par l'Etablissement Français du Sang. La liste et les caractéristiques de ces PSL sont définies par l'arrêté du 23 septembre 1994 portant homologation du règlement de l'Agence française du sang relatif aux caractéristiques de certains produits sanguins labiles pris en application de l'article L. 666-8 du code de la santé publique et modifiant les arrêtés du 27 septembre 1993, du 15 novembre 1993, du 5 avril 1994 et du 4 août 1994 portant homologation de règlements de l'Agence française du sang.

Quatre principaux produits sanguins labiles sont utilisés :

- Le concentré de globules rouges (CGR)
- Le plasma thérapeutique
- Le concentré plaquettaire
- Le concentré unitaire de granulocytes

Ces produits peuvent être d'origine autologue ou homologue. Nous n'évoquerons que les produits homologues.

Le sang total n'est quant à lui plus utilisé, y compris dans le cadre des exsanguino-transfusions du nouveau né qui sont réalisées en mélangeant un concentré globulaire et un plasma frais congelé.

Enfin il est important de noter que tous les PSL sont déleucocytés, depuis avril 1998 pour les produits cellulaires et pour le plasma à usage thérapeutique depuis le 15 avril 2001.

■ I. CARACTÉRISTIQUES PRINCIPALES DES PSL

I.1- Le concentré de globules rouges (CGR)

Le CGR est préparé à partir d'un don de sang total prélevé sur anticoagulant, après avoir soustrait le plasma et ajouté une solution de conservation qui est, dans la quasi totalité des cas, du SAG-Mannitol (mélange de chlorure de sodium, d'adénine, de glucose et de mannitol). Cela permet la conservation du CGR entre + 2 °C et + 8 °C pendant 42 jours à partir de la date du prélèvement. Le volume minimal de la poche de concentré globulaire adulte (CGA) est 225 ml. Le contenu minimal en hémoglobine est de 40g. L'hématocrite est compris entre 50 et 70 %. Le nombre total de leucocytes résiduels est inférieur à 10⁶ par poche.

I.2- Le plasma thérapeutique

Le plasma thérapeutique utilisé en France est prélevé par aphérèse. Deux types de produits sont disponibles :

- le plasma d'aphérèse sécurisé par quarantaine,
- le plasma viro-atténué par solvant détergent.

Un troisième type de plasma peut être utilisé : Le plasma « solidarisé ». La poche de plasma et la poche de CGR cédées proviennent du même donneur. L'utilisation de ce produit pose de très importants problèmes d'organisation et il est très peu utilisé.

I.2.1- Le plasma d'aphérèse sécurisé par quarantaine

Le principe de la sécurisation par quarantaine est simple. Un donneur donne son plasma à J0. A cette occasion les analyses biologiques et en particulier virologiques obligatoires à l'occasion du don du sang, sont réalisées. Si les résultats de ces analyses sont négatifs, le plasma congelé est mis en quarantaine. Lorsque le donneur revient donner son sang dans un délai supérieur à 120 jours par rapport au premier don, les analyses biologiques obligatoires lors de chaque don de sang sont à nouveau réalisées. Si les résultats de celles-ci sont négatifs, le plasma mis en quarantaine à J0 est alors considéré comme sécurisé et autorisé à la distribution. Ce procédé permet de couvrir le délai de séroconversion des principaux virus transmissibles par le sang.

La poche de plasma sécurisé se présente sous un volume habituel de 200 ml mais il peut également être conditionné en poche de 400 ml ou 600 ml. On peut donc préparer à partir d'un seul don de plasma par aphérèse chez un seul donneur, 3 poches de plasma thérapeutique.

I.2.2- Le plasma dit viro-atténué

Il est préparé à partir d'un mélange de plasmas provenant de 100 donneurs. Ce pool de plasmas subit un traitement par solvant détergent totalement efficace sur l'ensemble des virus enveloppés actuellement connus. La poche de plasma se présente également sous un volume de 200 ml.

Quel que soit le type de plasma utilisé, il s'agit d'un produit quasiment acellulaire. Le nombre de leucocytes résiduels est inférieur à 10⁴ par poche avant congélation. Le taux de

protéines doit être égal ou supérieur à 50 g/l. Les taux d'hémoglobine et de potassium doivent être inférieurs à 0,05 g/l et 5 mMoles/l. Les taux de facteurs V et VIII doivent être supérieurs à 70 % du taux normal.

Le plasma se conserve à une température inférieure ou égale à -25°C . pendant un an. Il doit être décongelé à $+37^{\circ}\text{C}$ pour une utilisation rapide, au plus tard dans les 6 heures qui suivent la décongélation.

I.3- Le concentré plaquettaire

Deux types de produits sont utilisés :

I.3.1- Le concentré plaquettaire standard (CPS) et le mélange de CPS

Ce produit est obtenu à partir d'un don de sang total après une double centrifugation ou à partir du buffy coat. La poche de CPS comporte un volume de plasma compris entre 25 ml et 60 ml et contient au minimum à $0,375 \times 10^{11}$ plaquettes dans le produit déleucocyté. Le pH du produit doit être compris entre 6 et 7,4.

Le mélange de concentrés de plaquettes déleucocyté est issu de différents dons de sang total non déleucocyté (12 au maximum) et de même groupe sanguin ABO. Il est obtenu par le regroupement de plusieurs concentrés de plaquettes standards suivi d'une déleucocytation ou par le regroupement de plusieurs buffy-coats suivi d'une extraction des plaquettes puis d'une déleucocytation. Habituellement, les MCP sont constitués de 5 à 6 CPS ou buffy-coats (moyenne $2,5$ à 3×10^{11} plaquettes) ce qui correspond quantitativement à un CPA (minimum 2×10^{11} plaquettes et $1,5 \times 10^{11}$ après déleucocytation).

I.3.2- Le concentré plaquettaire d'aphérèse (CPA)

La suspension plaquettaire est obtenue par apherèse. Elle consiste en une poche dont le volume ne doit pas dépasser 500 ml de plasma et qui contient une quantité minimum de $1,5 \times 10^{11}$ plaquettes.

I.3.3- Posologie

L'utilisation de concentrés plaquettaires nécessite, pour atteindre la dose thérapeutique qui, dans la plupart des cas, est de $0,5 \times 10^{11}$ plaquettes par 7 à 10 kg de poids chez l'adulte, le mélange de plusieurs unités de plaquettes standard. Le risque virologique résiduel est donc multiplié par le nombre de donneurs entrant dans la constitution de ce pool. A l'inverse l'utilisation de CPA a l'avantage de permettre le traitement d'un patient par un produit issu d'un seul donneur. Cependant les produits d'aphérèse sont rares et la plupart des Etablissements de Transfusion Sanguine sont régulièrement en pénurie de ce type de produit.

Les produits plaquettaires doivent être conservés avant utilisation entre $+20^{\circ}\text{C}$ et $+24^{\circ}\text{C}$, sous agitation douce et permanente. Ils se conservent ainsi pendant 5 jours à partir de la date du prélèvement.

I.4- Le concentré unitaire de granulocytes

Il est prélevé par cytophérèse à partir du sang circulant d'un seul donneur et contient au minimum 2.10^{10} granulocytes viables sous un volume maximum de 500 ml. La conservation de ce produit est au maximum de 12 heures à 22 °C.

■ II. RAPPEL SUR LES INDICATIONS DES PSL

Le CGR est utilisé pour corriger une anémie, responsable d'une hypoxie voire d'une anoxie tissulaire. L'intensité de l'anémie (jugée sur le taux d'hémoglobine) ne doit pas être le seul paramètre qui conduit à la prescription d'une transfusion de CGR et il est essentiel d'apprécier la tolérance clinique et les capacités d'adaptation du patient à l'anémie avant d'avoir recours à la transfusion.

Les indications du plasma thérapeutique ont été strictement limitées dans le cadre d'un arrêté du 3 décembre 1991. Le plasma thérapeutique ne peut être utilisé que dans trois indications : les coagulopathies graves de consommation, les hémorragies aiguës avec déficit global des facteurs de la coagulation et les déficits complexes en facteurs de la coagulation, lorsque les fractions coagulantes spécifiques ne sont pas disponibles.

Les produits plaquettaires sont utilisés pour corriger une thrombopénie sévère. Les indications essentielles sont la correction de thrombopénies centrales dans le cadre de chimiothérapie et de certaines thrombopathies en phase hémorragique.

Le concentré unitaire de granulocytes est d'utilisation rare. L'effet recherché est la restitution de la capacité phagocytaire chez un patient granulopénique pour traiter une infection microbienne grave. Ils sont surtout utilisés dans le cadre de granulopénies centrales profondes inférieures à $0,5 \times 10^9$ par litre avec espoir de réversibilité de l'aplasie et une infection documentée résistante à une antibiothérapie adaptée de plus de 48 heures.

■ III. QUALIFICATIONS ET TRANSFORMATIONS DES PSL

Les produits sanguins labiles peuvent faire l'objet de transformations ou de qualifications. Celles-ci sont définies par voie réglementaire dans les bonnes pratiques de préparation ou de distribution des produits sanguins labiles. Les qualifications comprennent : la qualification phénotypé, la qualification compatibilisé et la qualification CMV négatif. Les transformations comprennent : l'irradiation, la déplasmatisation, la réduction de volume et la cryoconservation.

Un document édité en novembre 1997 par l'ANAES décrit les caractéristiques et les indications de ces qualifications et transformations. Nous les rappelons brièvement.

III.1- Qualifications

III.1.1- Qualification phénotypé RH-KEL1 des CGR

Elle ne s'applique, en pratique, qu'aux CGR. Le produit est dit qualifié antigéno-compatible RH-KEL1 lorsqu'il est compatible pour les antigènes RH1, RH2, RH3, RH4, RH5 et KEL1.

La transfusion de concentrés globulaires antigéno-compatibles RH-KEL1 est obligatoire selon les textes légiférés dans les cas suivants :

- Chez les patients de sexe féminin, de la naissance jusqu'à la fin de la période procréatrice,
- Chez les patients déjà immunisés.

En dehors de ces indications la transfusion de CGR antigéno-compatibles RH-KEL1 n'est pas obligatoire. Toutefois, les antigènes impliqués dans cette qualification sont très immunogènes et sont responsables à eux seuls de plus de 90 % des allo-immunisations post transfusionnelles. Il paraît donc justifié d'essayer de respecter cette qualification chaque fois que le patient a une durée de vie raisonnable.

La qualification antigéno-compatible RH-KEL1 ne s'applique pas en théorie aux concentrés plaquettaires. En effet, les antigènes des systèmes RH et KEL ne sont pas exprimés au niveau des plaquettes. Dans certains cas, on peut toutefois observer des immunisations post transfusionnelles plaquettaires contre des antigènes de système RH ou KEL dues aux globules rouges résiduels présents dans les produits plaquettaires. Ceci est surtout le cas pour l'antigène RH1 et il est conseillé de respecter une compatibilité vis à vis de cet antigène. Dans le cas contraire, l'immunisation du receveur contre cet antigène peut être prévenue par l'injection d'une dose d'« immunoglobuline anti-D ». Pour les autres antigènes RH et l'antigène KEL1, le risque d'immunisation est beaucoup plus faible et ne justifie pas le respect de leur compatibilité.

Enfin, le respect de la compatibilité RH et KEL1 ne s'applique pas au plasma frais congelé qui est un produit totalement acellulaire.

III.1.2- Qualification phénotypé étendu des concentrés globulaires

Un CGR sera dit phénotypé étendu compatible à partir du moment où la compatibilité concerne au moins un autre antigène, en dehors des antigènes RH et KEL1 évoqués plus haut. La prescription de CGR phénotypés étendus compatibles est obligatoire dans les cas suivants :

- les patients immunisés contre un autre antigène que ceux des systèmes RH et KEL évoqués plus haut,
- dans le cadre d'immunisation complexe.

Afin de pouvoir respecter ces compatibilités, il est impératif de connaître le phénotype du patient. Nous rappelons que celui-ci doit être déterminé, pour éviter des erreurs, en dehors de toute période transfusionnelle (intervalle libre de quatre mois). Il est donc important de déterminer le phénotype RH-KEL1 de tout patient devant être transfusé et ce indépendamment du fait qu'il reçoive ou non des CGR antigéno-compatibles RH-KEL1. De la même façon, il est indispensable que tout patient possédant(ou ayant possédé) un anticorps immun ou présentant une pathologie susceptible d'entraîner des transfusions itératives au long cours, bénéficie d'un phénotypage étendu (FY1, FY2, JK1, JK2, MNS3, MNS4), là encore indépendamment du fait qu'il reçoive ou non des produits phénotypés étendus compatibles.

La qualification phénotype étendu n'est pas applicable aux concentrés plaquettaires ni au plasma thérapeutique.

III.1.3- Qualification phénotypée des concentrés plaquettaires

La qualification phénotypée peut être appliquée dans certains cas aux produits plaquettaires lorsque des produits compatibles sont sélectionnés en fonction de leur phénotype dans certains systèmes de groupe plaquettaire (HPA...) du fait de la présence chez le receveur d'un anticorps reconnaissant un de ces antigènes.

III.1.4- Qualification compatibilisée

Le produit globulaire est testé au laboratoire avec le sérum du patient et ce à l'aide de techniques aussi sensibles que celles de la RAI. L'épreuve directe de compatibilité au laboratoire (EDC) n'est utile que pour :

- mettre en évidence un anticorps reconnaissant un antigène de très faible fréquence qui ne serait pas présenté par les hématies des gammes d'hématies-tests utilisées lors de la recherche des anticorps anti-érythrocytaires (RAI),
- s'assurer de l'absence d'un allo-anticorps masqué par un autre anticorps identifié lors de la RAI .

L'EDC est légalement obligatoire dans les cas suivants :

- les patients immunisés,
- les nouveau-nés présentant un test direct à l'antiglobuline positif, que la mère présente ou non une RAI positive. Dans ce dernier cas, l'EDC doit être réalisée avec le sérum de la mère.

L'EDC est également recommandée chez les patients polytransfusés itératifs et chez la femme enceinte (situation d'immunisation privilégiée).

En dehors des cas que nous venons d'évoquer l'EDC n'apporte aucun gain sur le plan de la sécurité transfusionnelle.

Des tests de compatibilité plaquettaire peuvent être également réalisés le plus souvent par technique immuno-enzymatique dans le cadre de transfusions plaquettaires réfractaires.

III.1.5- Qualification CMV négatif (CMV-)

Un produit sanguin est dit qualifié CMV- lorsqu'il est préparé à partir du don d'un donneur chez qui on ne met pas en évidence d'anticorps anti-CMV par les techniques sérologiques. Toutefois des études récentes semblent démontrer que le risque de séro-conversion CMV après transfusion de produits sanguins labiles est identique que le patient ait reçu des produits déleucocytés CMV- ou seulement déleucocytés.

L'utilisation de produits sanguins labiles qualifiés CMV- n'est utile que dans les situations d'immuno-dépression profonde ou une infection par le cytomégalovirus peut entraîner des pathologies gravissimes voire mortelles :

- les périodes d'aplasie médullaire quelle que soit la cause ;
- la grossesse durant le premier trimestre.

En dehors de ces cas, l'utilisation de produits CMV- ne paraît pas justifiée.

Cette qualification ne concerne que les produits cellulaires (CGR, CPS ou CPA).

III.2- Transformations

III.2.1- Déleucocytation

Elle est aujourd'hui généralisée pour l'ensemble des PSL. Elle permet l'élimination de la quasi-totalité des globules blancs.

III.2.2- Irradiation

Elle ne concerne que les produits cellulaires (concentrés globulaires et plaquettaires). Les produits sont irradiés à l'aide d'un irradiateur Gamma par une dose comprise entre 25 et 45 Grays. L'irradiation des produits sanguins a pour but d'éviter la réaction du greffon contre l'hôte (GVH) post-transfusionnelle. La GVH post-transfusionnelle est une complication très grave de la transfusion liée à l'attaque des tissus du receveur par les lymphocytes résiduels contenus dans le produit sanguin. Celle-ci ne peut se produire que si le receveur est incapable de se défendre et présente une immuno-dépression profonde. Les indications des PSL irradiés sont donc strictement les mêmes que celles de PSL CMV-. Enfin l'irradiation est indispensable dans le cadre de don intra-familial pour des raisons immunologiques exceptionnelles.

III.2.3- Déplasmatisation

Elle peut concerner les concentrés globulaires et les produits plaquettaires. En effet, le concentré globulaire contient 20 à 30 ml de plasma résiduel et le milieu de suspension du produit plaquettaire est du plasma. Après déplasmatisation, la concentration des produits en protéines extracellulaires est inférieure ou égale à 1,5 g/l. Le produit doit être utilisé dans les 6 heures qui suivent la préparation.

Dans certaines situations il peut être important d'éliminer toute trace de protéine plasmatique des produits cellulaires. Ces situations sont les suivantes :

- réactions allergiques graves,
- déficits totaux en IgA et anticorps anti-IgA,
- hémophiles avec anticoagulant circulant,
- hémoglobinurie paroxystique nocturne (cette dernière indication est toutefois remise en question aujourd'hui).

III.2.4- Transformation « réduction de volume »

Dans certaines situations, il peut être utile d'enlever la solution de conservation et d'éliminer le surnageant des globules rouges au sein du concentré globulaire. Cette situation est rare et nous paraît justifiée seulement dans le cadre de l'amorçage de CEC (circulation extra-corporelle) chez les enfants jeunes et de petits poids.

Enfin, il peut être utile pour des raisons de volémie, de réduire la quantité de plasma présent dans les produits plaquettaires. La réduction de volume plasmatique des produits plaquettaires est extrêmement traumatisante pour le produit et réduit de façon certaine l'efficacité thérapeutique. Elle doit être donc strictement limitée aux cas indispensables.

III.2.5- La cryoconservation

Il est possible de conserver par exemple dans l'azote liquide (plus de dix ans) des produits globulaires ou plaquettaires de phénotypes très rares. La congélation des globules rouges nécessite l'addition d'un cryopréservateur (glycérol) qui sera éliminé par lavage après décongélation. Le produit décongelé doit être utilisé le plus rapidement possible et en tout cas dans les 24 heures qui suivent la décongélation pour les globules rouges.

■ CONCLUSION

La transfusion sanguine est une thérapeutique très efficace qui permet en France, de sauver chaque année plusieurs centaines de milliers de patients. Le prélèvement, la préparation, la qualification et la distribution des produits sanguins labiles doivent respecter des règles très strictes définies dans les bonnes pratiques transfusionnelles.

Cette thérapeutique n'en reste pas moins à risque dont le plus important est le risque immunologique. En effet toute transfusion homologue est par définition incompatible sur le plan immunologique. Ce risque, s'il ne peut être totalement éliminé, devra être limité au maximum grâce à la réalisation dans des conditions techniques optimales des analyses immuno-hématologiques indispensables, à leur interprétation sans faille, et au respect des règles de distribution définies dans l'arrêté du 4 Août 1994.

BIBLIOGRAPHIE

1. Arrêté du 5 novembre 1993 relatif aux caractéristiques des produits sanguins labiles.
2. Arrêté du 04 août 1994 (paru au JO du 26 août 1994) relatif aux bonnes pratiques de distribution.
3. ANAES. Indications et contre-indications des transfusions de PSL 1997.

