

Faculté de Pharmacie de Monastir

Travaux Pratiques d'Immunologie Erythrocytaire et Leuco plaquettaire

EPU D'HEMATOLOGIE

Fascicule Préparé en 2007 par :

- Pr. HMIDA Slama
- Pr. YACOUB JEMNI Saloua
- A.H.U. : B HATIRA Saadia
- A.H.U : KAABI Houda
- Pr. Ag. MOJAAT Najet

Révisé en 2017 par:

- Pr. HMIDA Slama
- Pr. YACOUB JEMNI Saloua
- AHU.ABDELKEFI Saadia
- Pr.Ag CHAABANE Manel

S O M M A I R E

I) Immunologie Erythrocytaire

- 1) Les difficultés du groupage ABO –Rh
- 2) Les anticorps naturels et immuns du système ABO
- 3) La recherche des substances ABH et Lewis dans la salive
- 4) Epreuve de fixation élution
- 5) Les anticorps immuns et les méthodes d'agglutination artificielle
 - 5 - 1 - Recherche des Ac immuns (RAI)
 - 5 - 2 - Identification des allo anticorps
- 6) Etude des anémies hémolytiques auto-immunes

II) Immunologie leuco- plaquettaire

- 1) Panel lymphocytaire
 - 1 - 1 - Séparation des lymphocytes totaux sur Ficoll
 - 1 - 2 - Séparation des lymphocytes B sur billes magnétiques
 - 1 - 3 - Congélation des lymphocytes
- 2) Recherche des Ac anti HLA par lymphocytotoxicité
- 3) Test de compatibilité lymphocytaire

IMMULOGIE
ERYTHROCYTAIRE

LES DIFFICULTES DU GROUPAGE ABO ET RH

I/ GROUPAGE ABO

A/ Rappel

- 1) Le prélèvement
- 2) Le groupage sanguin
- 3) Les témoins

B/ Difficultés

- 1) Discordance entre l'épreuve globulaire et sérique avec l'un des témoins positif
 - a) Témoin allo positif
 - b) Témoin AB positif
 - c) Témoin auto positif
- 2) Discordance entre l'épreuve globulaire et sérique avec des témoins négatifs
 - a) Sang de nouveau-né
 - b) Titre d'anticorps faible (immunodéprimé)
 - c) Allogreffe ABO incompatible : incompatibilité ABO mineures
 - d) La présence d'un anti-A₁ naturel
 - e) Les variants du groupe A
 - f) Les variants du groupe B
 - g) Présence d'hémolysines ABO à titre élevé
- 3) Problèmes particuliers
 - a) La double population
 - b) Les fausses agglutinations : phénomène de rouleaux

II/ GROUPAGE RHESUS

A/ Introduction

B/ Les réactifs

- 1) Les réactifs anti-D polyclonaux
- 2) Les réactifs anti-D monoclonaux

C/ Techniques

LES DIFFICULTES DU GROUPE ABO ET RH

I - GROUPE ABO

A - Rappel

1 - Prélèvement

- Le prélèvement est effectué à la veine du pli du coude avec ou sans anticoagulant
- L'étiquette doit mentionner de façon lisible :
 - Le nom et le prénom, la date de naissance
 - Le numéro d'enregistrement

La sécurité du résultat dépend de la qualité du prélèvement et de l'exactitude et de la précision des informations transmises au laboratoire.

De même, les données de l'hémovigilance soulignent la persistance d'accidents transfusionnels dus à une fréquence encore trop élevée d'erreurs d'identification (ou d'usurpations d'identité) au moment du prélèvement. Plusieurs textes légiférés précisent les règles à respecter (circulaire n°60/98 du 05 juin 1998 révisée le 04 juin 2015 sur la sécurité transfusionnelle, manuel de bonnes pratiques)

2 - Groupage

Le groupage doit être effectué en double détermination par deux personnes différentes et deux séries de réactifs différentes. Chaque détermination doit comporter aussi bien l'épreuve globulaire que l'épreuve sérique (Beth -Vincent et Simonin-Michon) (circulaire n°32/2015 du 04 juin 2015)

Toute discordance entre les épreuves globulaire et sérique interdit de valider le groupe sanguin et impose :

- Dans un premier temps de vérifier l'aspect des sérums-tests, leur date de péremption, leur conformité d'activité (résultats des CQI) ainsi que l'aspect des hématies-tests et l'absence d'altération de l'échantillon de sang à tester.
- De différencier dans un deuxième temps, les vraies agglutinations des fausses agglutinations telles que le phénomène de rouleau qui peut être reconnu par une simple visualisation microscopique, et surmonté par un lavage des hématies et une

dilution du sérum

-De pratiquer dans un troisième temps les trois témoins qui valident l'épreuve globulaire et l'épreuve sérique afin de cerner à quel niveau se situe l'anomalie

3 – Les Témoins

- L'épreuve sérique est validée par le témoin allo
- L'épreuve globulaire est validée par le témoin AB
- Les auto-anticorps sont mis en évidence par le témoin auto.

Les auto-anticorps, interfèrent aussi bien dans l'épreuve globulaire que dans l'épreuve sérique.

On ne doit jamais donner une réponse définitive s'il n'y a pas de concordance entre l'épreuve globulaire et sérique.

4 – La double population

Il ne s'agit pas de difficulté de groupe mais il est important de savoir reconnaître une double population qui se caractérise :

- Sur plaque d'opaline par la présence d'agglutinats sur fond rosé d'hématies libres ;
- En gel-filtration, par la coexistence d'hématies ayant complètement traversé la colonne sans s'y arrêter avec d'autres qui persistent dans le dispositif
- En microplaque, par la constatation d'agglutinats dans un environnement plus ou moins rosé et non limpide.

Il peut s'agir d'un réel mélange de deux populations d'hématies possédant des antigènes différents (post-transfusionnel par exemple) ou d'une image de double population due à un antigène faible en présence de certains réactifs (phénotype A₃).

B - Difficultés

En pratique toutes les difficultés du groupage ABO peuvent être placées dans l'un des deux cadres suivants :

- Discordance entre l'épreuve globulaire et sérique avec des témoins négatifs
- Discordance entre les deux épreuves avec un ou plusieurs témoins ~~l'un des témoins~~ positifs

1 - Discordance entre l'épreuve globulaire et sérique avec un témoin positif

a - Témoin allo positif

Les anticorps naturels irréguliers interfèrent au niveau de l'épreuve sérique. Cette interférence se

traduit par une discordance entre l'épreuve globulaire et l'épreuve sérique.