LES ANÉMIES HÉMOLYTIQUES AUTO-IMMUNES

■ I. DÉFINITION

Les anémies hémolytiques auto-immunes (AHAI) représentent des pathologies modèles de l'auto-immunité. Elles sont définies par une anémie associée à la présence sur les hématies et/ou dans le plasma d'un auto-anticorps dirigé contre un ou des antigène(s) érythrocytaire(s). L'auto-anticorps est une immunoglobuline de type IgG, IgM ou plus rarement IgA. Les hématies recouvertes d'anticorps sont dites « sensibilisées », leur durée de vie est raccourcie. Ceci peut être mis en évidence par un marquage des hématies au Cr51, l'examen pouvant également révéler une séquestration splénique, hépatique ou mixte des globules rouges. L'hémolyse peut être intra-vasculaire et/ou tissulaire.

I.1- L'hémolyse tissulaire

Lorsque l'auto-anticorps est une IgG, son fragment Fc est reconnu par les macrophages de la rate, porteurs de récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines IgG1 et IgG3. L'hématie recouverte d'IgG est ainsi phagocytée, parfois partiellement, les fragments de membrane prennent alors une forme sphérique et sont secondairement phagocytés dans la rate.

Les auto-anticorps qui fixent le complément, tels que la plupart des auto-anticorps IgM, entraînent une phagocytose des hématies recouvertes de fragments du complément par les macrophages hépatiques porteurs d'un récepteur pour la fraction C3 du complément. L'inactivation de C3 aboutit à des globules rouges recouverts de C3d qui sont libérés dans la circulation et « protégés » par la présence de C3d, de la fixation de nouveaux fragments de C3.

I.2- L'hémolyse intra-vasculaire

Certains auto-anticorps qui fixent le complément, l'activent complètement de C1 à C9 et entraînent une hémolyse intra-vasculaire. Ce sont :

- les hémolysines biphasiques IgG,
- les agglutinines froides,
- les hémolysines chaudes à test direct à l'antiglobuline positif de type complément.

■ II. DIAGNOSTIC

Sur le plan clinique, outre les signes de l'anémie, le patient peut présenter un ictère, une splénomégalie ainsi que les manifestations d'une éventuelle pathologie sous-jacente associée.

Sur le plan biologique, la numération-formule sanguine montre l'anémie ainsi qu'une hyper réticulocytose, signe de régénération médullaire. Les autres examens recherchent des signes d'hémolyse, hyperbilirubinémie à bilirubine libre, LDH élevé, haptoglobine basse, hémoglobinémie, hémoglobinurie.

L'hémossidérinurie recherche quelques jours après la crise hémolytique, la présence de fer dans les cellules épithéliales des tubules rénaux.

Le test direct à l'antiglobuline et l'élution permettent la recherche de l'auto-anticorps et de sa spécificité.

II.1- Test direct à l'antiglobuline (DAT)

Il s'agit d'un test globulaire. Il recherche au moyen d'antiglobulines humaines (AGH), la présence sur les hématies, d'immunoglobulines et/ou des fractions du complément, en particulier la fraction C3d.

Les AGH polyvalentes sont des anticorps d'origine animale dirigés contre les Ig et le complément humain et agglutinent les hématies recouvertes de ces molécules. Ce sont des réactifs de dépistage qui indiquent la « sensibilisation » des hématies.

Les AGH spécifiques (anti-IgG, anti-C3d...) précisent le type d'immunoglobuline en cause. Lorsque l'auto-anticorps est une IgM, il y a en général une élution spontanée de l'auto-anticorps de la surface des hématies où l'on met alors en évidence la fraction inactive C3d du complément resté fixé à la membrane érythrocytaire. Le DAT de type complément peut être associé à la présence dans le sérum, d'auto-anticorps IgM appelés agglutinines froides, à un titre pathologique.

Parfois, malgré un contexte très évocateur d'AHAI, le DAT est négatif. Il peut s'agir d'un auto-anticorps de type IgA qu'on peut mettre en évidence au moyen d'une AGH spécifique anti-IgA.

L'auto-anti-IgA peut occasionner une hémolyse sévère, comme cela est rapportée par Beckers et Girelli, la spécificité étant anti-RH5 dans les deux publications.

L'anticorps peut être de faible affinité. Biagi et coll. rapportent le cas d'un enfant de 5 mois avec une AHAI à DAT positif de type IgG. Le DAT se négative malgré l'aggravation de l'hémolyse sous traitement. Le lavage des hématies à + 4 °C permet de retrouver un DAT très positif de type IgG. Les auteurs avancent l'hypothèse d'un anticorps de faible affinité dont la dissociation est réduite par le lavage à + 4 °C permettant de mettre en évidence le DAT positif.

La négativité du DAT peut être liée à un faible nombre de molécules fixées sur les hématies. L'utilisation de nouveaux procédés tel que la filtration a amélioré la sensibilité de la technique, surtout pour le DAT de type IgG. La cytométrie en flux semble également intéressante. Cette augmentation de la sensibilité peut être à l'origine de DAT positif, sans

anémie ou hémolyse ou qui reste positif malgré la résolution de l'hémolyse. Enfin, le DAT négatif peut être lié à une transfusion récente du patient.

II.2- Élu­tion directe

Ce test permet par des méthodes thermiques ou chimiques, de détacher l'anticorps des hématies. L'éluat comportant l'anticorps est testé vis-à-vis d'hématies-tests afin de déterminer la spécificité de l'auto-anticorps.

II.3- Tests sériques

L'auto-anticorps est également recherché dans le plasma. Sa présence peut rendre difficile la recherche d'allo-anticorps liés à une immunisation transfusionnelle ou foeto-maternelle.

Les agglutinines froides sont titrées afin de déterminer leur caractère pathologique (titre ≥ 32).

II.4- Traitements enzymatiques

Les hématies-tests traitées par enzymes peuvent contribuer à préciser la spécificité de l'auto-anticorps, comme l'auto-anti-Pr, auto-anticorps de type IgM. Certains auto-anticorps anti-érythrocytaires pourraient reconnaître d'autres cellules. Cartron et coll. rapportent un cas d'auto-anti-i IgM avec DAT positif de type complément chez une patiente atteinte d'un lymphome de haut grade avec une neutropénie auto-immune liée à la fixation de l'auto-i sur les polynucléaires neutrophiles.

■ III. MÉCANISMES PHYSIO-PATHOGÉNIQUES

Les mécanismes exacts de survenue des AHAI ne sont pas connus. Une réduction des lymphocytes TH1 et une prédominance des lymphocytes TH2 ainsi que des taux élevés de TGF β (transforming growth factor β) ont été notés.

Le groupe tissulaire HLA DQ6 présente une association négative avec l'hémolyse auto-immune et le DAT positif et pourrait être un antigène de résistance aux auto-anticorps anti-érythrocytaires ayant un impact clinique.

De Angelis et coll. rapportent une diminution significative des bandes 3, 4.1 et 4.2 chez les patients avec AHAI et proposent l'hypothèse de modifications membranaires consécutives aux interactions auto-anticorps / auto-antigènes à l'origine de modifications semblables à certains déficits décrits dans les anémies hémolytiques héréditaires.

■ IV. POPULATIONS TOUCHÉES

Les AHAI touchent des sujets de tout âge. L'atteinte pourrait même survenir in utero. Erler et coll. rapportent un cas d'auto-anticorps avec DAT positif de type IgG chez un nouveau-

né dont la mère n'a ni allo-anticorps ni auto-anticorps. Dans ce cas, le DAT positif ne s'accompagne pas d'hémolyse et est résolutif dans un délai de 6 mois.

■ V. ANTIGÈNES CIBLES

Les antigènes cibles des auto-anticorps anti-érythrocytaires sont souvent des antigènes de grande fréquence, présents chez la plupart des sujets. De ce fait, la transfusion est fréquemment peu efficace dans les AHAI. Certains auto-anticorps ont une spécificité plus restreinte, en particulier pour des antigènes du système RH. La spécificité de l'auto-anticorps peut varier au cours de l'évolution de la maladie (par exemple un auto-anti-RH5 évoluera vers un anticorps anti-RH de large spécificité) ainsi que la nature de l'anticorps (par exemple IgM anti-I1 puis IgG anti-RH large).

V.1- Auto-anticorps IgG

Ce sont habituellement des IgG polyclonales, les IgG monoclonales étant rares.

- l'antigène cible est souvent un antigène de grande fréquence du système RH,
- la spécificité RH peut être plus restreinte : anti-RH5, anti-RH7, anti-RH3...

Certains auto-anticorps auto-anti-RH5 peuvent être absorbés par des hématies qui n'ont pas l'antigène RH5, ce sont des « anti-RH5 like ».

- des antigènes de spécificités non RH peuvent être les cibles de l'auto-anticorps : Wrb, MNS5, Ena, Ku, KEL13, KEL4...
- L'IgG anti-P

C'est un auto-anticorps hémolysant biphasique. Il se fixe à froid sur les hématies. Lors du réchauffement, il active le complément qui provoque l'hémolyse des globules rouges. Le DAT est positif avec l'anti-C3d. La première description de Donath et Landsteiner est celle de l'hémoglobinurie paroxystique a frigore dans le cadre d'une infection tréponémique.

D'autres infections peuvent s'accompagner de ce type d'auto-anticorps, surtout les infections de la sphère ORL chez l'enfant qui représentent le cas le plus fréquent de nos jours.

V.2- Auto-anticorps IgM

V.2.1- IgM froides

Les antigènes cibles les plus fréquents sont I1 (I) et I2 (i), cibles des agglutinines froides. L'auto-anticorps IgM peut induire une hémolyse intra-vasculaire on l'appelle alors hémolysine froide.

Parmi les antigènes cibles, d'autres spécificités peuvent se voir :

- AI1, BI1, HI1,
- AI2, BI2, I1P1,

- Pr, antigène détruit par les protéases,
- Gd, antigène détruit par la neuraminidase.

V.2.2- IgM chaudes

Ces auto-anticorps fixent le complément sur la membrane érythrocytaire et peuvent induire une hémolyse in vitro à + 37 °C (hémolysine chaude). L'AHAI est souvent sévère, le DAT est positif de type C3d. Les antigènes cibles peuvent être ceux rencontrés avec d'autres types d'auto-anticorps comme le rapportent Garraty et coll. qui décrivent 3 cas d'AHAI sévères par auto-anticorps chaud de type IgM dirigés contre des antigènes cibles associés à la glyphorine A : Ena, Wrb et Pr.

V.3- Spécificités rares

D'autres antigènes cibles, moins courant ont été décrits : KEL1, JK1, MNS1, MNS2, LE1, VEL...

■ VI. CLASSIFICATION DES AHAI ET PATHOLOGIES ASSOCIÉES

VI.1- Classification

De façon simplifiée, quatre types d'AHAI sont décrits :

- IgG
- IgG + C3d (mixte)
- C3d
- Agglutinines froides (AF).

Les AHAI les plus fréquentes sont de type IgG ou mixte. Elles sont idiopathiques dans plus de la moitié des cas. Les pathologies associées sont fréquemment les proliférations lymphoïdes ou les connectivites. Les crises hémolytiques sont sensibles à la corticothérapie qui peut induire la rémission. La présence de C3d sans IgG, avec ou sans AF, est souvent associée à une pathologie sous-jacente, volontiers maligne. La corticothérapie est peu active sur l'hémolyse.

La maladie chronique des AF, liée à un auto-anticorps IgM monoclonal, actif à froid, de spécificité anti-I1 ou anti-I2 ou anti-Pr, est plus fréquente chez les sujets âgés. Elle induit une hémolyse chronique associée à des phénomènes ischémiques des extrémités. L'exposition au froid peut déclencher une hémolyse aiguë intra-vasculaire. La maladie peut être associée à une prolifération lymphoïde telle que la Maladie de Waldenström. Le DAT est positif de type C3d. La corticothérapie est peu active sur l'hémolyse qui peut nécessiter un traitement par chlorambucil voire des chimiothérapies plus intensives. Etant donné l'âge des patients et la gravité des crises d'hémolyse, il est fréquent de transfuser.

VI.2- Pathologies associées

VI.2.1- Infections

Divers états infectieux peuvent s'accompagner d'un auto-anticorps anti-érythrocytaire pouvant induire une hémolyse. Le virus EBV et un auto-anti-I2 IgG, *Mycoplasma pneumoniae* et un auto-anti-I1 IgM sont des associations très classiques. Ces auto-anticorps disparaissent lors de la guérison.

Les infections de la sphère ORL chez l'enfant peuvent s'accompagner d'un auto-anticorps IgG anti-P avec DAT positif de type C3d. L'hémolyse brutale intra-vasculaire est souvent sévère mais d'évolution favorable sous corticothérapie.

Konig et coll. rapportent un cas d'AHAI par AF de type IgG λ monotypique anti-Pr, chez un petit garçon de 5 ans atteint de rubéole. Sanchis Cervera et coll. décrivent un cas d'AHAI à auto-anti-RH1+2 lors d'une infection primaire par le virus VZ. Kuo et coll. rapportent un cas d'AHAI lors d'une miliaire tuberculeuse avec anémie à 5 g/dl d'hémoglobine, résolutive sous traitement anti-tuberculeux, sans corticothérapie ni transfusion.

Malgré une fréquence élevée de DAT positif, l'hémolyse auto-immune est rare dans l'infection HIV. De Angelis et coll. rapportent cependant un cas d'AHAI mixte à auto-anticorps froid anti-I1 et auto-anticorps chaud de large spécificité chez un sujet atteint de HIV.

L'AHAI peut s'observer lors d'une infection à CMV chez le sujet sain. Salloum et coll. rapportent le cas de 2 patients infectés par le CMV et atteints d'AHAI. Cette étiologie pourrait être sous-estimée, la sérologie CMV n'étant pas toujours réalisée dans ce cadre.

L'AHAI associée au virus HCV est surtout notée lors du traitement par l'interféron alpha (IFN α). Moccia et coll. rapportent un cas d'AHAI chez un patient infecté par le VHC et non traité par l'IFN α et suggèrent le rôle du virus dans la survenue de l'AHAI.

Des AHAI après vaccination ont été également rapportées. Seltsam et coll. rapportent 2 cas de ce type. Chez une petite fille de 20 mois ayant présenté une hémolyse, deux semaines après un vaccin polio oral puis 7 mois plus tard après un vaccin ROR. Le DAT est positif de type C3d. Le 2^e cas est celui d'un petit garçon de 21 mois qui va présenter une AHAI à DAT très positif de type IgG et faiblement positif de type complément, après un vaccin combiné diphtérie, tétanos, coqueluche, polio, hémophilus influenzae b et hépatite B.

VI.2.2- Tumeurs

Les tumeurs de l'ovaire telles que kystes dermoïdes, tératomes, carcinomes peuvent s'accompagner d'AHAI, ainsi que d'autres tumeurs, médiastinales, mésentériques, caecales, rénales, l'ablation de la tumeur guérissant l'hémolyse.

Le thymome associé à l'AHAI est également rapporté.

VI.2.3- Proliférations lymphoïdes

- La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) peut s'accompagner d'un auto-anticorps de type IgG ou mixte. Støger et coll. rapportent 2 cas où les auto-anticorps anti-érythrocytaires sont produits par les clones pathologiques de lymphocytes B.
- Le syndrome lymphoprolifératif auto-immun, est une maladie rare, associée à une anomalie transmissible du gène FAS ou d'autres gènes régulateurs de l'apoptose des lymphocytes. Le syndrome tumoral est associé à une AHAI et d'autres cytopénies. Le DAT est positif dans plus de 60 % des cas et peut contribuer à la détection de sujets atteints dans une famille.
- Les lymphomes non Hodgkiniens (LNH) en particulier ceux de faible grade,
- La maladie de Hodgkin.

VI.2.4- Syndromes myélodysplasiques (MDS)

Un taux élevé d'antigène Fas soluble chez les patients avec MDS et l'inhibition du signal d'apoptose peut être responsable de l'accumulation excessive de lymphocytes B réactifs. Les patients atteints d'anémie réfractaire et d'anémie avec ring sidéroblastes ont une incidence plus élevée d'auto-anticorps et d'allo-anticorps, souvent sans hémolyse significative sur le plan clinique ou biologique. Le DAT est positif de type IgG, plus rarement C3d ou IgA.

VI.2.5- Hémoglobinopathies

Grainger rapporte le cas d'une fillette de un an atteinte de β thalassémie majeure et d'une hémolyse avec DAT fortement positif de type C3d et faiblement de type IgG, sans présence d'allo-anticorps. L'hémolyse disparaît lors du conditionnement à la transplantation médullaire.

VI.2.6- Connectivites

- Le Lupus érythémateux disséminé est une association classique à l'AHAI de type IgG ou mixte. Une thrombopénie auto-immune peut accompagner l'AHAI, on parle alors de syndrome d'Evans.
- La polyarthrite rhumatoïde,
- Panzarino et coll. rapportent un cas de maladie de Kawasaki chez un enfant de 2 ans, avec une AHAI à DAT fortement positif de type IgG et faiblement de type C3d, de spécificité anti-Ena et anti-Pr.
- Le syndrome de Sjögren,
- La dermatomyosite.

VI.2.7- Greffe de cellules souches hématopoïétiques

Une AHAI peut s'observer dans ce cadre, surtout lorsque le greffon est T déplété. L'AHAI est fréquemment sévère et parfois réfractaire à toute stratégie thérapeutique. Cwynarski et coll. rapportent 9 cas d'AHAI chez 58 patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) et greffés avec un greffon T déplété de donneurs non apparentés. L'auto-anticorps est de type chaud, de spécificité anti-RH. La survenue de l'AHAI est corrélée à celle d'une

rechute de l'hémopathie ou d'un chimérisme avec présence d'une hématopoïèse de type receveur. Cinq patients reçoivent des injections de lymphocytes de leur donneur. Dans les 3 cas de rémission moléculaire avec restauration d'un chimérisme total de type donneur, l'hémolyse disparaît.

VI.2.8- Sphère digestive

L'AHAI peut être associée à des colites ulcéreuses. Le traitement est étiologique, l'hémolyse étant contrôlée avec le traitement de la colite.

VI.2.9- Sujets sains et DAT positif

Win et coll. ont trouvé chez 42 donneurs de sang testés sur 474 545 sujets, un DAT positif, ces donneurs présentant également des auto-anticorps anti-phospholipides sans manifestations cliniques.

■ VII. HÉMOLYSE ET MÉDICAMENT

Certains médicaments comme l'alpha-méthyl dopa sont à l'origine d'un authentique auto-anticorps anti-érythrocytaire responsable d'une AHAI. L'alpha-méthyl dopa est un anti-hypertenseur qui peut induire chez environ 20 % des sujets traités, un DAT positif de type IgG. D'autres auto-anticorps (anti-noyaux, facteur rhumatoïde...) peuvent être associés à l'auto-anticorps anti-érythrocytaire. Cet état auto-immunitaire disparaît lentement à l'arrêt du médicament.

La relation pathologie/traitement/AHAI n'est pas toujours simple. La LLC est une pathologie associée aux auto-anticorps anti-érythrocytaires. La LLC traitée par fludarabine peut se compliquer d'une AHAI, comme rapportée par Vick et coll. et Tertian et coll., l'hémolyse s'avérant mortelle dans le cas des derniers. Le DAT est positif de type mixte dans les deux publications. La 2 chlorodéoxyadénosine (2 CdA) est déconcertante. Ce médicament de la LLC, peut supprimer le processus hémolytique chez certains patients et contribuer à l'AHAI chez d'autres !. Le DAT peut s'avérer positif dans d'autres cas d'hémolyses médicamenteuses, par exemple :

* avec certains AINS :

- le Sulindac induit une hémolyse avec DAT positif de type IgG, par interaction avec des molécules du système RH,

- le Diclofenac induit une hémolyse avec DAT positif de type mixte en générant en plus des anticorps anti-médicaments, des auto-anticorps anti-érythrocytaires,

* avec la carboplatine, rapportée par Marani et coll. où l'hémolyse s'accompagne d'un DAT positif soit de type IgG soit de type C3d. Les auteurs suggèrent un mécanisme combinant des complexes immuns, l'adsorption du médicament et des auto-anticorps.

• antibiotiques :

• Unasyn (ampicilline et inhibiteur de β lactamase) peut induire hémolyse et DAT positif,

• céphalosporines.

■ VIII. TRAITEMENTS DES AHAI

Ils comprennent la corticothérapie, les immunoglobulines intra-veineuses, la splénectomie et les immunosuppresseurs. La transfusion peut s'avérer nécessaire en cas d'anémie sévère compromettant l'oxygénation d'organes « nobles », mais les hématies transfusées peuvent avoir également une durée de vie raccourcie lorsque l'auto-anticorps a une spécificité « large » ou lorsque la transfusion est forcément incompatible (par exemple avec des hématies RH2 chez un sujet homozygote avec auto-anti-RH2) pour éviter une allo-immunisation, l'allo-anticorps étant plus « nocif » que l'auto-anticorps pour l'avenir transfusionnel du patient.

BIBLIOGRAPHIE

1. SALMON C, CARTRON J.P., ROUGER P. Les groupes sanguins chez l'homme, Ed. Masson, 1991.
2. MEYER F., GARIN L., SMATI C., GASPARD M., GIANNOLI C., RIGAL D. Application du gel test utilisant une antiglobuline anti-IgA au diagnostic immunologique d'anémie hémolytique auto-immune à test de Coombs direct négatif, *Transfus Clin Biol* 1999, 6(4), 221-226.
3. BECKERS E.A., VAN GULDENER C., OVERBEEKE M.A., VAN RHENEN D.J. Intravascular hemolysis by IgA red cell autoantibodies. *Neth J Med* 2001, 58 (5), 204-207.
4. GIRELLI G., PERRONE M.P., ADORNO G., ARISTA M.C., COLUZZI S., DAMICO C. et al. A second example of hemolysis due to IgA autoantibody with anti-e specificity. *Haematologica* 1990, 75(2), 182-183.
5. BIAGI E., ASSALI G., ROSSI F., JANKOVIC M., NICOLINI B., BALDUZZI A. A persistent severe autoimmune hemolytic anemia despite apparent direct antiglobulin test negativization. *Haematologica* 1999, 84(11), 1043-1045.
6. DITTMAR K., PROCTER J.L., CIPOLONE K., NJOROGE J.M., MILLER J., STRONCE D. F. Comparison of DATs using traditional tube agglutination to gel column and affinity column procedures. *Transfusion* 2001, 41(10), 1258-1262.
7. SALAMA A., KROLL H., WITTMANN G., MUELLER – ECKHARDT C. Diclofenac-induced immune haemolytic anaemia : simultaneous occurrence of red blood cell autoantibodies and drug-dependent antibodies. *Br J Haematol* 1966, 95(4), 640-644.
8. ALVAREZ A., RIVES S., MONTOTO S., SANZ C., PEREIRA A. Relative sensitivity of direct antiglobulin test, antibody's elution and flow cytometry in the serologic diagnosis of immune hemolytic transfusion reactions. *Haematologica* 2000, 85(2), 186-188.
9. KERR R., RAWLINSON P.S., CACHIA P.G. Direct antiglobulin test negative, non spherocytic autoimmune haemolytic anaemia. *Clin Lab Haematol* 2000, 22(6), 365-367.

10. CARTRON J., FIOR R., BOUE F., TERTIAN G., GANE P., CARTRON J.P. Non Hodgkin's lymphoma presenting as neutropenia related to an IgM monoclonal anti-i antibody. *Hematol Cell Ther* 1996, 38(2), 225-230.
11. BARCELLINI W., CLERICI G., MONTESANO R., TAIOLI E., MORELATI F., REBULL P. et al. In vitro quantification of anti-red blood cell antibody production in idiopathic autoimmune haemolytic anaemia : effect of mitogen and cytokine stimulation. *Br J Haematol* 2000, 111(2), 452-460.
12. WANG-RODRIGUEZ J., REARDEN A. Reduced frequency of HLA-DQ6 in individuals with a positive direct antiglobulin test. *Transfusion* 1996, 36(11-12), 979-984.
13. DE ANGELIS V., DE MATTEIS M.C., COZZI M.R., FIORIN F., PRADELLA P., STEFFAN A. et al. Abnormalities of membrane protein composition in patients with autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 1996, 95(2), 273-277.
14. ERLER B.S., SMITH L., McQUISTON D., PEPKOWITZ S.H., GOLDFINGER D. Red cell autoantibody production in utero : a case report. *Transfusion* 1994, 34(1), 72-74.
15. MORIO A., KOBAYASHI D., HAYASAKA K., SAITO K., YAMANE K., SASAKI M. et al. Antibody mimicking an anti-E antibody that binds to patient's E negative red cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999, 21(2), 221-231.
16. GOTTSCHKE B., SALAMA A., MUELLER-ECKHARDT C. Donath-Landsteiner autoimmune hemolytic anemia in children. A study of 22 cases. *Vox Sang* 1990, 54(4), 281-286.
17. GARRATTY G., ARNDT P., DOMEN R., CLARKE A., SUTPHEN – SHAW D., CLEAR J. et al. Severe autoimmune hemolytic anemia associated with IgM warm autoantibodies directed against determinants on or associated with glycophorin A. *Vox Sang* 1997, 72(2), 124-130.
18. SOKOL R.J., BOOKER D.J., STAMPS R., WALEWSKA R. Cold haemagglutinin disease : clinical significance of serum haemolysins. *Clin Lab Haematol* 2000, 22(6), 337-344.
19. KONIG A.L., SCHABEL A., SUGG U., BRAND U., RÖELCKE D. Autoimmune hemolytic anemia caused by IgG lambda monotypic cold agglutinins of anti-Pr specificity after rubella infection. *Transfusion* 2001, 41(4), 488-492.
20. SANCHIS CERVERA J., CARBONELL UBEROS F. Autoimmune hemolytic anemia with anti-DC specificity following a primary infection by Varicella virus. *Haematologica* 1997, 82(4), 508-509.
21. KUO P.H., YANG P.C., KUO S.S., LUH K.T. Severe immune hemolytic anemia in disseminated tuberculosis with response to antituberculosis therapy. *Chest* 2001, 119(6), 1961-1963.
22. DE ANGELIS V., BIASINUTTO C., PRADELLA P., VACCHER E., SPINA M., TIRELLI U. Clinical significance of positive direct antiglobulin test in patients with HIV infection. *Infection* 1994, 22(2), 92-95.

23. TELEN M.J., ROBERTS K.B., BARTLETT J.A. HIV associated autoimmune hemolytic anemia : report of a case and review of the literature. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990, 3(10), 933-937.
24. DE ANGELIS V., BIASINUTTO C., PRADELLA P., ERRANTE D. Mixed type autoimmune haemolytic anaemia in a patient with HIV infection. *Vox Sang* 1995, 68(3), 191-194.
25. SALLOUM E., LUNDBERG W.B. Hemolytic anemia with positive direct antiglobulin test secondary to spontaneous cytomegalovirus infection in healthy adults. *Acta Haematol* 1994, 92(1), 39-41.
26. MOCCIA F., TOGNONI E., BOCCACCIO P. Autoimmune hemolytic anemia in chronic hepatitis C virus infection : an unusual extrahepatic autoimmune manifestation. *Ann Ital Med Int* 2001, 16(4)Y, 256-259.
27. SELTSAM A., SHUKRY – SCHULZ S., SALAMA A. Vaccination-associated immune hemolytic anemia in two children. *Transfusion* 2000, 40(8), 907-909.
28. RENNENBERG R.J., PAUWELS P., VALSVELD L.T. A case of thymoma-associated autoimmune haemolytic anaemia. *Neth J Med* 1997, 50(3), 110-114.
29. STHOEGER Z.M., STHOEGER D., SHTALRID M., SIGLER E., GELTNER D., BERREBI A. Mechanism of autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 1993, 43(4), 259-264.
30. CARTER L.B., PROCTER J.L., DALE J.K., STRAUS S.E., CANTILENA C.C. Description of serologic features in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Transfusion* 2000, 40(8), 943-948.
31. STRONCEK D.F., CARTER L.B., PROCTER J.L., DALE J.K., STRAUS S.E. RBC autoantibodies in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Transfusion* 2001, 41(1), 18-23.
32. TIMURAGAOGLU A., DUMAN A., ONGUT G., SAKA O., KARADOGAN I. The significance of autoantibodies in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2000, 40(1-2), 119-122.
33. BRADY-WEST D.C., THAME J., WEST W. Autoimmune haemolytic anaemia, immune thrombocytopenia, and leucopenia. An unusual presentation of Hodgkin's disease. *West Indian Med J* 1997, 46(3), 95-96.
34. KONDO H., OYAMADA T., MORI A., SUMI H., KUROSU K., KAJII E. et al. Direct-antiglobulin-test-negative immune haemolytic anaemia and thrombocytopenia in a patient with Hodgkin's disease. *Acta Haematol* 2001, 105(4), 233-236.
35. KATSUKI K., SHINOHARA K., KAMEDA N., YAMADA T., TAKEDA K., KAMEI T. Two cases of myelodysplastic syndrome with extra-medullary polyclonal plasma cell proliferation and autoantibody production : possible role of soluble Fas antigen for production of excessive self-reactive B cells. *Intern Med* 1998, 37(11), 973-977.

36. NOVARETTI M.C., SOPELETE C.R., VELLOSO E.R., ROSA M.F., DORLHIAC-LLACER P.E., CHAMONE D.A. Immunohematological findings in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* 2001, 105(1), 1-6.
37. GRAINGER J.D., MAKAR Y., McMANUS A., WYNN R. Refractory hyperhaemolysis in a patient with beta-thalassaemia major. *Transfus Med* 2001, 11(1), 55-57.
38. PANZARINO V., ESTRADA J., BENSON K., POSTOWAY N., GARRATY G. Autoimmune hemolytic anemia after Kawasaki disease in a child. *Int J Hematol* 1993, 57(3), 259-263.
39. RAMAKRISHNA R., CHAUDHURI K., STURGESS A., MANOHARAN A. Haematological manifestations of primary Sjogren's syndrome : a clinicopathological study. *Q J Med* 1992, 83 (303), 547-554.
40. CHANG D.K., YOO D.H., KIM T.H., JUN J.B., LEE I.H., BAE S.C. et al. Induction of remission with intravenous immunoglobulin and cyclophosphamide in steroid-resistant Evans' syndrome associated with dermatomyositis. *Clin Rheumatol* 2001, 20(1), 63-66.
41. HASHIMOTO C. Autoimmune hemolytic anemia. *Clin Rev Allergy Immunol* 1998, 16(3), 285-295.
42. CWYNARSKI K., GOULDING R., POCOCCO C., DAZZI F., CRADDOCK C., KAEDA J. et al. Immune haemolytic anaemia following T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia : association with leukaemic relapse and treatment with donor lymphocyte infusions. *Bone Marrow Transplantation* 2001, 28(6), 581-586.
43. RAMAKRISHNA R., MANOHARAN A. Auto-immune haemolytic anaemia in ulcerative colitis. *Acta Haematol* 1994, 91(2), 99-102.
44. WIN N., ISLAM S.I., PETERKIN M.A., WALKER I.D. Positive direct antiglobulin test due to antiphospholipid antibodies in normal healthy blood donors. *Vox Sang* 1997, 72(3), 182-184.
45. VICK D.J., BYRD J.C., BEAL C.L., CHAFFIN D.J. Mixed-type autoimmune hemolytic anemia following fludarabine treatment in a patient with chronic lymphocytic leukemia/small cell lymphoma. *Vox Sang* 1998, 74(2), 122-126.
46. TERTIAN G., CARTRON J., BAYLE C., RUDENT A., LAMBERT T., TCHERNIA G. Fatal intravascular autoimmune hemolytic anemia after fludarabine treatment for chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther* 1996, 38(4), 359-360.
47. ROBAK T., BLASINSKA-MORAWIEC M., KRYKOWSKI E., HELLMANN A., KONOPKA L. Autoimmune haemolytic anaemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia treated with 2-chlorodeoxyadenosine (cladribine). *Eur J Haematol* 1997, 58(2), 109-113.
48. ANGELES M.L., REID M.E., YACOB U.A., CASH K.L., FETTEN J.V. Sulindac-induced immune hemolytic anemia. *Transfusion* 1994, 34(3), 255-258.

49. MARANI T.M., TRICH M.B., ARMSTRONG K.S., NESS P.M., SMITH J., MINNITI C. et al. Carboplatin-induced immune hemolytic anemia. *Transfusion* 1996, 36(11-12), 1016-1018.
50. GARRATY G., ARNDT P.A. Positive direct antiglobulin tests and haemolytic anaemia following therapy with beta-lactamase inhibitor containing drugs may be associated with nonimmunologic adsorption of protein onto red blood cells. *Br J Haematol* 1998, 100(4), 777-783.
51. LEONG C.F., CHEONG S.K., FADILAH S.A. Positive direct antiglobulin test with Unasyn – a case report. *Med J Malaysia* 1999, 54(4), 517-519.
52. CHAMBERS L.A., DONOVAN L.M., KRUSKALL M.S. Ceftazidime- induced hemolysis in a patient with drug-dependant antibodies reactive by immune complex and drug adsorption mechanisms. *Am J Clin Pathol* 1991, 95(3), 393-396.
53. GALLAGHER N.I., SCHERGEN A.K., SOKOL – ANDERSON M.L., SHEAHAN E.J., CHAPLIN H. Sever immune-mediated hemolytic anemia secondary to treatment with cefotetan. *Transfusion* 1992, 32(3), 266-268.
54. EHMANN W.C. Cephalosporin-induced hemolysis : a case report and review of the literature. *Am J Hematol* 1992, 40(2), 121-125.

TECHNOLOGIES ACTUELLES EN IMMUNOHÉMATOLOGIE ÉRYTHROCYTAIRE

CAHIER
DE
Formation
version numérique

■ INTRODUCTION

La détermination des groupes sanguins érythrocytaires ainsi que la détection des anticorps correspondants sont indispensables à la sécurité transfusionnelle. En effet le caractère immunogène du polymorphisme érythrocytaire s'oppose à la transfusion compatible. La fixation d'un anticorps sur l'antigène correspondant condamne, le plus souvent, la cellule concernée à sa destruction. Aussi assurer la sécurité immuno-hémolytique des transfusions c'est éviter la rencontre in vivo entre antigènes et anticorps dont l'étude préalable in vitro est un élément déterminant.

La détermination des groupes sanguins consiste à détecter les antigènes présents sur la membrane érythrocytaire.

L'étude des différents antigènes est donc regroupée en trois types d'analyses avec leurs impératifs technologiques et méthodologiques spécifiques : le groupage sanguin ABO-RH1, le phénotypage RH-KEL1 et le phénotypage étendu.

La recherche des anticorps antiérythrocytaires consiste à détecter les anticorps présents dans le plasma des patients à l'aide d'hématies-tests réglementairement définies.

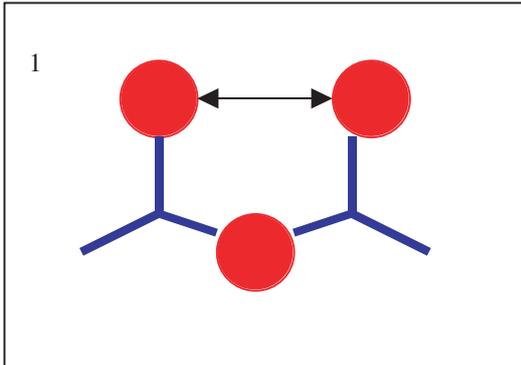
La détection des antigènes de groupes sanguins (typages) ou des anticorps correspondants (RAI) repose essentiellement sur des méthodes immunologiques basées sur la spécificité de la réaction [AG-AC] : si l'anticorps se fixe, l'antigène est présent. Par ailleurs le caractère immunogène du polymorphisme érythrocytaire suscite la formation d'anticorps qui permet, par prélèvement direct (polyclonaux) ou par voie biotechnologique (monoclonaux), l'obtention de réactifs spécifiques pour de nombreux antigènes. Les méthodes mises en œuvre reposent sur la mise en évidence, in vitro, de la réaction AG-AC dont la base technologique principale est le phénomène d'agglutination.

Enfin ces dernières années ont vu l'introduction de nouvelles technologies qui ont pour objectif une amélioration des performances avec parfois la mise en œuvre d'alternatives à l'agglutination (immuno-adhérence) voire à l'immunologie (biologie moléculaire). L'élément moteur de cette amélioration ne se limite pas à la recherche d'une augmentation tous azimuts du couple spécificité - sensibilité. Il prend aussi en considération la capacité de détecter en priorité le « cliniquement significatif » ainsi que les limites de la fiabilité humaine qui justifie l'introduction de l'automatisation et de l'informatisation.

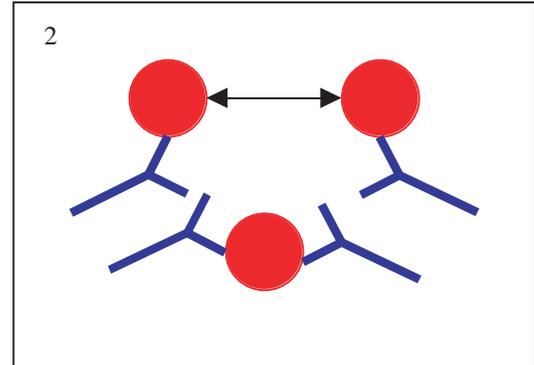
■ I. RAPPEL TECHNOLOGIQUE

Depuis la découverte du système ABO en 1900 par K. Landsteiner, les méthodes de détection de la réaction antigène érythrocytaire-anticorps anti-érythrocytaire n'ont cessé

d'évoluer. Au principe de l'agglutination spontanée (schéma N° 1), base de la découverte des premiers systèmes de groupes sanguins, se sont ajoutés des artifices multiples ayant permis l'agglutination d'hématies sensibilisées par des anticorps non directement agglutinants (schéma N° 2).