Ces anticorps réagissent à basse température, et sont spontanément hémagglutinants. Les plus fréquemment rencontrés sont :

- Les anti-P1
- Les Anti-M et les anti-N
- Les anti-H des sujets A1 ou A1B
- Les anti-Lewis

Pour surmonter la difficulté liée à la présence de ces anticorps, il faut :

- Identifier l'allo-anticorps présent dans le sérum du malade à l'aide d'un panel érythrocytaire
- Refaire le groupage en utilisant des hématies tests dépourvues de l'antigène correspondant à l'anticorps identifié.

b -Témoin AB positif

Il est le garant de l'épreuve globulaire, sa positivité se traduit par une discordance entre l'épreuve globulaire et l'épreuve sérique et elle résulte d'une réaction de polyagglutinabilité.

La polyagglutinabilité des hématies est un phénomène immunologique. Il s'agit d'un antigène qui est démasqué ou anormalement présent à la surface des globules rouges et reconnu par un anticorps spécifique présent dans la plupart des sérums humains = antiT, antiTn...

Les phénomènes de polyagglutinabilité sont classés en deux catégories : les **polyagglutinabilités héréditaires** et les **polyagglutinabilités acquises**.

**** Les Polyagglutinabilités héréditaires**

- Polyagglutinabilité de type HEMPAS

Les hématies sont lysées à 37°C en présence de sérum acidifié et agglutinées à 4°C par les mêmes sérums, dans la dyserythropoïèse congénitale type HEMPAS (**H**ereditary **E**rythroblastic **M**ultinuclearity with a **P**ositive **A**cidified **S**érum lysis test)

- Polyagglutinabilité de type CAD

La structure antigénique démasquée possède un sucre immunodominant, le N-acétyl Galactosamine, reconnu par la lectine de Dolichos Biflorus. Il en résulte une agglutination avec le sérum test anti A1 (constitué de Dolichos-Biflorus) et ce quelque soit le groupe.

**** Les Polyagglutinabilités acquises**

Deux étiologies sont en cause :

- Les polyagglutinabilités d'origine microbienne

Elles sont de type T, Th et B acquis. Elles s'observent soit in vitro (contamination microbienne du prélèvement) soit in vivo, lors d'un syndrome infectieux.

Elles résultent d'une modification de la membrane érythrocytaire engendrée par l'action des enzymes de certains micro-organismes révélant ainsi les antigènes T, Th, Tk.

La polyagglutinabilité associée à l'antigène B acquis est liée à une modification enzymatique de l'antigène A, elle est observée chez un fort pourcentage de sujets atteints d'infections digestives.

- Les polyagglutinabilités d'origine non microbienne

Elles sont de type Tn, Va. Elles sont dues à l'absorption de certaines molécules comme la pénicilline par exemple à la surface des hématies rendant ces dernières agglutinables par les sérums humains possédant l'anticorps correspondant.

c -Témoin auto positif

La présence d'un auto-anticorps de classe IgM perturbe aussi bien l'épreuve globulaire que l'épreuve sérique.

Toutes les réactions sont fortement positives et le test d'auto-agglutination est positif.

Pour surmonter la difficulté au niveau de :

°° L'épreuve globulaire : en général, 2 ou 3 lavages en eau physiologique à 37°C permettent d'éluer les auto-anticorps. Si ces lavages restent insuffisants pour éluer la totalité des anticorps, on pratiquera une élution à 56°C pendant 10 mn. L'épreuve globulaire est validée par le témoin AB négatif.

°° L'épreuve sérique : la difficulté est surmontée par une ou plusieurs adsorptions du sérum du malade sur des hématies de GS O à + 4°C. L'épreuve sérique est validée par le témoin allo négatif .

2 - Discordance entre épreuve globulaire et sérique avec des témoins négatifs

a - Sang de nouveau-né

Les anticorps naturels sont souvent de titre faible, voire absents (souvent anticorps anti-A, anti-B

maternels) c'est le seul cas où une défaillance de l'épreuve sérique peut être acceptée.

Le prélèvement revêt une très grande importance. En effet le sang du cordon peut donner lieu à de fausses agglutinations en raison de la présence de mucopolysaccharides et de substance mucoïdes (gelée de Warthon). Il ne faut jamais pratiquer une épreuve globulaire sur sang de cordon sans laver au préalable les globules rouges 6 fois en milieu salin.

b - Titre d'anticorps faible (sujet immunodéprimé)

La discordance se traduit par une absence d'agglutination attendu à l'épreuve sérique sur plaque. Pour surmonter la difficulté, il faut faire l'épreuve sérique en tube avec incubation à +4 °C et utiliser des hématies est traitées par les enzymes protéolytiques.

Le diagnostic sera confirmé le diagnostic par électrophorèse et dosage des immunoglobulines.

c - Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ABO incompatibles :

Rappel : dans le cadre de la greffe de CSH on parle d'incompatibilité ABO :

- **Majeure : Receveur de GS O ; Donneur de GS A, B ou AB**
 - **Mineure : Receveur de GS A, B ou AB ; Donneur de GS O**
 - **Mixte : Receveur de GS A ou B ; Donneur de GS A ou B**
- Dans le cadre des incompatibilités ABO mineures : on assiste à une non parution de l'anticorps naturel dirigé contre le groupe initial du receveur. Cette non parution persiste plusieurs années après la greffe et elle peut rester à vie.

Ex : Donneur de GS :O Receveur de GS : A

Le GS du malade plusieurs années après la greffe donne à l'épreuve globulaire GS :O et à l'épreuve sérique GS : A (présence d'anti B- uniquement)

De même, dans les incompatibilités ABO mineures, on peut assister à une adsorption des substances ABH plasmatiques sur les GR O qui se traduit par une image de A faible qui n'agglutine qu'avec les sérums tests anti-AB en colonne de gel filtration.