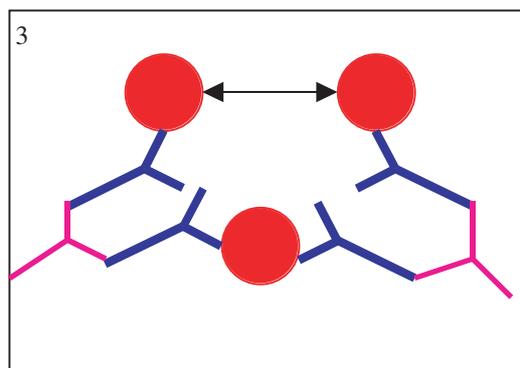


Les anticorps agglutinants sont des anticorps capables, après fixation sur l'antigène correspondant, d'agglutiner les hématies en solution saline 0,15M



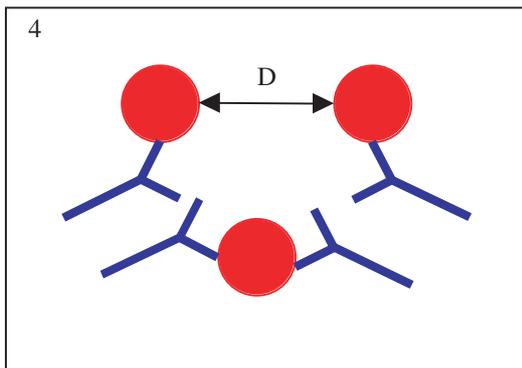
Les anticorps non agglutinants sont des anticorps incapables, après fixation sur l'antigène correspondant d'agglutiner les hématies en solution saline 0,15M

La première avancée significative d'un point de vue méthodologique a été la mise en évidence de cette sensibilisation par des procédés immunologiques basés sur l'utilisation d'hétéro-anticorps. En effet, les antiglobulines humaines, en se fixant spécifiquement sur des isotypes portés par les fragments Fc des immunoglobulines, créent des ponts immunologiques et agglutinent les hématies sensibilisées (schéma 3). Après un lavage adéquat (élimination des immunoglobulines non fixées spécifiquement sur les hématies) l'ajout de l'antiglobuline révèle la sensibilisation in vivo (test direct à l'antiglobuline) ou in vitro (test indirect à l'antiglobuline) des hématies par des anticorps non directement agglutinants.

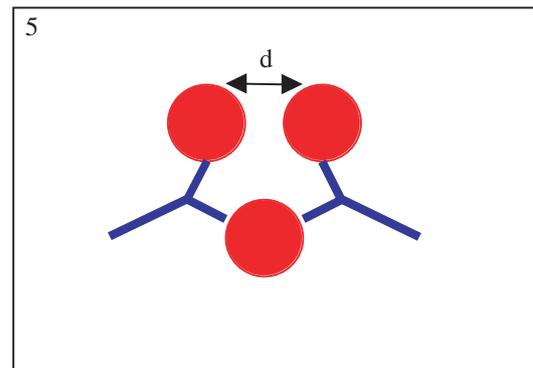


L'antiglobuline humaine en assurant un pont immunologique révèle la sensibilisation des hématies par des anticorps non directement agglutinants

La deuxième avancée est basée sur l'utilisation des enzymes protéolytiques qui éliminent les groupements sialiques de la surface érythrocytaire. Le retentissement majeur est caractérisé par une diminution des charges électriques aboutissant à un rapprochement inter-globulaire (schémas 4 et 5) compatible avec « l'envergure » de l'anticorps sensibilisant. De plus, cette action est renforcée par une meilleure accessibilité antigénique ainsi qu'une potentialisation des interactions ioniques entre antigènes et anticorps en rapport avec une diminution de l'hydratation globulaire.



Hématies en solution saline 0,15M avant traitement par les enzymes



*Hématies en solution saline 0,15M après traitement par les enzymes.
Distance interglobulaire $d < D$*

Des objectifs identiques de réduction de la distance intercellulaire ont été obtenus en neutralisant les charges électriques érythrocytaires par un polycation (polybrène) générant une agglutination non immunologique qui, en absence de sensibilisation, est réversible par adjonction de citrate.

Par la suite les évolutions techniques ont concerné des éléments participant à l'amélioration du test à l'antiglobuline en favorisant notamment la phase de sensibilisation. Le premier de ces éléments est représenté par l'utilisation d'un milieu en basse force ionique (LISS) qui facilitant l'accessibilité aux antigènes et la rapidité de fixation des anticorps a permis une réduction du temps d'incubation à 15 minutes. Le deuxième est caractérisé par l'utilisation de polyéthylène glycol (PEG) dont la justification théorique est basée sur une augmentation du nombre de collisions entre antigènes et anticorps liée à une exclusion des molécules d'eau péri-membranaires.

Parallèlement les progrès biotechnologiques ont permis la production d'anticorps monoclonaux pour de nombreuses spécificités. Si les avantages sont nombreux (*information supplémentaire liée à la reconnaissance d'un seul épitope, absence de réactions aspécifiques liées à la contamination par des anticorps reconnaissant des antigènes de faible fréquence ou de poly agglutinabilité, production illimitée, stabilité de production d'un lot à l'autre, marquage et utilisation en cytométrie de flux, production d'anticorps de classe IgM permettant le typage en cas de test direct à l'antiglobuline positif*), ils n'en comportent pas moins des inconvénients (*reconnaissance d'un seul épitope imposant parfois des mélanges d'anticorps, réaction croisée, anticorps trop puissants*

déTECTANT de manière indésirable de petite quantité d'antigène, non utilisable pour technique de fixation élution, spécificité intimement liée aux conditions techniques de pH, temps et température d'incubation).

Enfin ces dernières années ont été marquées par l'apparition de micro-techniques et de nouveaux procédés de mise en évidence de la réaction antigène-anticorps.

■ II. TECHNIQUES ACTUELLES D'AGGLUTINATION

II.1- Techniques en microplaques

II.1.1- Aspects théoriques

Basée sur l'expérience en virologie, le principe repose sur l'adaptation des réactions d'agglutination en tube au support microplaque de 96 puits à fond rond. Cette technique est parfaitement bien adaptée depuis de nombreuses années aux typages érythrocytaires y compris celui des patients.

II.1.2- Avantages

- Evolution de réactifs adaptés à ce support permettant un gain de spécificité-sensibilité par rapport aux techniques conventionnelles.
- Diminution de la consommation des réactifs et des échantillons.
- Réduction de l'encombrement de paillasse.
- Gain de temps.
- Pré-répartition des réactifs possible : outre le gain de temps, la pré répartition des réactifs contribue à améliorer la fiabilité des résultats en supprimant des risques d'erreurs liés à l'oubli ou l'écart de distribution.
- Hygiène et sécurité.
- Automatisation possible.

II.1.3- Inconvénients

L'agitation : Si la microplaque offre de grandes possibilités de standardisation par rapport aux techniques conventionnelles, l'agitation demeure une phase critique. En effet les multiples réactions simultanément présentes sur le support n'ont pas la même cinétique de remise en suspension. Il convient donc lors de cette phase, qui doit être réalisée sous contrôle visuel, d'être particulièrement attentif surtout en cas de phénomène d'adhérence de certains réactifs.

Remarques

D'autres types de microplaques sont utilisés dans le cadre du typage érythrocytaire. A titre d'exemple la Microplaque Olympus est caractérisée par des puits en V dont l'intérieur est constitué d'escaliers concentriques. Le principe repose sur la sédimentation des hématies

qui « descendent » ces escaliers en absence d'agglutination ou qui restent « accrochées » à ceux ci en cas d'agglutination. La lecture des réactions est assurée par une caméra CCD. Cette technique entièrement automatisée est particulièrement adaptée aux typages de grandes séries d'échantillons. L'inconvénient majeur repose sur le caractère réutilisable des microplaques dont les modalités de lavage conditionnent la qualité réactionnelle.

II.2- Techniques en filtration

II.2.1- Aspects théoriques

Cette méthode consiste à détecter une agglutination par filtration des hématies au travers d'une micro-colonne contenant un milieu défini. Trois types de procédés sont couramment mis en œuvre :

II.2.1.1- Le gel test

Typage et détection d'anticorps par test indirect à l'antiglobuline.

Dans ces conditions le milieu contient de l'antiglobuline humaine et les particules de gel fonctionnent comme un filtre qui arrête, après centrifugation, les hématies sensibilisées in vitro par l'anticorps spécifique et laisse passer celles qui ne le sont pas.

Typage par agglutination en solution saline 0,15 M

Dans ces conditions le milieu contient un sérum test et les hématies portant l'antigène correspondant seront arrêtées alors que des hématies dépourvues de cet antigène traverseront le gel sans s'y arrêter.

II.2.1.2- Les microbilles de verre

Comme pour le gel-test, en fonction des réactifs présents dans le milieu, les microbilles peuvent piéger de la même façon des hématies agglutinées et des hématies sensibilisées.

II.2.1.3- Les colonnes d'affinité

Dans ce procédé, un ligand, telle que la protéine A ou G qui se fixe spécifiquement au fragment Fc des immunoglobulines G, est associé à un gel. Ce ligand peut ainsi capturer des hématies sensibilisées lors de leur passage au travers de la colonne. De même un anticorps spécifique, préalablement fixé sur le ligand, peut arrêter des hématies porteuses de l'antigène correspondant.

II.2.2- Avantages

- Sensibilité : de nombreuses études rapportent une plus grande sensibilité des techniques de filtration. Une part significative de cette meilleure performance semble liée à la praticabilité du test lui-même et à l'objectivité de sa phase de lecture contrairement au test indirect à l'antiglobuline en tube, où une agitation excessive lors de la remise en suspension représente la cause principale de faux négatifs.
- Absence de lavage : lors de la phase de centrifugation, les éléments cellulaires extraits de l'environnement protéique se déplacent vers le bas de la colonne en entraînant avec eux uniquement ce qui est spécifiquement fixé à leur surface (anticorps réactifs). Ce

phénomène, associé à une antiglobuline en excès, évite l'inhibition de ce réactif et rend inutile la phase de lavage préalable. La suppression de cette phase et des contrôles qualité systématiquement associés (hématies sensibilisées pour chaque réaction négative) représente un gain de temps significatif pour les typages en test indirect à l'antiglobuline.

- Stabilité de la phase réactionnelle : cette stabilité permet une relecture a posteriori des supports correctement conservés.
- Standardisation des phases d'exécution technique et de lecture : la praticabilité de mise en œuvre permet une acquisition technique plus rapide lors des formations initiales ainsi qu'une reproductibilité réactionnelle et d'interprétation d'un technicien à un autre y compris en cas de double population ou de faible agglutination.
- Pré-répartition des réactifs.
- Faible quantité des réactants.
- Automatisation possible.



II.2.3- Inconvénients

- Risque de non détection de certaines agglutinations très faibles et notamment lors de l'épreuve plasmatique du groupage ABO. Ces failles semblent liées à des forces de cisaillement qui détruisent les faibles agglutinats durant leur passage « forcé » dans la matrice de filtration au cours de la centrifugation.
- Les doubles populations ne sont pas toujours visibles par piégeages de petites quantités d'hématies libres dans l'agglutinat bloqué dans la partie supérieure de la colonne.
- Excès de « sensibilité » en technique enzymatique : un des inconvénients majeurs est la détection trop fréquente d'auto-anticorps et de pseudo spécificités anticorpales en relation avec les préparations d'hématies-tests et en particulier celles traitées par les enzymes protéolytiques. Aussi compte tenu de l'évolution des performances des techniques en test indirect à l'antiglobuline attestées par les résultats du contrôle national de qualité, il a paru opportun et légitime de remettre en cause la nécessité du maintien des techniques enzymatiques dans le cadre du dépistage des anticorps anti-érythrocytaires. En effet la détection excessive de nombreux anticorps dépourvus de signification clinique retardait l'acte transfusionnel de certains patients et augmentait de manière significative le coût de cette analyse. Certains de ces anticorps pouvant être aussi des auto-anticorps imitant des allo-anticorps. Depuis la parution de l'arrêté du 26 avril 2002, la RAI peut désormais être effectuée au moyen d'un test indirect à l'antiglobuline polyspécifique ou anti-IgG. Lors de la phase d'identification, il peut être utile voire indispensable d'utiliser en complément les techniques dites enzymatiques notamment dans le cadre de difficulté d'identification (association d'alloanticorps) et lors des étapes de diagnostic biologique des accidents immunohémolytiques transfusionnels.
- Non applicable à certains champs d'application analytique : la technique filtration n'est pas adaptée à l'interprétation de certaines analyses comme le titrage des anticorps immuns chez la femme enceinte ou le contrôle d'anti-RH1 passifs, en raison du risque de résultats par excès pouvant aboutir à des décisions thérapeutiques mal adaptées. Le titrage dans le cadre du suivi obstétrical repose sur le test indirect à l'antiglobuline par la technique en tube et vis-à-vis d'hématies-test en solution saline. De même, l'appréciation de

l'hémorragie fœto-maternelle et l'efficacité de l'immuno prophylaxie par les « immunoglobulines anti-D » repose sur le test de Kleihauer qui permet d'adapter le nombre de doses « d'immunoglobulines anti-D » à injecter. La recherche isolée des anti-RH1 passifs permet seulement d'affirmer que le produit a été injecté, mais en aucun cas, qu'il a été injecté en quantité suffisante.

■ III. ALTERNATIVES ACTUELLES AUX TECHNIQUES D'AGGLUTINATION

III.1- Technique en phase solide

III.1.1- Aspects théoriques

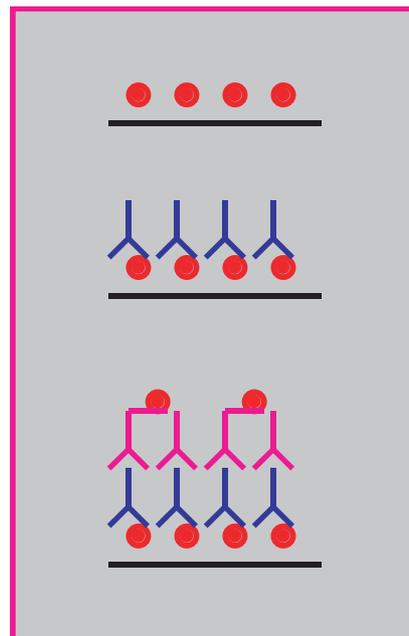
Le principe repose sur l'utilisation de microplaque avec des hématies « pré-fixées » ou fixées extemporanément. Après addition du sérum-test, la microplaque est incubée, puis sont effectuées des lavages en solution saline 0,15 M pour éliminer les protéines non spécifiquement fixées. Les anticorps fixés sont ensuite révélés par immuno-adhérence en ajoutant des hématies révélatrices sur lesquelles est fixée de l'antiglobuline humaine anti-IgG.

Ces hématies indicatrices s'étalent sur toute la surface du puits en cas de réaction positive. Une réaction négative est matérialisée, après centrifugation, par un bouton cellulaire au centre du puits. Ce procédé est applicable aussi bien au typage érythrocytaire qu'à la détection des anticorps anti-érythrocytaires.

1. Fixation des hématies
sur la microplaque

2. Fixation des anticorps
sur les antigènes correspondants

3. Révélation de la sensibilisation
par des hématies révélatrices
portant de l'antiglobuline
humaine



Un nouveau type d'immuno-adhérence sans lavage, sans centrifugation et sans hématies révélatrices est en cours d'évaluation pour la réalisation de l'ensemble des analyses d'immuno-hématologie dont le typage érythrocytaire. Les hématies sont préalablement

mises en suspension dans une solution assurant leur « magnétisation » instantanée. Ces hématies et les réactifs considérés sont répartis dans une microplaque dont les puits sont tapissés d'un anticorps monoclonal anti-isotype. Secondairement et de manière simultanée les hématies sont incubées soumises à un champ magnétique vertical et horizontal qui les attire vers le fond du puits. En cas de sensibilisation par le réactif les hématies retenues par l'anticorps anti-isotype s'étalent sur le fond du puits. En absence de sensibilisation les hématies restent libres et sont ramenées vers le centre du puits par le champ magnétique horizontal.

III.1.2- Avantages

- Gain de temps : absence de centrifugation, de lavage et de répartition d'hématies révélatrices pour la technique utilisant le champ magnétique.
- Automatisation possible.

III.1.3- Inconvénients

- Nécessité d'un apprentissage spécifique de la lecture lors des formations initiales.



Réaction Positive



Réaction Négative

- Sensibilité au pH de la solution de lavage : le pH de la solution de lavage doit être strictement compris entre 6.6 et 7.2 sous peine d'obtention de réactions faussement positives ou négatives.
- Absence de détection des anticorps de nature IgM posant des difficultés pour l'épreuve plasmatique du groupage ABO.

III.2- Autres alternatives techniques

D'autres techniques peuvent être mises en œuvre pour détecter la réaction antigène érythrocytaire – anticorps anti-érythrocytaire. Ces procédés ne sont pas utilisés en routine mais plutôt à des fins de typages antigéniques spécifiques. Parmi ceux-ci nous pouvons citer la cytométrie de flux particulièrement bien adaptée aux dépistages d'hématies fœtales ou suivi de chimérisme post greffe, l'immunofluorescence, les techniques radio immunologiques, les techniques ELISA et la technique MAIEA (monoclonal antibody-specific immobilization of erythrocyte antigens assay).

■ IV. ALTERNATIVES ACTUELLES AUX TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

Il s'agit essentiellement des techniques de biologie moléculaire permettant de déduire la présence de l'antigène par la détection du gène. Bien que ces techniques ne puissent se substituer en routine aux techniques immunologiques, elles n'en possèdent pas moins des indications spécifiques. A titre d'exemple nous pouvons citer le typage RH1 fœtal à partir d'un prélèvement maternel ou le phénotypage chez un patient dont les antécédents transfusionnels empêchent toute validation compte tenu de la persistance d'hématies transfusées dans la circulation.

Ces techniques largement utilisées en recherche (mise en évidence de nombreux variants) sont parfois complémentaires des techniques sérologiques lorsque celles ci s'avèrent défailtantes (phénotype faible : Fyx) ou discordantes (antigène RH1 partiel). Parfois ce type de technique est exposé à certain piège du fait de l'absence de parallélisme strict entre présence et fonctionnement du gène conditionnant la présence de l'antigène (gène RH1 présent avec antigène RH1 absent des hématies).

■ V. LES ÉVOLUTIONS TECHNOLOGIQUES DOIVENT S'ACCOMPAGNER D'UNE PRISE EN COMPTE DU FACTEUR HUMAIN

Comme dans de nombreux autres domaines d'activité, le facteur humain occupe une place prépondérante dans les **défaillances des processus** mis en œuvre en biologie médicale. Les conséquences de ces défaillances peuvent s'avérer dramatiques en terme de risque sanitaire. Si la prise en charge et la gestion de la fiabilité humaine et de ses limites reposent sur de multiples actions préventives, l'automatisation et l'informatisation en sont la clé de voûte. L'introduction des procédés précédemment décrits ont largement contribué à mettre en œuvre au laboratoire cette sécurité supplémentaire.

Le principe de base est de diminuer le risque d'erreur humaine par la prise en charge automatique de certaines phases d'un processus ou d'un sous processus. Les objectifs principaux sont :

- d'éviter les séquences répétitives pour lesquelles on sait l'homme inconstant,
- de réduire, en partie, la charge de travail,
- de laisser aux opérateurs la partie noble du travail : la décision,
- d'apporter des protections automatiques afin de rendre le système tolérant à l'erreur surtout en contexte de pression temporelle comme l'urgence ou en cas de pic d'activité, source de déviation volontaire ou involontaire par rapport à la norme (procédure).