- Dans le cadre des incompatibilités ABO majeures : (donneurs de GS :A-B-AB ; receveur de GS :O) on assiste à une disparition de l'anticorps naturel dirigé contre l'Ag du donneur.
- Dans le cadre des incompatibilités mixtes : on assiste à une disparition de l'Ac naturel dirigé contre l'Ag du donneur.

d - La présence d'un anti A1 naturel irrégulier

La présence d'un anti-A1 dans le sérum du patient se traduit par une discordance entre l'épreuve

globulaire et sérique. Il est rencontré chez :

- 2 % des sujets de phénotype A2,
- 25 % des sujets de phénotype A2B,
- Certains sujets de phénotypes A faibles.

La difficulté du groupage liée à la présence de cet anticorps naturel irrégulier est détectée par l'utilisation au niveau de l'épreuve sérique des hématies tests A1 et A2, et confirmé par l'utilisation d'un panel d'hématies test A1 et A2.

Ces anticorps naturels irréguliers n'ont pas de répercussion transfusionnelle parce que généralement ils sont présents à titre faible, et leur optimum thermique est situé à + 4°C.

e - Les variants du groupe A

Les phénotypes A faible peuvent être source de difficultés. Ils peuvent se traduire :

- Soit par une discordance entre l'épreuve globulaire et sérique (Am, Ay, Ael)
- Soit par une image de double population et une réactivité faible (A3, Aend, Ax)

Comment pouvons-nous surmonter la difficulté liée à ces phénotypes ?

La présence de l'antigène est démontrée par :

- L'épreuve de fixation élution
- La recherche des substances ABH dans la salive
- L'enquête génétique.

Parmi, les phénotypes A faibles on distingue, deux groupes :

❖ Les hématies sont agglutinées

- A3 : Image de double population par l'anti A des sujets B
: Réactivité < à celle des sujets A2
- A end : Image de double population
: Faible agglutination (à peine 10 %) par l'anti A des sujets B
- Ax : Agglutination est faible mais elle existe
: Détectée par l'anti A des sujets O et non des sujets B.

❖ Les hématies ne sont pas agglutinées

- Am : La Fixation élution est positive
: La substance A est présente en quantité

- normale dans la salive des sujets sécréteurs
- : La transmission est dominante (étude familiale)
- Ay : La fixation élution est difficile mais positive
- : La salive est faiblement positive
- : La transmission est de type récessif
- Ael : La fixation élution est difficile mais positive
- : Absence de substance A dans la salive
- : Présence de substance H dans la salive
- : La transmission est dominante.

f - Les variants du groupe B

La classification est simple, basée sur les mêmes critères que ceux qui ont été utilisés pour les A faibles : types d'agglutination, présence ou non d'anticorps dans le sérum, la sécrétion salivaire et le mode de transmission.

Cette classification distingue 4 phénotypes B faibles : B3, Bx, Bm, Bel.

On note qu'il n'existe pas pour le moment d'équivalent B end de A end ou d'équivalent By de Ay.

g - Présence d'hémolysine ABO à titre élevé

La présence d'hémolysine anti-A et / ou anti-B à titre élevé chez les sujets de GS O peut se traduire au niveau de l'épreuve sérique par une agglutination plus faible avec les hématies tests A et/ou B associée à l'hémolyse d'une partie ou de la totalité de ces hématies tests.

Pour surmonter le problème, il faut décomplémenter le sérum pendant 30 mn à 56°C et refaire l'épreuve sérique.

Beth Vincent			Simonin	T Allo	T Auto	T AB
Anti A	anti B	anti AB	A1	A2	B	
-	-	-	-	-	+++	-
			ou (+)	ou (+)		

3 - Problèmes particuliers

a - Double population ABO

L'agglutination avec les anticorps anti A et / ou anti B et anti AB n'est pas totale.

Il existe des GR libres.

Cette image de double population se remarque particulièrement sur plaque d'opaline, lors de la détermination du groupe ABO, les agglutinats baignent sur un fond rose.

L'image de double population peut s'observer dans les situations suivantes :

- Les transfusions non iso-groupe = Malade de groupe A (ou B ou AB) transfusé avec du sang de GS O
- L'hémorragie fœtale : les GR du fœtus peuvent pénétrer dans la circulation maternelle
- Les groupes A faibles : (A3, Aend)
- Les chimères : ce sont des mosaïques constituées de deux populations de cellules provenant de deux zygotes génétiquement différents.

On peut voir aussi des chimères par dispermie, où il y a une double fécondation produisant en quelque sorte des jumeaux en un seul individu. On les appelle des « chimères dispermiques ».

Les jumeaux chimères sont donc des jumeaux dizygotes ayant échangé des cellules souches hématopoïétiques pendant la vie embryonnaire, par la suite mutuellement tolérées. Les deux populations diffèrent généralement par plusieurs systèmes de GS.

b - Les fausses agglutinations = phénomène de rouleaux

Dans les macroglobulinémies, les myélomes et les hyperfibrinémies, on peut observer une sédimentation si rapide des hématies qu'elle peut passer pour une agglutination. En fait, le témoin AB avant le lavage des hématies se révèle positif.

La difficulté est surmontée au niveau :

°° De l'épreuve globulaire par un simple lavage des hématies avec de l'eau physiologique, l'épreuve globulaire est validée par le T AB nég.

°° De l'épreuve sérique en diluant légèrement (au 1/2 ou au 1/3) le sérum dans l'eau physiologique tout en préservant le pouvoir hémagglutinant des anticorps du système ABO.

L'épreuve sérique est validée par un témoin allo négatif.

II - LE GROUPE RH

A - Introduction

La détermination du phénotype « RhD standard » accompagne toujours celle du groupe sanguin ABO. C'est le résultat de ces deux examens biologiques qui figurent sur la carte de groupe sanguin. La détermination du phénotype « Rh D standard » est uniquement globulaire. On appelle « RhD positif » tout sujet dont les globules rouges possèdent l'antigène qui est mis en évidence par une réaction d'hémagglutination avec l'anticorps spécifique anti-D. Les sujets « RhD négatif » sont ceux dont les globules rouges sont dépourvus de l'antigène . Ils n'ont pas naturellement dans leur sérum l'anticorps anti-D. La présence de cet anticorps est toujours d'origine immune, elle peut être responsable de la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né (MHFN) chez les femmes RhD négatif, et d'accidents transfusionnels parfois graves chez les malades polytransfusés.

B - Les réactifs

1 - Le réactif anti D polyclonal

- a) Ce sont des sérums sélectionnés pour leur titre anti-D élevé. Les deux principales sources sont les femmes immunisées par grossesse et les volontaires Rh D négatif de sexe masculin ayant accepté l'immunisation Rh (n'est plus pratiquée).
- b) Le milieu albumineux

L'anti-D polyclonal est un anticorps incomplet. Il ne peut pas par conséquent provoquer d'hémagglutination spontanée. Pour le rendre hémagglutinant, il faut diminuer le potentiel Zéta du milieu réactionnel et ce par l'addition de macromolécules telles que l'albumine bovine qui augmentent la constante diélectrique du milieu.

$$Z = \frac{C}{D \nu \mu}$$

C = Charge électrique des GR

D = Constante diélectrique du milieu

μ = Force ionique du milieu

En pratique, ce milieu est composé généralement d'un mélange d'albumine bovine et d'albumine humaine (sérum AB) .La dilution des anti-D non hémagglutinants dans ce milieu

les rend hémagglutinants.

Cependant l'inconvénient majeur de ce milieu est qu'il donne avec des hématies sensibilisées par un anticorps (TCD positif) de fausses réactions d'hémagglutination d'où l'intérêt de l'utilisation systématique du témoin albumineux lors du groupage RhD.

2 - Les réactifs anti-D monoclonaux

- Les mélanges d'IgG et d'IgM (Blend)

Le mélange d'anticorps monoclonaux appartenant à la classe des IgG et des IgM permet de combiner à la fois le pouvoir agglutinant fort des molécules IgM qui détecte la plupart des phénotypes D faible et la réactivité des IgG avec l'antiglobuline permettant d'effectuer le test de Coombs indirect.

- Les anti-D monoclonaux de classe IgM (anti-D salin)

Ce sont des anti-D très puissants, capables de reconnaître la plupart des échantillons D faibles mais ne peuvent pas être utilisés pour la détermination des groupes D faibles (Du) par la technique du coombs indirect. Le témoin « Rh control » de ces réactifs, constitué généralement de milieu aqueux, doit être utilisé de façon systématique.

Seul un témoin négatif garantit la détermination du phénotype RhD positif.

C - Techniques

La détermination du groupe RhD est simple, mais exige des conditions techniques précises bien différentes de celles nécessaires pour le groupage ABO. Plusieurs techniques sont utilisées :

1 - Technique sur plaque d'opaline

- GR en suspension à 40 % dans leur propre sérum
- Plaque chauffante (Rhésus-cope)
- Témoin albumineux, Témoin « Rh control » (milieu réactionnel utilisé pour la préparation de l' anti D) : doit être utilisé d'une façon systématique
- Le résultat ne sera rendu que si le témoin « Rh control » est négatif.

2 - Technique en tube

- Plus sensible que la technique sur plaque d'opaline
- Technique
 - GR à tester à 5 % dans leur plasma + 1 goutte d'anti D
 - Incuber 15 mn à 37°C
 - Centrifuger pendant 20 sec. à 1000 t/m

- Lecture.

3 - Technique en gel en présence de broméline

La broméline enzyme protéolytique réduit la charge électrique des hématies et par conséquent le potentiel Zéta du milieu. L'anti-D est incorporé dans le gel et les agglutinats qui se forment lors du passage des hématies seront retenus par le gel.

La sensibilité de cette technique qui associe l'action d'une enzyme protéolytique (la broméline) et la filtration (le gel) est meilleure que celle de la technique de Coombs indirect.

D - Les difficultés

1- Témoin albumineux positif

Une image d'agglutination (ou de formation de rouleaux), décelée au niveau de ce témoin, interdit toute interprétation d'une réaction positive au niveau du test RhD.

- Il peut s'agir d'une agglutination des hématies du malade due à une sensibilisation par un auto-anticorps (anémies hémolytiques acquises avec auto-anticorps chaud) ou un allo-anticorps (MHFN ou incompatibilité transfusionnelle),

- Il peut s'agir d'un phénomène de rouleaux, soit provoqué par certains lots d'albumine bovine accélérant de façon excessive la sédimentation des hématies ; soit provoqué par le plasma du malade lui-même (dysprotéinémie)

a – MHNN (TCD+)

Pour surmonter la difficulté chez le nouveau-né, il existe deux façons de faire :

- Eluer l'anticorps
- utiliser un anti-D salin avec son « Rh contrôle»

b - AHAI

- Pour les Auto-anticorps chaud de type IgG : adopter la même démarche que celle de la MHFN
- Pour les Agglutinines froides :

**Titre faible :

La difficulté est levée en faisant plusieurs lavages des GR avec de l'eau physiologique à 37°C.

Les hématies sont remises en suspension dans du sérum AB et le groupage RhD n'est effectué qu'après avoir vérifié que le témoin albumineux est négatif.

**Titre élevé :

Il faut passer directement à l'épreuve d'éluat.

La technique la plus simple et la plus utilisée est celle qui utilise la chaleur :

- Laver le culot d'hématies
- Ajouter (1 volume) d'eau physiologique
- Incuber 10 mn à 56°C
- Centrifuger et éliminer l'éluat (surnageant)
- Refaire 3 lavages avec l'eau physiologique à 37°C
- Resuspendre les hématies dans le sérum AB et vérifier que le témoin albumineux est négatif si non, il faut refaire une autre éluat.

c- Phénomène de rouleaux :

**Si le phénomène de rouleaux est provoqué par le réactif lui même, il faut changer de réactif.

**Si le phénomène de rouleaux est provoqué par le plasma du malade : Faire 3 lavages des GR avec de l'eau physiologique, remettre les hématies en suspension dans du sérum AB et refaire le groupage. Le groupage RhD n'est validé qu'après avoir vérifié que le témoin albumineux est négatif.