En biologie médicale l'objectif est de supprimer certains risques d'erreurs (Sélection de l'échantillon, Sélection du réactif, Exécution de l'analyse, Transcription, Interprétation et Exploitation des résultats) en assurant :

- Une prise en charge de certaines phases de l'exécution analytique et du traitement de l'information apparaissant comme critiques pour la fiabilité des résultats.

- Une association de façon automatique et univoque entre le patient, le don ou le donneur et les résultats correspondants via le support d'identification positive de l'échantillon.
- Une autorisation de libération des résultats qu'après décision humaine finale : validation.

Les systèmes doivent donc remplir un certain nombre de fonctions :

- Valider le déroulement effectif de la réaction
- Valider chaque série de réactions à l'aide des témoins et contrôles adéquats
- Assurer une Interprétation réactionnelle à partir de valeurs seuils
- Assurer une Interprétation de cohérence réactionnelle à partir d'une table d'interprétation
- Assurer une Confrontation avec d'autres résultats
- Gérer les anomalies : non rendu de résultats – proposition d'exploration complémentaire
- Assurer la traçabilité

Remarques :

1. L'optimisation des systèmes automatiques impose :

- de mettre l'accent sur une **formation adaptée** des opérateurs aboutissant à des qualifications spécifiques.
- de réduire les **déclencheurs d'erreurs** y compris les tensions temporelles ou sociales.
- d'améliorer sans cesse l'ergonomie de **l'interface homme-système** ainsi que les procédures opérationnelles dont le respect sert de dernier rempart à la propagation de l'erreur.

2. Quelle que soit la fiabilité d'un système automatique la défaillance n'est jamais exclue (erreur latente des systèmes restée non détectée lors de tous tests opérationnels ne produisant généralement d'effet que lorsque sont réunies un grand nombre de conditions particulières) et peut avoir des conséquences extrêmement graves. Cela souligne, quel que soit le domaine analytique, la nécessité de mise en œuvre de systèmes de **détection de défaillance** (contrôles qualité internes, alarme, message diagnostic...) à chaque phase critique du processus.

3. La décision finale de la validation analytique revient à l'opérateur qui, déchargé de certaines tâches, pourra concentrer ses ressources sur :

- **Le contrôle visuel** de chaque support avec analyse de cohérence avec les résultats rendus par le système.
- L'appréciation de la qualité des résultats des **contrôles qualité internes** autorisant la validation analytique.
- La gestion des anomalies conformément à des modes de résolution de problèmes pré-établis et validés.

Toutefois quel que soit le degré d'automatisation du processus analytique, sa qualité est directement liée à la **phase pré-analytique** de réalisation des prélèvements, d'acceptation des échantillons et de saisie de l'état civil pour lesquelles il convient d'être particulièrement attentif.

Enfin, il est nécessaire que ce processus d'informatisation dépasse le cadre strict de l'exécution analytique pour s'étendre au domaine de l'exploitation des résultats basés sur le transfert des données.

■ CONCLUSION

L'introduction de ces nouvelles technologies a participé avec l'automatisation et l'informatisation à réduire la part que pouvait avoir l'erreur analytique au sein du risque immuno-hémolytique. Ce risque semble actuellement lié aux facteurs critiques principaux suivants :

- L'identification des patients :
à leur entrée dans l'établissement de santé
au moment du prélèvement des échantillons
au moment de la pose de la transfusion
- La pertinence des examens prescrits.
- La prise en compte des résultats biologiques.
- Les relations/communications entre établissements.

Par ailleurs compte tenu des évolutions méthodologiques et des réactifs il a paru nécessaire de reconsidérer les modalités d'exécution des analyses en immuno-hématologie telles qu'elles étaient définies par voie réglementaire. L'arrêté du 26 avril 2002 comporte d'importantes modifications dans la pratique des laboratoires d'immuno-hématologie.

TYPAGES ÉRYTHROCYTAIRES ET DIFFICULTÉS

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

■ INTRODUCTION

La détermination des groupes sanguins ABO-RH1 est une étape primordiale de la sécurité transfusionnelle

Elle doit respecter des règles bien définies, dictées par la législation en vigueur et dont le non-respect peut être à l'origine d'accident hémolytique par incompatibilité ABO. L'hémovigilance souligne la persistance d'erreurs de détermination du groupe sanguin ABO-RH1 dont l'origine est souvent une erreur d'identification des prélèvements.

■ I. PRINCIPES GÉNÉRAUX D'UN TYPAGE ÉRYTHROCYTAIRE

Les réactifs utilisés doivent être conformes aux caractéristiques et normes définies par la réglementation en vigueur, agréés par l'AFSSAPS et validées par le CNRGS qui attribue un certificat et un numéro attestant que le réactif est conforme. Le numéro CNRGS doit figurer sur les flacons. Le numéro du clone doit figurer sur la fiche technique et le flacon. A ce jour, le numéro AFSSAPS doit figurer sur l'emballage.

Les réactifs doivent être conservés et utilisés dans les conditions préconisées par le fabricant. Ils ne doivent jamais être utilisés au-delà de leur date de péremption. L'utilisation des réactifs utilisés dans des conditions différentes de celles préconisées par le producteur nécessite de constituer un dossier de validation. A réception et de façon quotidienne, l'activité des réactifs doit être contrôlée à l'aide d'une batterie d'échantillons témoins de phénotypes ABO-RH1 et RH-KEL1 connus testés dans les conditions techniques de routine. Ceci permet de vérifier notamment qu'il n'y a pas eu de modification de l'activité des sérums-tests et des hématies-tests au cours de leur conservation et participe à la validation de l'ensemble des paramètres du mode opératoire mis en œuvre.

L'utilisation de réactifs monoclonaux est recommandée. Dans ce cas, pour les typages nécessitant 2 lots de réactifs différents, ceux ci ne comporteront pas de clone commun.

La détermination des groupes et phénotypes peut être manuelle mais l'utilisation d'une procédure automatisée avec identification automatique de l'échantillon comportant un numéro codé en barres, lecture et transfert automatique des résultats dans le module informatique du laboratoire est vivement recommandée. Ceci est un gage de sécurité à condition :

- que l'automate soit qualifié et bénéficie d'une maintenance,
- que le couple automate-réactifs soit validé.

Dans le cas où les conditions d'automatisation et d'informatisation de l'arrêté du 26 avril 2002 sont respectées, la détermination sur automate peut être pratiquée par un technicien et un lot de réactifs.

I.1- Généralités

La détermination du groupe sanguin ABO, indissociable du groupe RH1, s'inscrit dans un contexte potentiel pré-transfusionnel, pré- ou périnatal.

I.1.1- Groupage ABO

Chaque détermination de groupe sanguin ABO comporte 2 épreuves complémentaires réalisées simultanément :

– l'épreuve globulaire consistant à rechercher la présence des antigènes A et B avec les réactifs anti-A, anti-B et anti-A, B,

– l'épreuve plasmatique consistant à rechercher les anti-A et anti-B avec des hématies-tests A1 et B. Des contrôles de qualité internes appropriés sont systématiquement utilisés.

Ces 2 épreuves doivent être réalisées en double par 2 techniciens, en dehors du contexte d'automatisation légalement prévu.

I.1.2- Groupage RH1 (il est désormais indissociable du groupage ABO)

Chaque détermination de groupe RH1 comporte l'étude des hématies à l'aide d'un réactif « anti-RH1 + témoin ». Le réactif témoin étant de composition strictement identique au réactif anti-RH1 mais dépourvu de toute activité anticorps. Cette détermination doit être réalisée en double par 2 techniciens, en dehors du contexte d'automatisation légalement prévu.

I.1.3- Phénotypage RH-KEL1

La détermination du phénotype RH-KEL consiste à rechercher la présence ou l'absence des antigènes érythrocytaires : RH2, RH3, RH4, RH5 et KEL1 à l'aide de réactifs de préférence monoclonaux avec les contrôles de qualité internes obligatoires.

I.2- Mode opératoire

Différentes techniques sont disponibles, mais il est préconisé d'utiliser des supports à usage unique et en particulier ceux permettant l'automatisation telles les microplaques ou colonnes de filtration.

I.3- Les contrôles qualités internes (CQI)

Pour chaque série d'analyse, les réactifs utilisés pour la détection des antigènes érythrocytaires des groupes ABO-RH1 et RH-KEL1 seront testés vis-à-vis d'hématies-tests de groupe ABO-RH1 et RH-KEL1 connus. Ces contrôles seront réalisés quotidiennement dans les mêmes conditions techniques que celles des échantillons. Ils sont précisément énoncés dans l'arrêté du 26 avril 2002.

Les hématies-tests A1 et B seront testées vis-à-vis de réactifs anti-A, anti-B et anti-A, B : l'intensité des réactions sera notée.

■ II. VALIDATION ANALYTIQUE DU TYPAGE ÉRYTHROCYTAIRE

La validation analytique du typage érythrocytaire repose sur :

II.1- Les résultats attendus des CQI

II.2- L'absence d'ambiguïté réactionnelle avec chaque réactif

II.3- L'absence de double population

II.4- Un profil réactionnel cohérent

Le groupe ABO : il sera conclu si le profil réactionnel correspond à la grille d'interprétation suivante :

Groupe	Anti-A	Anti-B	Anti-A, B	H.T.A1	H.T. B
A	+++	-	+++	-	+++
B	-	+++	+++	+++	-
AB	+++	+++	+++	-	-
O	-	-	-	+++	+++

Les CQI comportent au minimum un échantillon de groupe A, B et O. Toute **incohérence** entre l'épreuve globulaire et l'épreuve plasmatique impose de **ne pas valider** le groupe sanguin, de rendre un **conseil transfusionnel** et d'explorer l'anomalie.

Témoin AUTO : plasma du sujet + hématies du sujet.

Témoin AB : sérum AB (ou milieu de dilution du réactif) + hématies du sujet. Ce témoin, s'il est négatif, garantit l'épreuve globulaire.

Témoin ALLO : sérum du sujet + hématies-tests O de la gamme de dépistage des anticorps anti-érythrocytaires, dans les mêmes conditions techniques que celles du groupage. Ce témoin garantit, s'il est négatif, l'épreuve plasmatique

Le groupe RH1 : il sera conclu si la réaction avec le **réactif témoin** est parfaitement **négative**. L'agglutination avec ce réactif témoignera de la **sensibilisation** préalable *in vivo* des hématies par un auto-anticorps, un allo-anticorps, ou d'un phénomène de rouleaux . Elle imposera de pratiquer un **test direct à l'antiglobuline (DAT)** et l'utilisation d'autres techniques ou réactifs pour le typage RH1. Ici encore, la détermination par 2 techniciens utilisant 2 lots différents de réactifs et témoins est actuellement obligatoire en dehors du contexte d'automatisation prévu par l'arrêté du 26 avril 2002.

Le phénotype RH-KEL1 : il sera conclu si la réaction avec le **réactif témoin** est parfaitement **négative**, les CQI valides et que les règles de l'antithétisme sont respectées. L'agglutination avec ce réactif témoignera là encore de la **sensibilisation** préalable *in vivo* des hématies par un auto ou un allo-anticorps, ou d'un phénomène de rouleaux. Elle imposera de pratiquer un **DAT** et l'utilisation d'autres techniques ou réactifs pour le phénotypage RH-KEL1.

II.5- Résultats de 2 réalisations identiques

II.6- Résultats de 2 déterminations identiques

■ III. CONDUITES SPÉCIFIQUES EN FONCTION DES ANOMALIES

Toute anomalie impose de vérifier tout d'abord la conformité des réactifs utilisés avec l'analyse des résultats obtenus avec les contrôles qualité internes, leur aspect et leur date de péremption. La constatation d'anomalie impliquant les réactifs impose une destruction de ceux-ci et une reprise de l'analyse avec d'autres réactifs conformes. De même, quel que soit le type d'anomalie constatée, il faudra vérifier l'absence d'une altération de la qualité de l'échantillon de sang à tester. Un prélèvement hémolysé (n'ayant pas été conservé dans des conditions de température optimale) ou ancien impose de prélever un nouvel échantillon de sang au patient.



III.1- Résultat invalide

III.1.1- Ambiguïté réactionnelle : agglutination faible ou infra détectable

III.1.1.1- Contexte particulier

Nouveau-né

Les antigènes des systèmes ABO et associés subissent une maturation post natale. La densité antigénique à la naissance est donc inférieure à celle des hématies de réactivité « adulte » acquise aux alentours de 2 ans. L'intensité réactionnelle d'agglutination peut donc varier d'un réactif à un autre lors du typage de ces hématies. Le document de groupage sanguin établi à cette occasion n'a qu'une valeur provisoire, pendant une durée de six mois.

Affaiblissement antigénique chez certains sujets âgés

Un affaiblissement antigénique peut être observé chez certains sujets âgés, en dehors de toute pathologie particulière.

Phénotype « B acquis »

A la faveur d'une infection, volontiers de type surinfection d'un cancer colique, les hématies de patients de groupe sanguin A1 essentiellement, voient sous l'action d'une déacétylase d'origine bactérienne, leur sucre immuno-dominant la N-acétylgalactosamine, se transformer en galactosamine (structure proche de l'antigène B dont le sucre immuno-dominant est un galactose) que reconnaissent certains anti-B polyclonaux et quelques monoclonaux mal sélectionnés (caractéristique devant être précisée par le producteur). Ce phénomène est transitoire et le groupe A du patient pourra bien être confirmé à distance de l'épisode infectieux.

III.1.1.2- Système ABO : phénotypes faibles

Les phénotypes A faibles et B faibles définissent des hématies dont la réactivité antigénique est inférieure à celle des hématies A2 et B « normales ». Dans certains cas l'agglutination peut être extrêmement faible et la présence des antigènes A ou B ne peut être confirmée que par une technique de fixation-élution. Après confirmation sur un 2^e prélèvement, il convient d'établir un document de groupage sanguin faisant état de ce phénotype particulier et indiquer une attitude transfusionnelle adaptée.

III.1.1.3- Phénotypes faibles dans les autres systèmes

La présence de phénotypes faibles dans les autres systèmes peut être observée à l'occasion de typage érythrocytaire dans d'autres systèmes de groupes sanguins. L'un d'entre eux est particulièrement important à déceler : l'antigène RH1.

III.1.2- Double population

Une image de double population est caractérisée par la présence d'agglutinats sur fond rosé d'hématies libres. La réalité de cette image doit être vérifiée au microscope. Elle peut être liée à l'existence de deux populations d'hématies possédant des antigènes différents (post transfusionnelle...) ou au comportement particulier des cellules en présence de certains réactifs (phénotype A3...).

III.1.2.1- Double population dans le système ABO

Présence d'un contexte clinique particulier

Contexte transfusionnel

La double population est liée à la durée de survie des hématies transfusées. Le plus souvent, il s'agit d'une transfusion non isogroupe compatible, mais il ne faudra pas méconnaître l'incompatibilité majeure ABO liée à une erreur transfusionnelle. Après avoir vérifié le groupe sanguin ABO-RH1 des hématies transfusées, il convient d'établir un document provisoire de groupe sanguin en précisant la conduite transfusionnelle. Lorsque la quantité de sang transfusé est importante, les hématies du patient peuvent être masquées : c'est notamment le cas après transfusions in utero ou exsanguino-transfusions à la naissance.

Prélèvement de sang de cordon

La double population est liée à l'existence d'hématies maternelles et néo-fœtales. Un prélèvement de sang veineux est alors nécessaire.

Contexte de greffe de cellules souches hématopoïétiques non ABO identique

La double population est transitoire et le témoin d'une « prise » de la greffe en période post greffe immédiate. Cette image pourra ensuite disparaître complètement avec un remplacement progressif des hématies du receveur par celles du donneur. La réapparition d'une image de double population à distance de la greffe est le témoin de la réapparition de la moëlle du receveur donc d'une rechute de sa maladie. Après avoir vérifié les groupes sanguins ABO-RH1 du donneur et du receveur, il convient d'établir un document particulier en indiquant une attitude transfusionnelle adaptée.

Sujet âgé sans pathologie particulière

Contexte d'hémopathie maligne

Certaines hémopathies malignes s'accompagnent de l'affaiblissement antigénique des hématies issues des clones pathologiques. La double population évolue avec la maladie en disparaissant en cas de rémission et réapparaissant en cas de rechute. Après confirmation sur un deuxième prélèvement, il faut établir un document immuno-hématologique provisoire avec une attitude transfusionnelle adaptée.

Contexte de gémellité

Une double population vis à vis de plusieurs marqueurs peut être observée chez des jumeaux dizygotés en raison de la greffe naturelle de cellules souches hématopoïétiques pendant la vie embryonnaire. Après avoir analysé le phénotype de l'autre jumeau et mis en évidence plusieurs doubles populations, il faut établir un document immuno-hématologique faisant état de cette chimère hématopoïétique et indiquer une attitude transfusionnelle adaptée.

Absence de contexte clinique particulier : phénotypes A faible et B faible

Les phénotypes A faible et B faible définissent des hématies dont la réactivité antigénique est inférieure à celles des hématies A2 et B « normales ». Certains de ces phénotypes peuvent donner des images de double population sans que celle-ci soit réellement séparable (phénotype A3), alors que d'autres sont de véritables mosaïques génétiquement transmises caractérisées par la présence de cellules porteuses de l'antigène A et d'autres non porteuses de ce même antigène (phénotype A end). Après confirmation sur un deuxième prélèvement, il convient d'établir un document de groupe sanguin faisant état de ce phénotype particulier et indiquer une attitude transfusionnelle adaptée.

III.1.2.2- Double population dans les autres systèmes de groupes sanguins

Dans les autres systèmes de groupes sanguins, des doubles populations peuvent être observées. Les causes principales se rapprochent de celles décrites pour le système ABO avec notamment la transfusion, la greffe de cellules souches hématopoïétiques et la gémellité dizygoté. La conduite est identique aussi bien en terme d'exploration étiologique que d'établissement de documents spécifiques.

III.2- Résultat incohérent

III.2.1- Incohérence entre épreuves globulaire et plasmatique du groupe sanguin ABO

III.2.1.1- Réactions par excès

Une réaction d'agglutination est constatée alors qu'elle n'était pas attendue par la logique de l'interprétation des résultats du groupage sanguin. Elle peut survenir à l'épreuve globulaire ou plasmatique.

A l'épreuve globulaire : en fonction des réactions observées avec les témoins réglementaires, 3 groupes principaux d'hypothèses pourront être évoqués.

Anomalies des réactifs : les réactions observées avec le sérum AB (ou le milieu de dilution d'un réactif monoclonal) et le témoin autologue apparaissent négatives. Deux hypothèses principales peuvent être évoquées : une contamination des sérums-tests qu'elle soit accidentelle ou en rapport avec un anticorps supplémentaire présent dans un réactif polyclonal ou un phénomène de type B(A) constaté avec certains anti-B monoclonaux très puissants et mal sélectionnés, capables de détecter de petites quantités d'antigène A sur une hématie réellement de groupe B.

Anomalies globulaires : les réactions avec le sérum AB apparaissent positives alors que le témoin autologue est négatif. L'hypothèse d'une polyagglutinabilité est alors évoquée. Une hématie polyagglutinable est agglutinée par des sérums humains adultes, immunologiquement normaux, compatibles ABO et dépourvus d'allo-anticorps. Cette agglutination est généralement liée à l'expression d'un antigène cryptique ou transformé contre lequel des anticorps naturels existent dans la majorité des plasmas humains. La révélation de ces antigènes globulaires étant le plus souvent le fait d'une pathologie infectieuse (T ou B acquis) ou maligne (Tn).