2 – Détermination de l'Ag D faible

a - Introduction

Tous les antigènes de groupe sanguin sont hétérogènes. Par exemple l'antigène A s'exprime par couramment A₁, ou A₂ et rarement par des A faibles. L'antigène RhD , n'échappe pas à cette règle . Il peut arriver que l'on observe des réactions déconcertantes : les globules rouges d'un sujet étant agglutinés par un réactif anti-D et non agglutinés par un autre. C'est le problème du D faible (D^u). Sous cette appellation sont regroupés tous les antigènes RhD faibles.

b - Les difficultés D faibles (D^u)

* Le plus souvent, il s'agit de sujets possédant l'antigène RhD sur leurs globules rouges. Mais cet antigène sera plus au moins bien mis en évidence selon les réactifs utilisés ou les méthodes employées. Cet antigène RhD faible est familial et génétiquement déterminé. C'est le plus courant des RhD faibles.

* Une seconde catégorie plus rare d'antigène RhD d'expression affaiblie est constituée par

les D faibles (D^u) par un effet de position. En effet haplotype r' déprime l'expression du gène Rh (par exemple un sujet R1 r', DCCee) l'antigène RhD produit est affaibli.

* Enfin, certains D faibles sont en réalité des RhD partiels. Ce cas est exceptionnel. L'antigène Rh D est la somme de plusieurs fragments spécifiques Rh. C'est le cas le plus difficile, car les sujets RhD partiel peuvent s'immuniser contre le fragment RhD qu'ils ne possèdent pas, soit par transfusion, soit par grossesse.

c - Les techniques de dépistage des « D » faibles

La détermination d'un groupe D faible pose parfois des problèmes. Certains D faibles apparaîtront comme des RhD négatif sur plaque. Dans ce cas, des techniques de laboratoire plus élaborées doivent être mises en œuvre pour les mettre en évidence.

1 - Techniques utilisant les enzymes protéolytiques / papaïne

- Laver 3 fois les hématies à tester
- A 1 volume de culot globulaire, ajouter 1 volume de la solution de papaïne
- Laisser en contact 7 mn à 37°C
- Laver ensuite 3 fois les hématies ainsi traitées
- Remettre en suspension 5 % dans l'eau physiologique
- Dans un tube à hémolyse mettre 1 goutte d'hématies ainsi préparées, et 1 goutte de réactif anti D – incuber 35 mn à 37°C
- Lire la réaction : lecture macroscopique après étalement sur plaque d'opaline. Utiliser en parallèle les hématies tests O RhD + et O RhD – préparées de la même manière (témoins).
- Le témoin positif doit être un D faible et non un D positif.

2 - Test de Coombs indirect

1^{er} temps : Fixation de l'anti-D (polyclonal, monoclonaux IgM+IgG, ou monoclonal IgG)

Les hématies à tester sont préalablement lavées à l'eau physiologique et servent à préparer une suspension de 3 à 5 % dans une solution NaCl à 9 %.

Dans un tube marqué, mettre une goutte de suspension globulaire et ajouter 2 gouttes de sérum test.

Laisser en contact 45 mn à 37°C si la suspension est faite dans l'eau physiologique ou 15 mn si elle est faite dans une solution à basse force ionique (BFI).

2^{ème} temps : Révélation de la sensibilisation

- Laver 3 fois la suspension des GR
- Au dernier lavage, décanter soigneusement le surnageant, ajouter 1 goutte d'antiglobuline polyvalente ou anti IgG
- Centrifuger (environ 30 '' à 1200 t / mn)
- Lire macroscopiquement après agitation douce et microscopiquement si la réaction est négative
- Valider la réaction par un témoin positif et négatif
- Le témoin positif doit être un D faible et non un D positif.
- Pour tout échantillon trouvé D+ faible « D », le résultat doit être validé par un TCD négatif.

3 - Epreuve de fixation élution

C'est la technique la plus sensible et reste la technique de référence (voir plus loin).

GROUPAGE ET PHENOTYPAGE MANUEL SUR MICROPLAQUE

EQUIPEMENTS - MATERIELS - REACTIFS

- Micropipettes
- Microplaque à fond en U
- Etuves
- Centrifugeuse
- Agitateur Titertek
- Anti-A
- Anti-B
- Anti-AB
- Anti-D
- Anti-C
- Anti-c
- Anti-E
- Anti-e
- Anti-K
- Témoin réactif (sérum AB dilué au 1/7^{ème})
- Solution de travail broméline / BFI (0,5 mL broméline + 9,5 mL BFI) (1/20^o)

DESCRIPTION

Epreuve globulaire

- Dans une microplaque à fond en U, répartir dans les puits de la colonne N°1, 250 µL de la solution de travail broméline BFI
- Ajouter dans les puits de la colonne N°1 7 µL d'hématies à phénotyper sans lavage préalable
- Incuber pendant 10 mn à 37°C dans l'étuve
- Répartir les sérums tests dilués anti A, anti B, anti AB, anti D, anti C, anti c, anti E, anti e, et anti
respectivement dans les colonnes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 à raison de 25 µL par puits
- Ajouter dans chacun des puits de 2 à 10, 25 µL des hématies prélevées à partir de la colonne 1.
- La colonne 1 sera réservée au témoin réactif sérum AB/7 (25 µL)

Epreuve sérique

- Mettre 25 µL de sérum de l'échantillon dans les colonnes 11 et 12 et ajouter respectivement 25 µL d'hématies tests A et B
- Agiter au Titertek
- Incuber 10 mn à 37°C dans l'étuve
- Centrifuger à 1000t/mn pendant 1 mn
- Agiter au Titertek
- Lire immédiatement les agglutinations.

PHENOTYPAGE DES PATIENTS A TCD POSITIF

A/ Technique de Blocage par l'AGH

Dans les situations où le témoin réactif est positif (cas des AHAI par exemple), il est impossible de déduire le phénotype. La détermination du phénotype nécessite alors un blocage des sites Ig par l'antiglobuline humaine dont le protocole opératoire est le suivant :

- Dans un tube à hémolyse placer une goutte du culot de GR à TCD (+)
- Laver 4 fois à l'eau physiologique
- Eliminer la dernière eau de lavage
- Ajouter 15 à 20 gouttes d'antiglobuline anti-IgG, mélanger
- Incuber à température ambiante pendant 10 mn
(le temps d'incubation est prolongés si le TCD est + > 2 +)
- Après incubation, laver 2 fois à l'eau physiologique
- Eliminer la dernière eau de lavage
- A partir du culot, refaire le TCD (en tube ou en gel) ??. Si celui-ci reste positif, refaire la procédure jusqu'à négativation
- Si le TCD devient négatif, procéder au phénotypage.