Anomalies plasmatiques : la positivité des réactions observées avec le sérum AB (ou le milieu de dilution d'un réactif monoclonal) et le témoin autologue apparaissent en rapport avec la présence d'un auto-anticorps plasmatique responsable de la sensibilisation des propres hématies du sujet.

A l'épreuve plasmatique : l'observation d'une réaction non attendue à l'épreuve plasmatique impose de pratiquer le témoin allo et en cas de positivité de tester le plasma vis à vis d'une gamme d'hématies-tests d'identification dans les mêmes conditions techniques que celles du groupage. En fonction des réactions observées, plusieurs hypothèses peuvent être évoquées :

- le témoin allo est négatif : dans ce cas l'anomalie par excès est due soit à la présence d'un anticorps dirigé contre un antigène de faible fréquence (rare), ou encore à la présence d'un anticorps reconnaissant les antigènes A1, A ou B (anti-A1, anti-A ou anti-B que ce soient des auto-anticorps, des allo-anticorps ou des anticorps passifs),
- le témoin allo est positif : il convient alors d'identifier l'anticorps et de pratiquer l'épreuve plasmatique avec des hématies-tests dépourvues de l'antigène correspondant à l'anticorps identifié,
- enfin, toutes les hématies testées sont agglutinées en raison de la présence d'un auto-anticorps (témoin autologue positif) ou d'un anticorps dirigé contre un antigène public (anti-H chez un sujet de phénotype H déficient...)

III.2.1.2- Réactions par défaut

Une réaction d'agglutination attendue par la logique de l'interprétation du groupage sanguin ABO n'est pas observée. Elle peut survenir à l'épreuve globulaire ou plasmatique.

A l'épreuve globulaire : avant d'évoquer les hypothèses classiques, il convient de valider l'anomalie, à savoir, confirmer l'absence d'agglutination attendue et ne pas la confondre avec une hémolyse des hématies du sujet par l'action de réactifs mal conservés.

Contexte clinique particulier : l'absence d'agglutination attendue à l'épreuve globulaire peut être liée à l'absence ou à la faible maturation néo-natale des antigènes ABO ou à la

disparition progressive de ceux ci à la suite d'une hémopathie maligne. De même on peut observer des sécrétions pathologiques de substances solubles de groupes sanguins ABO dans les kystes ovariens et les cancers des organes digestifs. En raison de la quantité importante de substances de groupe produites et déversées dans le plasma, il peut y avoir inhibition d'héماغglutination en cas d'utilisation de réactifs polyclonaux, mais aussi avec certains monoclonaux. Dans ces conditions, la reprise d'une épreuve globulaire après lavage des hématies permet de lever l'anomalie.

En l'absence de contexte clinique particulier : on évoquera la possibilité de phénotypes ABO faibles dont la présence des antigènes ne pourra être détectée que par des techniques sensibles de type fixation-élution.

A l'épreuve plasmatique : ici aussi, il conviendra avant d'évoquer les hypothèses classiques, de valider l'anomalie, c'est-à-dire de confirmer l'absence d'agglutination, à ne pas confondre avec une hémolyse des hématies-tests par l'action des hémolysines anti-A ou anti-B présentes dans le plasma du patient.

L'absence des anticorps attendus pourra être observée dans cinq contextes différents chez :

- le nouveau-né : il s'agit d'un état physiologique d'immuno-immaturité,
- le sujet âgé immuno-déprimé,
- le sujet atteint d'hypogammaglobulinémie ou d'agammaglobulinémie congénitale ou acquise (traitement immuno-suppresseur, myélome, Waldenström, LLC...),
- le receveur de cellules souches hématopoïétiques,
- les jumeaux dizygotes en cas de greffe réussie de cellules hématopoïétiques pendant la vie intra-utérine.

III.2.2- Réaction positive avec le réactif témoin

La réalisation de tout typage érythrocytaire comporte obligatoirement l'utilisation d'un sérum-test contenant l'anticorps spécifique de l'antigène à rechercher et d'un réactif témoin négatif de composition strictement identique au sérum-test fourni par le même producteur mais dépourvu d'activité anticorpale. Toute réaction positive constatée avec le réactif témoin remet en cause la validation du typage érythrocytaire et en particulier toute réaction positive constatée avec le sérum-test. On conçoit le risque transfusionnel ou obstétrical notamment en ce qui concerne l'antigène RH1, de valider par erreur sa présence chez un receveur de produits sanguins labiles ou chez une femme RH :– 1 non immunisée anti-RH1 venant d'accoucher d'un enfant RH1.

La positivité d'une réaction avec le réactif témoin peut parfois être le fait d'un phénomène de rouleaux, constaté dans certaines pathologies lympho-prolifératives où l'excès de synthèse d'immunoglobulines est responsable d'un empilement en « pile d'assiette » des hématies qui est facilement distingué au microscope, d'une réelle agglutination. La réalisation du typage après lavage des hématies permettra de lever cette incohérence et de valider le groupage.

Le plus souvent, la positivité d'une réaction avec le réactif témoin est le fait d'une sensibilisation in vivo des hématies dont les étiologies sont les suivantes :

- maladie hémolytique du nouveau-né,

- incident immunologique de transfusion sanguine,
- anémie hémolytique auto-immune,
- anémie hémolytique immuno-allergique.

Il conviendra dans ces situations de réaliser les typages avec 2 lots différents d'anticorps monoclonaux de nature IgM utilisables en milieu salin.

III.2.3- Absence de deux antigènes antithétiques

La majorité des systèmes de groupes sanguins possède des phénotypes rares dits silencieux ou « nul » caractérisés le plus souvent par l'absence de deux antigènes antithétiques. Deux antigènes sont dits antithétiques quand l'absence de l'un implique forcément la présence de l'autre comme cela est expliqué dans l'exemple ci dessous :

- si RH2 est absent alors RH4 est forcément présent,
- si FY1 est absent alors FY2 est forcément présent.

Phénotypes silencieux du système RH

Pour les phénotypes partiellement silencieux du système RH, il peut y avoir absence à la fois :

- des antigènes RH3 et RH5 et la délétion partielle est notée RH : 12-3-4-5,
- des antigènes RH3, RH5, RH2 et RH4 et la délétion partielle est notée RH : 1-2-3-4-5.

Pour les phénotypes totalement silencieux ou RH « nul », il y a absence de tous les antigènes du système RH et le phénotype est noté RH : -1-2-3-4-5.

Exemples de phénotypes silencieux dans les autres systèmes de groupes sanguins

- FY : -1-2 du système FY,
- JK : -1-2 du système JK.

La problématique posée par ces phénotypes silencieux est liée à l'absence d'antigènes dits publics (portés par la majorité des individus) et la possibilité de posséder les anticorps correspondants, soit de manière naturelle (anti-H des sujets hh et sese) ou allo-immune (anti-FY3 des FY : -1, -2, anti-JK3 des JK : -1, -2) avec les conséquences obstétricales et transfusionnelles qui s'y rattachent.

III.3- Résultats divergents entre deux réalisations

Les résultats sont relus par une tierce personne. En cas de confirmation des résultats, l'analyse est reprise avec d'autres réactifs ou dans d'autres conditions techniques. En cas de persistance de l'anomalie, l'analyse est transmise à un laboratoire spécialisé. En effet en fonction des réactifs utilisés, la constatation d'une divergence entre deux réalisations peut être liée à des phénotypes particuliers, comme c'est le cas pour l'antigène RH1 par exemple : la divergence de résultat entre deux réalisations peut être liée à deux particularités phénotypiques caractérisant cet antigène :

III.3.1- Antigène RH1 faible

Il s'agit d'un déficit quantitatif et global d'antigènes RH1 à la surface de l'hématie dont la détection est directement liée au seuil de sensibilité de la technique utilisée et à la performance des réactifs mis en œuvre. Ces hématies peuvent être alors étiquetées RH : -1 en technique de routine alors que la mise en œuvre de techniques plus sensibles peut détecter la présence de l'antigène à leur surface. Si cette situation n'a pas d'incidence chez le receveur de produit sanguin qui sera transfusé en RH-1, elle peut avoir des conséquences cliniques plus importantes si un antigène RH1 n'est pas décelé sur un don de sang et chez un nouveau-né issu d'une mère RH : -1. La technique traditionnelle est le test indirect à l'antiglobuline qui doit être pratiqué selon les mêmes règles que le typage RH1 standard. Cependant, cette organisation n'est pas satisfaisante, car le groupage des hématies des sujets de phénotype RH1 faible est effectué en 2 étapes. L'utilisation conjointe de réactifs monoclonaux sélectionnés pour leur performance vis-à-vis des phénotypes RH1 normaux et affaiblis, associés aux nouveaux procédés comme la filtration et à l'utilisation d'enzyme protéolytique (broméline) permet d'augmenter la sensibilité du test et de détecter les variants RH1 faible en une seule étape.

III.3.2- Antigène RH1 partiel

L'antigène RH1 est constitué d'une mosaïque de sous unités toutes présentes chez le sujet RH1 et toutes absentes chez le sujet RH : -1. Chez certains sujets, un ou plusieurs épitopes peuvent être manquant et définir le variant RH1 partiel. La transfusion de ces sujets avec du sang RH1 (ou une grossesse incompatible) est susceptible d'entraîner une allo-immunisation anti-RH1 vis-à-vis des épitopes qui leur font défaut. Certains de ces phénotypes s'expriment avec une antigénicité subnormale (RH1 partiel VII), d'autres s'expriment avec une antigénicité affaiblie du fait d'un déficit quantitatif associé (RH1 partiel VI). Il semblerait que ce soit ces derniers qui s'immunisent le plus facilement, aussi il serait peut être judicieux d'utiliser, pour le groupage des receveurs, au moins un anti-RH1 ne reconnaissant pas le variant RH1 partiel VI (cette caractéristique sera précisée sur la notice du fournisseur).

BIBLIOGRAPHIE

1. Arrêté du 8 février 1984 (JO du 17 mars 1984) fixant les caractéristiques et les normes des réactifs utilisés en immuno-hématologie érythrocytaire.
2. Circulaire DGS/3B/552 du 17 mai 1985 relative à la prévention des accidents transfusionnels et des accidents d'allo-immunisation.
3. American Association of Blood Banking. Technical Manual. 1990. Arlington.
4. MANNESSIER L., GUIGNIER F. et le Groupe de Travail « Microméthodes en Immuno-hématologie » avec la collaboration de 8 établissements de transfusion sanguine. Rev. Fr. Transf. Hémobiol. 1992, 35, 33-38.
5. Décret n° 92-143 du 14 février 1992 (JO du 18 février 1992) relatif aux examens obligatoires prénuptial, pré et post-natal.
6. MOLLISON P.L., ENGELFRIET C.P., CONTRERAS M. Blood Transfusion in Clinical Medicine. 1993. 9th ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
7. WOODS L.L. AND JOHSON S. Practical application of news theories and technology in ABO, Rh and antibody identification. 1993. American Association of Blood Banks : Bethesda.
8. JUDD W.J. Methods in immunohematology. 1994. Durham : Montgomery.
9. Arrêté du 4 août 1994 (JO du 26 août 1994) portant homologation du règlement de l'agence française du sang relatif aux bonnes pratiques de distribution et pris en application de l'article L.668-3 du code de la santé publique.
10. Arrêté du 2 novembre 1994 (JO du 4 décembre 1994) relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.
11. Arrêté du 4 janvier 1995 (JO du 31 janvier 1995) portant homologation du règlement de l'agence française du sang relatif aux bonnes pratiques de qualification biologique du don et pris en application de l'article L.668-3 du code de la santé publique.
12. ROUBINET F., APOIL P.A., BLANCHER A. Frequency of partial D phenotypes in the South Western region of France. Transfus. Clin. Biol. 1996, 4, 247-255.
13. TISSIER A.M., LE PENNEC P.Y., HERGON E., ROUGER P. Les accidents immunologiques transfusionnels : analyse, risques et prévention. Transf. Clin. Biol. 1996, 3, 167-180.
14. ROUGER P., HERGON E. Apport de l'hémovigilance à la sécurité immunologique des transfusions : bilan de 3 ans. Transf. Clin. Biol. 1998, 5, 219-224.
15. LAPIERRE V., KUENTZ M., TIBERGHIE P. Pratiques transfusionnelles érythrocytaires après greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques pour la Société française de greffe de moelle. Transf. Clin. Biol. 1999, 6, 247-255.
16. Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.

RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI-ÉRYTHROCYTAIRES (RAI)

La RAI est devenue une analyse incontournable pour assurer :

- **la prévention et le diagnostic des incompatibilités anti-érythrocytaires en transfusion sanguine.** Les données de l'hémovigilance confirment la fréquence élevée de ces incidents hémolytiques. La RAI systématique prétransfusionnelle doit contribuer à limiter la fréquence des ces hémolyses immédiates ou différées.
- **la surveillance des incompatibilités fœto-maternelles (IFM) érythrocytaires non ABO en obstétrique.** La prévention des incompatibilités RH1 chez les femmes RH : -1 par les « immunoglobulines anti-D » a permis de diminuer la fréquence de ces allo-immunisations anti-RH1, mais elles n'ont pas totalement disparues. L'antigène RH1 du système RH n'est pas le seul concerné et d'autres antigènes : RH4, RH3, KEL1... peuvent être impliqués. Le diagnostic précoce et le suivi de l'évolution des anticorps peuvent permettre d'améliorer le pronostic de ces IFM.

■ I. PRINCIPE

La RAI a pour objectif la mise en évidence et l'identification des anticorps anti-érythrocytaires en mettant en présence le sérum (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.

■ II. INDICATIONS

Les anticorps anti-érythrocytaires sont actuellement encore responsables d'accidents transfusionnels ou fœto-maternels qui sont d'autant plus regrettables qu'une bonne organisation de détection de ces anticorps a montré que ces accidents pouvaient être évités.

La RAI doit être réalisée sur un prélèvement frais et conservé dans de bonnes conditions à + 4 °C. Elle a une validité maximum de 3 jours.

Elle est indiquée :

- chez tout patient susceptible d'être transfusé,
- avant toute transfusion ou toute nouvelle série de transfusions,
- après transfusion (dans le cadre du suivi d'hémovigilance),

- chez les patients polytransfusés, en bonne place au cours des séries de transfusion,
- après transfusion dans le cadre du suivi de l'hémovigilance,
- chez la femme enceinte, conformément aux dispositions de l'arrêté du 19 avril 1985 relatif aux examens médicaux pré et post-natals et du décret du 14 février 1992 relatif aux examens obligatoires prénuptial, pré et postnatal.

Cette recherche est systématique :

- au moins à 2 reprises chez les femmes enceintes de phénotype RH1 primigeste et sans antécédent transfusionnel,
 - avant la fin du 3^e mois (1^{er} examen prénatal),
 - au cours des 8^e ou 9^e mois (6^e ou 7^e examen prénatal), de préférence au 9^e mois si la recherche était négative au 1^{er} examen prénatal ;
- 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 2^e grossesse (en raison de l'hémorragie fœto-maternelle à l'accouchement),
 - chez les femmes de phénotype RH : – 1 :
 - avant la fin du 3^e mois de la grossesse (1^{er} examen prénatal),
 - au cours du 6^e mois (4^e examen prénatal),
 - au cours du 8^e mois (6^e examen prénatal),
 - au cours du 9^e mois (7^e examen prénatal),
 - 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.

Si la RAI est positive, l'identification des anticorps est obligatoire. En cas de présence d'anticorps, une nouvelle programmation des RAI doit être effectuée tous les mois jusqu'à l'accouchement. En cas de présence d'anticorps susceptibles d'entraîner des accidents d'IFM, la RAI avec identification et titrage (et dosage pondéral pour les anti-RH) doit être effectuée à périodes rapprochées de 3 à 4 semaines, voire 2 semaines à partir de la 21^e semaine d'aménorrhée.

■ III. LES DIFFÉRENTS ANTICORPS ANTI-ÉRYTHROCYTAIRES

III.1- Les anticorps naturels

Les anticorps naturels préexistent en dehors de toute stimulation fœto-maternelle ou transfusionnelle. Ils sont relativement peu souvent actifs à + 37 °C et ne sont pas dangereux pour le fœtus puisqu'ils sont de nature IgM, donc incapables de traverser la

barrière placentaire. Cependant, certains d'entre eux possèdent une amplitude thermique élevée et pourraient être dangereux en transfusion. Ceci montre l'intérêt d'une RAI avant toute première transfusion. Ils sont généralement agglutinants en milieu salin.

Les spécificités les plus fréquentes sont : anti-LE1, anti-LE2, anti-P1, anti-H, anti-MNS1...

III.2- Les anticorps immuns

Les anticorps immuns résultent d'une stimulation fœto-maternelle ou transfusionnelle. Ils sont de nature IgG, toujours actifs à + 37 °C et rarement agglutinants en milieu salin. Ils sont toujours dangereux en transfusion et peuvent l'être pour le fœtus s'il possède l'antigène correspondant.

Les spécificités les plus fréquentes sont : anti-RH1 (\pm RH2 \pm RH3), anti-RH3, anti-KEL1, anti-RH4, anti-FY1, anti-JK1, anti-MNS3...

TECHNIQUES PRÉFÉRENTIELLES DE MISE EN ÉVIDENCE DES ANTICORPS IMMUNS	
Anti-RH	IAT ET « enzyme »
Anti-KEL	IAT
Anti-FY	IAT
Anti-JK	IAT
Anti-MNS3,4	IAT

IAT : test indirect à l'antiglobuline

■ IV. LA RÉACTION D'AGGLUTINATION

La réaction d'agglutination comporte deux étapes :

- **la fixation de l'anticorps sur son antigène spécifique** : elle a toujours lieu,
- **l'agglutination des hématies sensibilisées par les anticorps** : elle ne se produit pas toujours.

La réaction d'agglutination fait intervenir plusieurs facteurs que sont : la classe d'immunoglobuline de l'anticorps, la concentration en anticorps, le nombre de sites antigéniques à la surface des hématies-tests et leur localisation, la température, le pH et le potentiel Zeta qu'il faut diminuer pour provoquer l'agglutination :

- soit en diminuant la charge électro-négative des érythrocytes due à la présence de groupements carboxyliques des acides sialiques, en les traitant par les protéases ;
- soit en modifiant la composition du milieu, en jouant sur la force ionique ou la constante diélectrique ;

Un milieu de basse force ionique intervient sur la première étape de la réaction antigène-anticorps, en augmentant considérablement la vitesse de fixation de l'anticorps sur son antigène spécifique. Par contre, pour obtenir une agglutination, il faut revenir à une force ionique normale.

L'agglutination directe des hématies sensibilisées concerne essentiellement les anticorps de classe IgM, mais tous n'en sont pas capables. L'exemple le plus typique est celui des anti-LE, en raison du faible nombre d'antigènes LE adsorbés à la surface des érythrocytes.

Classiquement les anticorps de nature IgG ne sont pas agglutinants en milieu salin. En raison de leur importance tant sur le plan de la sécurité transfusionnelle que le risque materno-fœtal, il est nécessaire d'utiliser des artifices techniques pour les mettre en évidence : traitement des érythrocytes par les enzymes protéolytiques, addition de macromolécules (albumine, dextran, PVP, ficoll...), test indirect à l'antiglobuline (IAT).