B/ Technique utilisant le réactif ZZAP

Il s'agit d'un mélange de DTT à 0.1 M et de papaïne (0.1% cystéine activated papaïne). Il permet de dissocier les immunoglobulines des la surface des hématies (il négative les TCD+)

Mode opératoire :

- A 2 volumes d'hématies à 3 % lavés avec de l'eau physiologique sont ajoutés 2 volumes de ZZAP
- Incuber 30 mn (à 37°C ou 0° ambiante ??) et laver trois fois et resuspendre les hématies dans l'eau physiologique ou dans la BFI
- A partir du culot, refaire le TCD. Si celui-ci reste positif, refaire la procédure jusqu'à négativation
- Si le TCD devient négatif, procéder au phénotypage.

PHENOTYPAGE ELARGI SUR GEL TEST

Indications

Bilan pré greffe de la M.O Donneur de panel, malade immunisé dans un système autre que Rh-Kell.

Systèmes à étudier

Kell - Duffy - Kidd - Lewis - Luth - MNS

Matériels et réactifs

- Carte Diamed ID Liss/Coombs
- Diluant D2 (BFI)
- Tubes à hémolyse
- Micropipettes
- Centrifugeuse ID-Incubateur ID
- Échantillon à tester
- Antisérums

Mode Opérateur

- Réaliser une suspension à 0,8 % dans le BFI de l'échantillon à tester : 1 ml BFI + 10 µl GR
- Identifier les micro-tubes appropriés par le N° de l'échantillon – Faire passer avec chaque paramètre un contrôle positif et un contrôle négatif
- Répartir 50 µl de la suspension dans chaque tube de gel
- Distribuer 25 µl d'antisérums correspondant
- Incuber 15' à 37°C
- Centrifuger dans la centrifugeuse ID
- Lire et noter les réactions

Interprétation

Réaction positive : GR agglutinés forment une ligne rouge à la surface du gel ou dispersés dans le gel (+ à + + + +)

Réaction Négative : GR en culot compact au fond du micro tube (-).

- Validation de la réaction par un témoin positif hétérozygote et un témoin négatif.

LES ANTICORPS NATURELS ET IMMUNS DU SYSTEME ABO

A) Rappel = Propriété des anti A et des anti B naturels et immuns

B) Titrage des anti A et des anti B

C) Détermination différentielle du titre des IgG et des IgM

D) Dépistage et titrage des anti A et des anti B immuns

1) Réaction d'hémolyse

2) Titrage en milieu albumineux

LES ANTICORPS NATURELS ET IMMUNS DU SYSTEME ABO

A - Rappel = Propriétés Sérologiques des anti ABO naturels et immuns

Anticorps naturels	Anticorps immuns
<ul style="list-style-type: none"> - Réguliers - Spontanément agglutinants - Activité non augmentée en milieu sérique - Non hémolysants - Optimum thermique à + 4° mais ils conservent une activité à 37°C - Neutralisables par les substances solubles A.B.H - Mélange IgM + IgG 	<ul style="list-style-type: none"> - Irréguliers - Non agglutinants en milieu salin - Activité augmentée en milieu sérique - Hémolysants à 37°C - Optimum thermique à 37°C - Difficilement neutralisables par les substances solubles - Principalement des IgG + + + - Ils résistent à la chaleur 1H à 63°C, 10mn à 70°C

B -Titrage des anticorps naturels anti A et anti B

Ces titrages font appel à la réaction d'agglutination quantitative.

** Dans 10 tubes à hémolyse, procéder à des dilutions géométriques de 2 en 2 des sérums à tester, après avoir mis 3 gouttes de sérum physiologique dans les tubes : 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

Tube 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	3 gttes d'Eφ	3 gttes d'Eφ	3 gttes d'Eφ	3 gttes d'Eφ	3 gttes d'Eφ	3 gttes d'Eφ	3 gttes d'Eφ	3 gttes d'Eφ	3 gttes d'Eφ
3 gttes de sérum	3 gttes de sérum	3 gttes de la dilution	→	→	→	→	→	→	→
Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512

**Puis dans chaque tube, ajouter 3 gouttes de globules rouges tests A ou B (selon l'anticorps à titrer) en suspension à 5 % dans l'eau physiologique .

** Laisser 15 minutes à la température ambiante et centrifuger à 1500 ts / mn pendant 20 sec.

** Lecture par légère agitation. Le titre correspond à la dernière dilution du sérum donnant une réaction d'agglutination.

Exemple :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Titration anti-A	+++	+++	++	++	+	+	(+)	-	-	-	anti-A au 1/64
Titration anti-B	+++	++	+	+	(+)	-	-	-	-	-	anti-B au 1/16

** Le nombre de croix est attribué selon l'intensité de l'agglutination appréciée à l'œil nu et notée suivant les conventions du tableau N° I.

**Le titre d'un Ac peut être exprimé en score c'est à dire l'octroi de points attribués à chacun des tubes de la série en fonction de l'intensité de l'agglutination.

+++ : 10

++ : 8

+ : 5

(+) : 2

- : 0

Cette notation est utilisée dans les expertises des sérums tests . Elle permet de déterminer le score d'agglutination d'un anti- sérum. Le score correspond à l'addition des points attribués à chaque dilution (tube)

+++	Agglutination non dissociée par le décollement du culot ou se dissociant en 3 fragments au plus
++	Fragmentation du culot en de nombreux amas relativement volumineux (4 à 10 amas)
+	Fragmentation du culot en de très nombreux agglutinats de petite taille
(+)	Fragmentation du culot en agglutinats innombrables de très petite taille à la limite de la visibilité. Entre les agglutinats le fond est clair : Il n'y a pas d'hématies libres
-	Lors de l'agitation, le culot se désagrège en fumerole sans se fragmenter : le contenu du tube prend une teinte rosée homogène.

Tableau N° I

C - Anticorps Naturels ABO = Détermination différentielle du titre des IgG et des IgM

Indication

- Bilan pré-greffe de moelle ABO incompatible
- Surveillance d'une greffe d'organe ABO incompatible
- Incompatibilité foetomaternelle ABO

Technique

- Traiter une partie du sérum au DTT
- Faire des dilutions dans le sérum AB du sérum traité et non traité jusqu'au 1/256
- Sur chaque dilution faire une épreuve de Simonin en tube :
 - Deux gouttes de sérum + Une goutte de GR A1 ou B en suspension à 3% dans E φ
- Sur la dernière dilution donnant une réaction + et les suivantes faire :
 - Un TC polyvalent avec le sérum non traité et le sérum traité
 Centrifuger 20 sec. à 1000 t/mn

Déterminer le titre

- Des Anti ABO totaux
- Des anti ABO de type IgG

Exemple : anti – ABO totaux :1/32 anti- ABO de type TgG =1/4

	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Sérum non traité	+	+	+						
TC poly.			+	+	+	+			
Sérum traité	+								
TC Polyv.	+	+	+						

D - Dépistage des anti A et anti B Immuns

Les anti-A et anti-B immuns peuvent résulter d'une hétéro-stimulation ou d'une allo-immunisation (Grossesse , transfusion de plaquettes) . Il sont mis en évidence par plusieurs techniques :

1 - Par la réaction d'hémolyse : recherche d'hémolysines

- Utiliser du sérum AB frais comme source de complément
 - Préparer une suspension à 10 % des GRA₁, et B
 - Décomplémenter le sérum du malade à 56°C pendant 30 mn
 - Disposer sur un portoir 6 tubes à hémolyse
 - Tube N°1 : Recherche d'hémolysines anti A
 - Tube N°2 : Recherche d'hémolysines anti B
 - Tube N°3 : Témoin GR A
 - Tube N°4 : Témoin GR B
 - Tube N°5 : Témoin sérum
 - Tube N°6 : Témoin sérum AB
- Tous les témoins ne doivent pas présenter d'hémolyse

Tube N°	1	2	3	4	5	6
Sérum à tester en gouttes	2	2			2	
Sérum AB frais en gouttes	2	2				2
NaCl 9 ‰ en gouttes			4	4	2	2
GR A en suspension à 10 %	1		1		1	1
GR B en suspension à 10 %		1		1		

- Incuber à 37°C pendant 30 mn
- Centrifuger à 1000 tours / mn pendant 1mn.

Interprétation

- Une hémolyse dans le tube N°1 indique la présence d'hémolysine anti A
- Une hémolyse dans le tube N°2 indique la présence d'hémolysine anti B

2 – Par titrage différentiel en milieu albumineux

A coté de leur pouvoir hémolysant, on peut mettre en évidence ces anticorps immuns par un dosage différentiel =

- Dosage en milieu albumineux à 37°C (Ac naturels + Ac immuns)
- Dosage en milieu salin à 22°C (Ac naturels)

**** Titrage en milieu albumineux :** (Ex : Albumine humaine)

- Faire une cascade de dilution du sérum à tester dans l'albumine humaine (Sérum AB).
- Préparer une suspension de GR à 3 % dans l'albumine humaine
- Ajouter à chaque dilution de sérum un volume égal de la suspension de GR (3 gouttes)
- Incuber 30 mn à 37°C
- Centrifuger pendant 20 sec. à 1000 t / mn

****Titrage en milieu salin** (voir titrage des Ac naturels anti A et anti B)

**** Comparer les deux titres**

Une différence significative traduit l'existence des anti corps immuns.

RECHERCHE DE SUBSTANCE ABH ET LEWIS DANS LA SALIVE

A - Rappel

Dans la salive, peuvent être, présentes les substances A B H, Lewis a et Lewis b selon le génotype de la personne.

Ce sont des substances hydrosolubles dont l'activité sérologique est identique à celle des antigènes érythrocytaires et qui sont capables de neutraliser les anticorps correspondants.

Un sujet est dit sécréteur lorsqu'il possède dans sa salive une ou plusieurs de ces substances.

Il est dénommé :

- Se lorsqu'il sécrète une substance A, B, H
- se lorsqu'il n'en possède pas
- Le lorsqu'il sécrète une substance Lewis a ou Lewis b
- le lorsqu'il n'en possède pas.

Substances Sécrétées dans la Salive			Sujets		Fréquences
Le ^a	Le ^b	ABH	Se	Le	
+	+	+	Se	Le	70 %
+	-	-	se	Le	20 %
-	-	+	Se	le	9 %
-	-	-	se	le	1 %

B - Matériel

- 2 à 5 ml de salive fraîchement prélevé dans un tube à essai
- Sérum tests anti A, anti B , anti H convenablement dilués
- Hématies tests A, B et O.

C - Méthode

1 - Inhibition des enzymes salivaires

- Mettre la salive au bain marie à 56°C pendant 30 mn afin d'inhiber les enzymes capables de détruire les substances de groupe
- Centrifuger à 3000 t / mn pendant 5 mn et recueillir le surnageant

2 - Réalisation du Test : Test de consommation

** Dilution de la salive

Dans 10 tubes préparer une série de dilutions en soluté salé-isotonique (eau physiologique).

Ces dilutions correspondent à des quantités décroissantes de l'éventuelle substance de groupe recherchée et vont servir à « neutraliser » une quantité d'anticorps spécifiques (anti A, anti B ou anti H).

** Détermination de la dose optimale du sérum test à utiliser

La dose de sérum test utilisée dans cette réaction de neutralisation doit être faible afin de rendre la réaction très sensible. Pour ajuster cette dose :

- Pratiquer une série de dilution de sérum test spécifique de la substance qu'on désire rechercher
- Porter sur une plaque d'opaline une goutte de chaque dilution du sérum test et ajouter une goutte de suspension à 5 % des GR correspondants
- Mélanger, laisser en contact, puis effectuer la lecture de l'agglutination

La dilution de sérum test qu'il convient d'utiliser dans la réaction de neutralisation doit correspondre à une dilution 4 fois moindre que la plus forte dilution donnant encore une agglutination (ex. si l'anticorps titre 1/32, prendre le sérum test dilué au 1/8).