Le traitement des hématies par les enzymes protéolytiques améliore la mise en évidence de certains antigènes comme ceux des systèmes RH, LE, mais aussi certains auto-anticorps « chauds » ou « froids ». A l'inverse certains antigènes sont totalement détruits : c'est le cas des antigènes FY1 et FY2 du système FY, MNS1, MNS2, MNS3 et MNS4 du système MNS, XG1 du système XG... Ce phénomène limite les performances de la technique enzymatique qui ne peut pas être utilisée isolément.

Enfin, comme il l'a été observé, une mauvaise conservation des hématies peut entraîner une contamination bactérienne avec production d'enzymes protéolytiques et destruction partielle ou totale des antigènes précités. Il en est de même lors de la sénescence des érythrocytes, qui de façon physiologique sécrètent de la neuraminidase, entraînant la même altération de ces antigènes.

Il est donc fondamental de pratiquer des Contrôles Qualités Internes quotidiens (CQI) permettant de s'assurer de la stabilité des antigènes des gammes d'hématies-tests de dépistage ou d'identification de la réception à la péremption.

La technique de référence pour la RAI est l'IAT. Il s'agit d'une technique d'agglutination artificielle qui permet de visualiser la réaction antigène-anticorps grâce à l'utilisation d'une antiglobuline humaine.

■ V. MODALITÉS PRATIQUES

La RAI est un examen de réalisation délicate, en effet, elle fait intervenir plusieurs composants réactionnels :

- le sérum des patients, qui contient, à l'inverse des réactifs standardisés et puissants, des anticorps de force très variable, parfois très difficile à détecter,
- la puissance des différents antigènes de groupes sanguins varie beaucoup d'un type d'hématie-test à un autre,
- les antiglobulines sont des réactifs fragiles et difficiles à préparer.

Pour le dépistage et l'identification, la méthodologie technique repose sur la mise en œuvre d'un test indirect à l'antiglobuline polyspécifique ou anti-IgG permettant de détecter, sur colonne de filtration ou en immuno-adhérence, un anti-RH1 humain de concentration égale à 20 ng/ml ou d'autres techniques de sensibilité au moins égale.

Lors de la phase d'identification, il peut être utile voire indispensable d'utiliser en complément les techniques dites enzymatiques notamment dans le cadre de difficulté d'identification (association d'alloanticorps) et lors des étapes de diagnostic biologique des accidents immunohémolytiques transfusionnels.

V.1- Les différents procédés

Plusieurs procédés sont utilisables : les techniques traditionnelles en tube ont été remplacées par les nouveaux procédés : colonnes de filtration, immuno-adhérence.

Les deux derniers sont préférables car ils présentent l'avantage de limiter les interventions manuelles et donc les risques d'erreur liés à certaines étapes de la méthodologie qui se trouve standardisée. Par ailleurs, ils sont entièrement automatisables et informatisables.

Quel que soit le procédé retenu, les réactifs doivent posséder un numéro d'enregistrement auprès de l'AFSSAPS et un numéro de conformité après contrôle du CNRGS.

Les nouveaux procédés de filtration permettent d'éliminer les deux causes d'erreurs essentielles dans la réalisation du test indirect à l'antiglobuline : les lavages qui sont souvent défectueux et l'omission d'addition d'antiglobuline.

Dans les techniques de filtration, après la phase d'incubation des hématies-tests avec les sérums, les hématies plus denses que les immunoglobulines plasmatiques pénètrent, lors de la centrifugation, dans la colonne de gel ou de microbilles, et peuvent réagir avec l'antiglobuline incorporée dans la colonne, en cas de sensibilisation. La phase plasmatique reste au-dessus de la colonne. Les étapes de centrifugation et de lecture restent néanmoins critiques.

Le biologiste se doit de choisir les procédés les plus performants, compte tenu de l'impact des résultats sur les risques transfusionnels ou obstétricaux et leur prise en charge.

V.2- La réalisation de la RAI

La RAI comporte deux étapes :

Une première étape de dépistage des anticorps

La législation :

– oblige d'utiliser une gamme de dépistage comportant au moins trois hématies-tests O phénotypées qui doit permettre la détection des anticorps correspondants aux antigènes RH1 (D), RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e), KEL1 (K), KEL2 (Cellano), KEL4 (Kpb), FY1 (Fya), FY2 (Fyb), JK1 (Jka), JK2 (Jkb), MNS1 (M), MNS2 (N), MNS3 (S), MNS4 (s), LE1 (Lea), LE2 (Leb), P1, LU2 (Lub).

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

RH : 1,2,-3,-4,5 ;

RH : 1,-2,3,4,-5 ;

RH : -1,-2,-3,4,5.

De plus, une expression phénotypique « homozygote » doit être respectée pour les antigènes FY1, JK1, JK2, MNS3 et recommandée pour les antigènes FY2 et MNS4.

En aucun cas ces hématies ne feront l'objet de mélange.

- indique comment exprimer les résultats :
- en cas de dépistage négatif : absence d'anticorps contre les antigènes étudiés,
- en cas de dépistage positif : présence d'anticorps anti-érythrocytaire dont la spécificité reste à déterminer,
- le résultat doit comporter par ailleurs les antigènes testés, le nombre d'hématies-tests utilisé et les techniques utilisées.

Une seconde étape d'identification qui consiste à déterminer la spécificité du ou des anticorps présents en confrontant la distribution des réactions positives et négatives obtenues avec la distribution des antigènes sur les gammes d'hématies-tests utilisées.

Cette étape est réalisée sur un échantillon non décanté et non ouvert si possible, si elle est mise en œuvre par un laboratoire différent de celui qui a réalisé le dépistage.

Cette étape repose sur l'utilisation, outre la gamme de dépistage, d'au moins 10 hématies-tests. L'ensemble de ces hématies de groupe O doit comporter les antigènes suivants : RH1, RH2, RH3, RH4, RH5, RH6, RH8 (C_w), KEL1, KEL2, KEL3 (K_{pa}), KEL4, FY1, FY2, JK1, JK2, MNS1, MNS2, MNS3, MNS4, LE1, LE2, P1, LU1 (L_{ua}), LU2.

Les phénotypes suivants doivent être représentés au moins sur deux hématies : KEL1, FY : 1,-2, FY : -1,2, JK : 1,-2, JK : -1,2, MNS : 3,-4, MNS : -3,4, P : -1.

Cette phase doit permettre l'identification d'un anticorps courant isolé ainsi qu'une orientation dans cette identification des mélanges d'anticorps.

L'interprétation des réactions positives et négatives observées est complexe et nécessite qualification, formation et expérience certaine.

■ VI. LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE RAI

VI.1- Le test indirect à l'antiglobuline

Le test indirect à l'antiglobuline (IAT) est la réaction fondamentale dans la recherche des anticorps anti-érythrocytaires. Il existe plusieurs variantes qui ont leurs avantages propres.

VI.1.1- Le test indirect normal

* **Lavage** : la gamme d'hématies-tests doit être lavée trois fois en solution saline 0,15M et mise en suspension à 3 % en solution saline 0,15M.

* **Sensibilisation** : mettre en présence dans un tube à hémolyse identifié 100 µL de sérum à tester 50 µL de la suspension globulaire. Laisser incuber à + 37 °C durant 35 min au bain-marie ou 40 min à l'étuve.

* **Lavage** : les hématies sensibilisées doivent de nouveau être lavées trois fois en solution saline en décantant tout le surnageant après chaque lavage.

* **Phase antiglobuline** : ajouter dans chaque tube 100 µl d'antiglobuline, puis centrifuger pendant 1 min à 130 g. La lecture est macroscopique ou microscopique.

VI.1.2- Le test indirect en basse force ionique

L'utilisation d'un milieu basse force ionique (BFI) entraîne une réduction du temps d'incubation à 12 min au bain-marie et à 15 min à l'étuve.

VI.1.3- Le test indirect par filtration (gel ou billes)

Le test indirect par filtration doit être effectué selon les recommandations du producteur. C'est le test le plus performant, le plus sécurisant et le plus utilisé de nos jours.

VI.1.4- Le test indirect en phase solide

Le test indirect en phase solide doit être effectué selon les conditions techniques décrites par le producteur.

VI.2- Le test aux enzymes protéolytiques

Le traitement des hématies-tests lavées de la gamme doit être réalisé selon les conditions précisées par le producteur sur la notice d'utilisation. Les temps de traitement doivent être scrupuleusement respectés et suivis immédiatement de lavages préconisés.

VI.2.1- Technique par filtration

Le test par filtration sur hématies traitées par les enzymes doit être effectué selon les procédures validées et décrites par le producteur.

VI.2.2- Technique en phase solide

Le test en phase solide doit être effectué selon les conditions techniques décrites par le producteur.

■ VII. INTERPRÉTATION ET RENDU DES RÉSULTATS

Le dépistage est soit négatif, soit positif. Si le dépistage est négatif, la RAI est négative. Si le dépistage est positif, il convient de déterminer la spécificité des anticorps.

L'identification de la spécificité nécessite de trouver une relation entre les réactions positives et négatives observées avec la présence ou l'absence d'un antigène sur les hématies testées correspondant à l'anticorps suspecté.

Dans tous les cas, il faudra, a minima, procéder :

- à une validation phénotypique pour vérifier l'absence de l'antigène correspondant à l'anticorps suspecté,
- au phénotypage RH-KEL1, puisque tout patient possédant (ou ayant possédé) un anticorps doit être transfusé avec du sang qualifié phénotypé et compatibilisé.

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. Dans certaines situations, il est parfois nécessaire de procéder à des adsorptions du sérum sur des hématies-tests sélectionnées, possédant l'un des antigènes concernés par le mélange d'anticorps. On procède ensuite à une élution secondaire de l'anticorps fixé sur ces hématies, pour obtenir l'isolement d'un premier anticorps à l'état libre. Le sérum adsorbé sera de nouveau testé sur les différentes gammes d'hématies-tests d'identification pour confirmer la ou les spécificité(s) du ou des anticorps non adsorbé(s).

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. Les modalités d'adsorption dépendent des antécédents transfusionnels ou obstétricaux proches ou lointains (adsorption homologue avec des hématies-tests dépourvues de l'ensemble des antigènes immunogènes, ou auto-adsorption) ;

– 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°C) informatives ou dépourvues d'antigènes de grande fréquence,

– mais aussi la disponibilité d'unités de sang rare, en cas de besoin transfusionnel.

L'étude des problèmes complexes d'identification précités relève d'un laboratoire référent régional de l'établissement français du sang qui fera éventuellement appel au CNRGS.

Dans tous les cas, les résultats de RAI positive doivent mentionner les spécificités des anticorps identifiés et la validation du phénotype du patient. Le résultat sera complété par une mention biologique faisant état de l'obligation de demander, en cas de besoin transfusionnel, du sang phénotypé RH-KEL1 a minima et qualifié compatible. Pour les

anticorps dirigés contre un antigène de grande fréquence, un programme de transfusion autologue programmée pourra éventuellement être envisagé en fonction de l'état du patient, sinon, il faudra recourir au CRNGS. S'il s'agit d'une femme enceinte, il sera fait état du risque d'incompatibilité fœto-maternelle et de la nécessité de sa prise en charge par un laboratoire référent régional de l'EFS en coordination, initialement, avec un centre spécialisé dans le diagnostic anténatal, puis secondairement avec le centre régional de thérapie fœtale.

■ CONCLUSION

LA RAI est un acte diagnostique pré-thérapeutique qui doit être réalisé dans les meilleures conditions possibles :

- choix de procédés performants permettant automation et informatisation,
- utilisation de réactifs enregistrés auprès de l'AFSSAPS et agréés par le CNRGS,
- réalisation de contrôles internes quotidiens pour déceler toute anomalie engendrée par une technicité ou un réactif (antiglobuline ou hématies-tests) déficient.

BIBLIOGRAPHIE

1. Arrêté du 8 février 1984 (JO du 17 mars 1984) fixant les caractéristiques et les normes des réactifs utilisés en immuno-hématologie.
2. Circulaire DGS/3B/552 du 17 mai 1985 relative à la prévention des accidents transfusionnels et des accidents d'allo-immunisation.
3. SALMON CH., CARTRON J.P., ROUGER Ph. Les groupes sanguins chez les hommes. Paris, Masson, 2^e éd., 1990.
4. BROSSARD Y. Dépistage, prévention des incompatibilités fœto-maternelles érythrocytaires. Rôle du biologiste. La gazette de la Transfusion, 1993, 85, 29-34.
5. BURIN DES ROSIERS N., NASR O. Recherche des anticorps irréguliers par la méthode du gel test. Analyse de 35 582 échantillons. Rev. Fr. Transf. Hémodiol. 1993, 36, 391-399.
6. Arrêté du 4 août 1994 (JO du 26 août 1994) portant homologation du règlement de l'agence française du sang relatif aux bonnes pratiques de distribution et pris en application de l'article L 668-3 du code de la santé publique.
7. MANNESSIER L., VALAT A.S., CODACCIONI X., PUECH F., HUART J.J. La surveillance immuno-hématologique des femmes enceintes. Revue du gynécologue, 1994, 2, 7, 425-430.
8. MANNESSIER L., LEJEALLE A., RABA M., le Groupe Immunohématologie de la Société Française de Transfusion Sanguine. Etude de la réactivité des antigènes des hématies-test en solution de conservation. TCB.1994, 4, 905-906.

9. LAMY B., TISSOT C., HEYD C., LAMY C. Red cell antibody screening, red cell antibody identification and compatibility testing with the Column Agglutination Technology (CAT). The Biovue System. TCB, 1994, 2, 121-127.
10. Arrêté du 4 janvier 1995 (JO du 31 janvier 1995) portant homologation du règlement de l'Agence Française du Sang relatif aux bonnes pratiques de qualification biologique du don et pris en application de l'article L.668-3 du code de la santé publique.
11. SHULMAN L.A., PETZ L.D. Red cell compatibility testing. Clinical practice of transfusion medicine. New York. Churchill. Livingston, ed 1996, 199.
12. Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.

ÉPREUVE DIRECTE DE COMPATIBILITÉ AU LABORATOIRE (EDC)

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

L'épreuve directe de compatibilité au laboratoire des produits sanguins labiles (PSL) érythrocytaires, fondamentale pour la prévention des accidents immuno-hémolytiques de la transfusion sanguine, est l'examen immuno-hématologique pré-transfusionnel le plus long et le plus délicat. L'EDC est obligatoire en cas de transfusion prévue pour les patients ayant développé un allo-anticorps, les nouveau-nés présentant un test direct à l'antiglobuline positif ou issus d'une mère possédant des anticorps anti-érythrocytaires autres que des anti-A ou anti-B, les fœtus et les patients possédant un phénotype érythrocytaire rare. L'EDC doit être pratiquée avec des unités qualifiées phénotypées RH-KEL1 a minima et antigéno-compatibles avec les allo-anticorps présents chez le patient.

L'EDC est un examen biologique de réalisation techniquement complexe qui s'adresse à des patients que l'on pourrait dénommer « receveurs dangereux ». Elle devrait pour ces deux raisons être automatisée.

■ I. RAPPELS DES MODALITÉS TECHNIQUES DE L'EDC

L'EDC, examen complémentaire de la RAI consiste à tester le sérum ou le plasma du receveur vis-à-vis des hématies contenues dans la tubulure du concentré globulaire à transfuser.

L'EDC s'effectue après :

- vérification des antécédents du patient : groupes sanguins ABO-RH1, phénotype RH-KEL1, phénotype étendu, RAI, test direct à l'antiglobuline (DAT) et notion d'incident transfusionnel...
- recherche et identification des anticorps anti-érythrocytaires qui doivent être réalisées sur le même prélèvement que celui utilisé pour réaliser l'EDC,
- vérification technique de la compatibilité des groupes sanguins ABO du receveur et de celui des unités à transfuser,
- vérification de l'antigéno-compatibilité entre le phénotype du receveur, ses anticorps éventuels (ou antécédents) et les unités à compatibiliser.

L'EDC est effectuée selon les mêmes conditions techniques que la RAI après sélection des unités à comptabiliser et la préparation des hématies de la tubulure de l'unité à transfuser.

Une des difficultés du test réside dans la sécurisation de l'identification positive de la tubulure et du tube secondaire utilisé dans le test, à partir du numéro codé en barres de l'unité de PSL.

Il est donc souhaitable de :

- de prendre les mesures indispensables au maintien de la chaîne du froid,
- d'identifier la tubulure du PSL à l'aide d'une étiquette codée en barres disponible sur la poche, avant de la désolidariser de la poche,
- dupliquer le numéro codé en barres sur des étiquettes (ou utiliser des étiquettes disponibles sur la poche) qui seront apposées sur les tubes secondaires et les supports utilisés pour le test,
- de vérifier « informatiquement » l'étiquetage secondaire du tube et du support par rapport au concentré globulaire.

Pour des raisons évidentes d'hygiène et de sécurité, il est fortement recommandé d'utiliser des dispositifs à usage unique pour perforer la tubulure.

Comme pour toute analyse de biologie médicale, il est impératif de valider l'EDC à l'aide de contrôles de qualité internes (CQI). C'est une démarche qualité de type préventif qui permet, en vérifiant le fonctionnement du processus analytique interactif (matériel-technique-réactif) dans son ensemble, la détection de toute anomalie, erreur ou altération des résultats. Ce CQI devrait être effectué a minima une fois par jour à l'aide de deux anticorps faibles : un anticorps actif uniquement en test indirect à l'antiglobuline (IAT) (anti-FY1 par exemple) et un anticorps actif uniquement en technique enzymatique (anti-RH) par exemple.

L'obtention des résultats conformes à ceux attendus permet au personnel technique, sous la responsabilité du biologiste, d'effectuer la validation analytique. En cas de résultats non conformes, des procédures doivent préciser les mesures à prendre. Le responsable du laboratoire doit être immédiatement informé de toute anomalie des résultats des CQI pour analyser les causes du dysfonctionnement et y apporter une mesure corrective adaptée et rapide. L'ensemble des résultats obtenus avec les CQI et les éventuelles mesures correctives prises en cas d'anomalie doivent être consignés et archivés.

■ II. INTERPRÉTATION

En cas de réaction positive, l'unité est incompatible. S'il s'agit d'auto-anticorps et après avoir vérifié l'absence d'allo-anticorps masqué, l'unité peut dans certains cas être attribuée.

En cas de réaction négative, l'unité est compatible. Il convient bien évidemment d'avoir vérifié la conformité des résultats obtenus avec les CQI.

■ III. ARBRES DÉCISIONNELS

Plusieurs situations biologiques schématiques peuvent être rencontrées. Elles sont en cours d'étude au sein du groupe Immuno-hématologie de la Société Française de Transfusion Sanguine et seront publiées prochainement dans *Transfusion Clinique et Biologique*. Nous évoquons ici simplement la conduite transfusionnelle à tenir en présence des allo-anticorps les plus fréquents.

Présence dans le sérum d'un anticorps immun ou antécédent d'allo-immunisation

– il s'agit d'un anticorps du système RH : anti-RH1,-RH2,-RH3,-RH4,-RH5

L'EDC sera réalisée avec du sang qualifié phénotypé RH-KEL a minima.

– il s'agit d'un allo-anticorps dirigé contre un autre antigène d'un autre système (anti-FY1,-FY2,-JK1,-JK2,-MNS3,-MNS4) ou d'un mélange d'anticorps

L'EDC sera réalisée avec du sang qualifié phénotypé RH-KEL1 et a minima phénotypé étendu antigéno-compatible avec le phénotype du patient et son anticorps.

– il s'agit d'un auto-anticorps

L'EDC doit être réalisée après adsorption de l'auto-anticorps. Dans ce cas, il est vivement conseillé de transfuser avec du sang phénotypé RH-KEL1.

– il s'agit d'un fœtus ou d'un nouveau-né issu d'une maman allo-immunisée,

L'EDC sera pratiquée avec le sérum maternel ou à défaut celui du nouveau-né. Quel que soit le groupe ABO-RH1 du nouveau-né et de sa mère, l'EDC se pratiquera avec des concentrés globulaires de groupe O non isogroupe et du plasma sécurisé de groupe AB. En fonction de la spécificité des anticorps maternels, il sera utilisé du sang phénotypé RH-KEL1 a minima ou phénotypé étendu antigéno compatible avec le phénotype de l'enfant et les anticorps maternels.

– il s'agit d'un nouveau-né dont la RAI maternelle est négative, mais il présente un DAT positif (anti-privé).

L'EDC sera pratiquée avec le sérum maternel ou à défaut celui du nouveau-né. Quel que soit le groupe du nouveau-né et de sa mère, l'EDC se pratiquera avec du sang de groupe O non isogroupe phénotypé RH-KEL1.

■ CONCLUSION

L'EDC restera l'analyse pré-transfusionnelle la plus complexe et la plus longue à réaliser. Elle nécessite un certain nombre de précautions élémentaires telle que l'identification positive de la tubulure grâce à la duplication des numéros codés en barres, l'utilisation de dispositifs de perforation de tubulures à usage unique.

De par sa complexité et compte tenu du risque potentiel immédiat d'incident immunologique chez le « receveur dangereux » immunisé en cas d'anomalie dans le processus de préparation, il est vivement recommandé d'automatiser les tests d'EDC.

BIBLIOGRAPHIE

1. MANNESSIER L. Immuno-hématologie érythrocytaire et sécurité transfusionnelle. Option Bio 1999, supplément au n° 241/242.
2. MOLLISON PL, Blood transfusion in clinical medicine, 9th edition, Blackwell Publishers, Oxford, 1993.
3. WIDMAN FK. Technical Manual. 13th ed. Arlington VA : AABB, 1993.
4. Arrêté du 4 août 1994 portant homologation du règlement de l'Agence française du sang relatif aux bonnes pratiques de distribution et pris en application de l'article L 668-3 de Code de la santé publique. JO de 26 août 1994.
5. Arrêté du 4 janvier 1995 portant homologation du règlement de l'Agence française du sang relatif aux bonnes pratiques de qualification biologique du don et pris en application de l'article L 668-3 du Code de la santé publique.
6. Circulaire DGS/3B/552 du 17 mai 1985 relative à la prévention des accidents transfusionnels et des accidents d'allo-immunisation.
7. ROUGER P., SALMON C. La pratique de l'agglutination des érythrocytes et du test de Coombs. Paris, Masson, 1981.
8. Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale. JO du 11 décembre 1999.
9. MANNESSIER L., ROUBINET F., DELAMAIRE M., CHIARONI J., LEJEALLE A. Validation analytique en immunologie érythrocytaire. Transfus Clin Biol 2000, suppl 1, 51-54.
10. MANNESSIER L., LEJEALLE A., RABA M., le groupe Immuno-hématologie de la Société Française de Transfusion Sanguine. Etude de la réactivité des antigènes des hématies-tests en solution de conservation. Transf. Clin. Biol. 1994, 4, 905-906.
11. ANDREU G., BELHOCINE R., KLAREN J. Règles de compatibilité transfusionnelle. Encycl. Méd. Chir., Elsevier, Paris. Anesthésie-Réanimation.
12. Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.

VALIDATION ANALYTIQUE EN IMMUNOHÉMATOLOGIE ÉRYTHROCYTAIRE

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Qu'il s'agisse d'un contexte transfusionnel ou fœto-maternel, le risque d'hémolyse immunologique résultant d'une incompatibilité par anticorps anti-érythrocytaires (irrégulier et régulier) présent chez le receveur reste le plus fréquent et le plus grave. La prévention de ce risque repose sur un certain nombre d'actions comme la réalisation des analyses immuno-hématologiques dont les modalités pratiques sont légiférées en raison de leurs conséquences cliniques graves. Plusieurs éléments interviennent dans la fiabilité des analyses et de leurs résultats. Ce sont la sélection des réactifs et leur validation dans la technique utilisée en routine, les validations à réception, les contrôles des éventuelles préparations secondaires (hématies-tests par exemple) et les contrôles quotidiens internes (CQI). Ceci nécessite le choix de témoins adaptés et la gestion des éventuelles anomalies.

■ PRINCIPES GÉNÉRAUX

Les réactifs utilisés doivent être conformes aux caractéristiques et normes définies par la réglementation en vigueur. Jusqu'en 2003, coexisteront 2 réglementations recevables :

- une réglementation nationale découlant du décret d'avril 1996 imposant l'enregistrement par l'Agence Française de Sécurité sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) et la certification de conformité délivrée par le Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins (CNRGS) qui en cas de conformité délivrera un certificat attribué d'un numéro.
- et une réglementation européenne émanant de la directive 98/79.

Les réactifs doivent être conservés et utilisés selon les conditions préconisées par le producteur (dans le cas contraire, un dossier de validation doit être constitué) et ne jamais être utilisés au delà de leur péremption.

A chaque réception et quotidiennement, l'activité des réactifs doit être contrôlée à l'aide d'une gamme d'échantillons témoins connus testés dans les conditions techniques de routine.

La réalisation des analyses peut être manuelle mais l'automatisation avec identification positive de l'échantillon, lecture et transfert automatisé des résultats dans le module informatique du laboratoire est vivement recommandée. Ceci nécessite la qualification, la validation et la maintenance de l'automate (et du logiciel informatique) ainsi que la validation du couple automate-réactifs.

■ I. CONTRÔLE DES RÉACTIFS À RÉCEPTION

Les contrôles à réception ont pour but de vérifier leur performance par rapport aux normes officielles en vigueur et au certificat de conformité du CNRGS. Ils permettent ainsi de détecter des anomalies éventuellement liées à une erreur de fabrication ou de répartition, de mauvaises conditions de transport ou de stockage...

Par ailleurs, l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale mentionne :

- « le biologiste doit vérifier que les réactifs répondent à la réglementation en vigueur et qu'ils sont employés et conservés selon le mode opératoire préconisé par le fabricant dans leur notice d'utilisation »,
- « les réactifs préparés et/ou reconstitués au laboratoire doivent porter la date de leur préparation ainsi que celle de leur péremption. Ces manipulations doivent faire l'objet de procédures opératoires concernant la préparation et le contrôle des réactifs ainsi obtenus. Chaque fabrication d'un lot doit être consignée dans un document qui est archivé avec le résultat du contrôle correspondant. Le biologiste doit pouvoir justifier que les résultats obtenus grâce à l'utilisation des réactifs ainsi préparés sont de même qualité que ceux fournis par les réactifs de fabrication industrielle quand ils existent »,
- « dans le cas d'automates permettant d'effectuer des analyses autres que celles prévues par le fabricant ou utilisant des réactifs non fournis par celui-ci, toute extension d'utilisation non validée par le fournisseur engage la responsabilité du biologiste ».

I.1- Sérums-tests et antiglobuline (liquide ou incorporé dans des supports de réaction : cartes de filtration et microplaque)

La validation interne comporte conformément à la législation en vigueur l'étude des paramètres obligatoires que sont l'intensité, le titre et le score. En cas d'utilisation différente de celle mentionnée sur la notice du fabricant, une étude de la spécificité est à réaliser. Une étude complémentaire de la stabilité doit par ailleurs être pratiquée en cas de dilution du réactif.

I.2- Hématies-tests

Les contrôles doivent être adaptés au réactif : sang total nécessitant une préparation secondaire ou gammes d'hématies-tests prêtes à l'emploi :

- lorsque les hématies sont prêtes à l'emploi et utilisées selon les instructions du fournisseur, la validation interne est inutile à l'exception de celle des gammes de dépistage et d'identification des anticorps anti-érythrocytaires qui doit comporter une étude au minimum vis-à-vis de 2 anticorps : anti-RH et anti-FY1 par exemple,
- lorsque les hématies sont utilisées après un traitement secondaire nécessitant une validation interne du procédé de préparation, chaque lot doit être soumis aux contrôles de répartition des différentes hématies-tests et de leur concentration, du traitement enzymatique et de la mise en suspension en basse force ionique s'ils ont lieu. En ce qui concerne les gammes d'hématies-tests pour recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI), elles seront donc soumises à une RAI, par les 2 techniques obligatoires à ce jour

que sont le test à l'antiglobuline polyvalente et le test enzymatique, vis-à-vis d'une batterie d'anticorps faibles de différentes spécificités. A titre d'exemple peuvent être utilisés les anticorps suivants : anti-RH1, anti-RH3, anti-RH4, anti-KEL1, anti-FY1, anti-JK1 et anti-MNS3.

La démarche sera identique en ce qui concerne les supports de réaction pour RAI et épreuve directe de compatibilité au laboratoire (EDC).

I.3- Solutions d'enzymes

Dans le cas où le traitement enzymatique est effectué au sein du laboratoire, il convient de le valider en attestant son efficacité par l'étude de 2 paramètres :

- la destruction antigénique en démontrant la présence et l'absence, avant et après traitement enzymatique, d'antigènes susceptibles d'être détruits (par exemple : hématies-tests d'expression homozygote pour les antigènes FY1, 2 ou MNS1,2 ou MNS3,4...),
- la capacité de détection, par titrage comparatif sur hématies traitées et non traitées, d'anticorps reconnaissant des antigènes exaltés (RH1 par exemple) ou à l'aide d'anticorps témoins sélectionnés pour leur faible réactivité vis-à-vis d'hématies traitées par les enzymes.

■ II. CONTRÔLES QUOTIDIENS INTERNES (CQI)

Ils sont spécifiés pour chaque analyse dans l'arrêté du 26 avril 2002.

L'objectif des CQI est de vérifier le fonctionnement du processus analytique dans son ensemble et de détecter toute anomalie ou altération pouvant être liée :

- à de mauvaises conditions techniques : distribution, agitation,
- centrifugation, lecture,
- à une altération des réactifs (10) ou des supports de réaction.

Les témoins utilisés pour les CQI peuvent être

- des échantillons de sang ou de plasma de donneurs contenant des anticorps anti-érythrocytaires de faible titre,
- des échantillons de sérum ou de plasma de patients dont la spécificité de l'anticorps a été validée avec d'autre(s) réactif(s) que ceux utilisés en routine,
- ou à défaut des réactifs commerciaux dilués.

Les échantillons de sang utilisés pour les CQI des typages érythrocytaires et des tests directs à l'antiglobuline seront conservés à + 4 °C pendant une durée maximum de 7 jours.

Une attention particulière sera apportée aux témoins nécessaires pour la validation du test direct à l'antiglobuline. En effet, la préparation de ces témoins à partir d'échantillons de sang de donneurs nécessite de sensibiliser in vitro :

- des hématies RH1 par de l'anticorps anti-RH1 de faible titre pour obtenir une intensité de réaction faible (+),

– des hématies par du complément en utilisant un tampon de basse force ionique comme le sucrose.

L'utilisation d'échantillons d'hématies de patients sensibilisées in vivo par des anticorps IgG ou des fractions du complément apparaît à ce jour comme une alternative plus pratique et plus fonctionnelle.

Les échantillons de plasma contenant des anticorps anti-érythrocytaires sont aliquotés sous une forme prête à l'emploi, à la dilution retenue pour chaque anticorps et sous un volume correspondant au débit journalier. Ils sont conservés congelés à -30°C et décongelés au bain-marie à $+37^{\circ}\text{C}$ extemporanément. Les processus de conservation doivent avoir été validés au préalable.

II.1- Typages érythrocytaires

Pour chaque série d'analyses et au minimum une fois par jour, les réactifs utilisés pour la détection des antigènes érythrocytaires des groupes sanguins ABO-RH1 et phénotypes RH-KEL1 doivent être testés vis-à-vis d'hématies-tests de groupe ABO-RH1 et phénotype RH-KEL1 connus : hématies A, B et O et hématies d'expression hétérozygote et négative pour les différents antigènes RH et KEL1. Ces contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions techniques que celles des échantillons. Les hématies-tests A1, A2 et B doivent aussi être testées vis-à-vis des réactifs anti-A, anti-B et anti-A, B et l'intensité des réactions notée.

La recherche des autres antigènes érythrocytaires comporte le même type de CQI : hématies de phénotype connu d'expression hétérozygote et négative vis-à-vis des différents antigènes.

II.2- Test direct à l'antiglobuline

Pour chaque série d'analyses, doivent être pratiqués un témoin négatif et les témoins positifs précités.

II.3- RAI et EDC

Au minimum, une fois par jour, 2 témoins positifs de titre faible doivent être réalisés : un anti-RH1 pour la technique enzymatique et anti-FY1 ou un anti-KEL1 pour le test indirect à l'antiglobuline par exemple. Les résultats des différentes analyses sont ensuite transférés ou transcrits après vérification et validation biologique de la conformité des résultats des CQI.

■ III. VALIDATION ANALYTIQUE

III.1- Typages érythrocytaires

La validation analytique du typage érythrocytaire repose :

– sur les résultats attendus des CQI,

- la concordance pour le groupage sanguin ABO entre les résultats des recherches des antigènes globulaires et des anticorps plasmatiques,
- la négativité des témoins RH et KEL1,
- l’absence de fausses réactions positive ou négative, d’image de double population, d’agglutination anormalement faible, et la non-absence de 2 antigènes antithétiques,
- la concordance des résultats avec les 2 lots différents de réactifs, et entre les déterminations effectuées sur 2 prélèvements différents (ou avec l’antériorité).

III.2- RAI et l’EDC

La validation analytique de la RAI repose sur :

- les résultats attendus des CQI,
- l’étude d’un nombre suffisant d’hématies-tests pour s’assurer que la distribution des réactions observées n’est pas due au hasard, et notamment, s’assurer de l’absence de tout autre anticorps que celui identifié, à l’aide d’hématies d’expression homozygote pour les principaux antigènes immunogènes en particulier,
- la validation phénotypique consistant à vérifier l’absence de l’antigène correspondant à l’anticorps suspecté,
- la détermination du phénotype RH-KEL1 en cas de RAI positive, puisque tout patient possédant un anticorps anti-érythrocytaire doit être transfusé avec du sang de phénotype RH-KEL1 antigéno-compatible et soumis à une EDC,
- la détermination des groupes sanguins ABO-RH1 pour pouvoir établir une carte de groupes sanguins ou compléter celle existante.

La validation des EDC repose sur les résultats attendus des CQI et de l’absence de réactions positives avec les échantillons des hématies provenant des tubulures des unités de sang destinées au patient.

III.3- Test direct à l’antiglobuline

La validation du test direct à l’antiglobuline repose sur les résultats attendus des CQI et de la négativité du témoin réactif.

■ CONCLUSION

La qualité et la fiabilité des analyses d’immuno-hématologie reposent en grande partie sur les conditions d’utilisation des réactifs au laboratoire. Pour s’assurer de leur conformité, ces derniers, doivent avant leur utilisation, faire l’objet d’une validation interne adaptée. Au cours de leur utilisation, les CQI permettront de s’assurer du maintien de leur performance au sein du système « matériel-réactifs-technique ».

BIBLIOGRAPHIE

1. Arrêté du 19 avril 1985 relatif aux examens médicaux pré et post-natals.
2. Circulaire DGS/3B/552 du 17 mai 1985 relative à la prévention des accidents transfusionnels et des accidents d'allo-immunisation.
3. Décret du 14 février 1992 relatif aux examens obligatoires prénuptial, pré et postnatal.
4. Arrêté du 4 août 1994 portant homologation du règlement de l'Agence française du sang relatif aux bonnes pratiques de distribution et pris en application de l'article L. 668-3 du code de la santé publique.
5. Arrêté du 3 janvier 1995 portant homologation du règlement de l'Agence française du sang, relatif aux bonnes pratiques de qualification biologique du don et pris en application de l'article L. 668-3 du code de la santé publique.
6. Arrêté du 8 février 1984 précisant les caractéristiques et normes des réactifs en immuno-hématologie érythrocytaire.
7. Décret N° 96-351 du 19 avril 1996 relatif aux réactifs mentionnés à l'article L. 761-14-1 du code de la santé publique.
8. Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.
9. Cahier thématique : Immuno-hématologie érythrocytaire et sécurité transfusionnelle coordonné par L. Mannessier Ed. Elsevier, 1999, suppl N° 241/242.
10. MANNESSIER L., LEJEALLE A., RABA M., le groupe Immuno-hématologie de la Société française de transfusion sanguine. Etude de la réactivité des antigènes des hématies-test en solution de conservation. *Transf. Clin. Biol.*, 1994, 4, 905-906.
11. Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.

CAHIER DE
Formation
Biologie médicale

Cahiers de formation déjà parus

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| N° 1 : HÉMATOLOGIE | N° 15 : DÉPISTAGE |
| N° 2 : IMMUNOANALYSE | DE LA TRISOMIE 21 |
| N° 3 : PARASITOLOGIE | N° 16 : IMMUNO-ALLERGIE (2) |
| N° 4 : BACTÉRIOLOGIE | N° 17 : VIRUS DES HÉPATITES |
| N° 5 : HORMONOLOGIE | A (VHA) et E (VHE) |
| GAZOMÉTRIE | N° 18 : DOSAGE DES MÉDICAMENTS |
| N° 6 : G.B.E.A. | TOME II |
| N° 7 : IMMUNO-ALLERGIE (1) | N° 19 : VAGINITES ET VAGINOSES |
| N° 8 : HÉMOGLOBINES GLYQUÉES | N° 20 : HÉMOSTASE ET THROMBOSE |
| LIPIDES | N° 21 : VIRUS DES HÉPATITES |
| N° 9 : DOSAGE DES MÉDICAMENTS | B (VHB), DELTA (VDH), |
| TOME I | C (VHC), AUTRES |
| N° 10 : HÉMATOLOGIE | N° 22 : SYNDROME |
| CAS ILLUSTRÉS | DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES |
| N° 11 : AMIBES ET FLAGELLÉS | N° 23 : PARASITES SANGUINS |
| INTESTINAUX | N° 24 : BIOCHIMIE PEDIATRIQUE |
| N° 12 : LES MALADIES A PRIONS | N° 25 : LES MOISSISSURES |
| N° 13 : AUTOIMMUNITÉ | D'INTÉRÊT MÉDICAL |
| ET AUTOANTICORPS | |
| N° 14 : L'EXPLORATION | |
| DE LA THYROÏDE | |

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m. privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A., et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes. (S.d.B., S.N.M.B., et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privés et hospitaliers, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros, ou épuisés en version papier, seront disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net à partir de 2002.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6 500 exemplaires.