** Epreuve de neutralisation proprement dite

- Dans 10 tubes à hémolyse, répartir 2 gouttes de chaque dilution de la salive
- Ajouter à chaque tube 2 gouttes du sérum test dilué
- Mélanger laisser 10 mn en contact à la T° ambiante. Pendant ce temps il y a consommation de sérum test par les éventuels antigènes salivaires correspondants.
Ensuite ajouter dans chaque tube, 2 gouttes d'hématies tests correspondantes au sérum test mis au départ
- Laisser 30 mn à la T° ambiante
- Centrifuger 1500 t / mn pendant 20 sec. et lecture par agitation modérée.

- Interprétation

Il y a agglutination des hématies tests par le mélange sérums tests / salive dans tous les tubes = l'anti- sérum test n'a pas été neutralisé par la salive = pas d'antigène salivaire → sujet non sécréteur.

Il n'y a pas d'agglutination des hématies tests par le mélange sérum test / salive → le sérum test a été neutralisé par la salive → présence d'Ag salivaire → sujet sécréteur.

Le titre des substances dans la salive peut également être établi par dilution de la salive.

NB : Réaliser en même temps, en parallèle, un témoin négatif (remplacer la salive par l'eau physiologique)

Au niveau du témoin négatif, une agglutination des hématies tests doit être observée.

D - Intérêt de la Recherche de Substance de Groupe dans la Salive

1 - Système ABO

Cette recherche est utile pour confirmer certains phénotypes érythrocytaires (Am, Ay, Ael).

Les Ag qui sont peu ou pas développés sur les hématies sont abondants dans la salive des sujets sécréteurs.

2 - Systèmes Lewis

En transfusion : la sélection de poche de sang pour un receveur présentant un anti Le^a ne pose pas de problème même si le donneur est A ou B. Mais la sélection de sang réellement Le (a-b-), c'est à dire n'ayant pas le gène Le peut par contre être difficile, car les sérums anti Le^{bL} ne sont pas toujours disponibles. Les anti Le^{bL} sont des Ac très puissants capables de reconnaître la substance lewis même chez un sujet A1).

La solution devant ce genre de situation est de vérifier l'absence de l'antigène Lewis par le groupage salivaire.

3 - Transplantation rénale

Le système Lewis est un système d'histocompatibilité et le phénotypage Lewis avant greffe est important à connaître. La technique la plus sûre est le typage salivaire.

EPREUVE DE FIXATION ELUTION

A) Introduction

B) Technique

a. - Fixation in vitro

- Ex1 : Détermination des groupes A faibles
- Ex2 : Recherche de l'antigène D faible

b. - Elution directe

- Ex : M.H.N.N

EPREUVE DE FIXATION ELUTION

A) Introduction

- La fixation d'un anticorps sur l'hématie est une réaction exothermique dans la quelle la quantité d'anticorps fixée est plus grande à basse température qu'à température élevée Ex. les anti - A et anti - B naturels se fixent plus à 4°C qu'à 37°C.D .
- la fixation d'un Ac est réversible on peut décrocher l'anticorps fixé à la surface du GR : c'est l'éluion.

L'éluion peut faire appel à des procédés divers (chauffage à 56°C, éther, baisse du PH, éthanol,...), elle permet de recueillir l'anticorps décroché de la surface du GR dans un milieu liquide et d'étudier sa réactivité vis à vis des GR du malade et d'un panel érythrocytaire en faisant intervenir les méthodes classiques de recherche d'agglutinines.

B – Technique

On réalise soit :

1 - La fixation éluion in vitro

Elle est réalisée lors de la confirmation d'un groupe faible (A faible, B faible, D faible...) où l'antigénicité ne s'est pas exprimée lors d'un groupage sur plaque. On utilise alors la technique d'éluion indirecte : Fixation Elution, la fixation se fait in vitro.

Exemple 1 : Fixation Elution pour la détermination des groupes A faibles (A end, Am, A el...) ou B faible (B end, Bm, B el)

- Laver 4 fois les hématies à tester
- 1 volume de culot globulaire lavé (8 gouttes minimum) + 2 volumes d'anti A ou d'anti B (16 gouttes)
- Porter 2 heures à + 4°C → Fixation
- Faire 6 lavages afin d'éliminer l'excédent d'anticorps non fixé garder la dernière eau de lavage. Tester l'eau de lavage pour s'assurer que les six lavages étaient suffisants pour éliminer toute trace du sérum initial
- Sur le culot lavé, ajouter ½ volume d'eau physiologique (4 gouttes)
- Porter au bain-marie à 56°C pendant 15 mn → Elution

- Centrifuger aussitôt à 3000 ts /mn pendant 5 minutes
- Recueillir aussitôt le surnageant (Eluat) que l'on testera vis à vis hématies A1, BetO (papainés)

mises en suspension à 5 % dans l'eau physiologique , selon l' anticorps utilisé

- * Dans un tube 2 gouttes d'éluat + 2 gouttes de globules rouge test
- * 1 heure à + 4°C ou + 22°C
- * Centrifuger à 1500 ts/mn pendant 20 secondes lecture par agitation modérée

Exemple 2 - Fixation Elution pour la recherche du D faible

Elle doit être systématique chez les sujets Rh négatif sur plaque (groupe ABO Rhésus) et positif avec l'anti CDE. Ces sujets possèdent soit l'antigène C, soit l'antigène E, qui est souvent en déséquilibre de liaison avec l'antigène D.

- Laver 4 fois les hématies à tester, des hématies O pos. (qui serviront de témoin positif) et des hématies O nég. (qui serviront de témoin négatif).
- 1 volume de culot globulaire lavé (10 gouttes minimum) + 1 volume d'anti-D (10 gouttes) et porter 2 heures à 37°C = Fixation
ou 0,5 volume d'anti-D (5 gouttes) et porter 18 heures à 4°C.
- Laver 6 fois afin d'éliminer l'excédent d'anticorps non fixé. La 6^{ème} eau de lavage est testée vis à vis de GR O + et O – papainés en suspension à 5 % en eau φ
- Sur le culot lavé ajouter ½ volume d'eau (5 gouttes)
- Porter au bain marie à 56°C pendant 15 mn → Elution
- Centrifuger aussitôt à 3000 ts/mn pendant 5 mn
- Recueillir aussitôt le surnageant (Eluat) qu'on testera vis à vis d'hématies papainées O pos. et O Nég. en suspension à 5 % dans l'eau physiologique.

Exemple

Eluat	Sujet N°1	Sujet N°2	Sujet O Rh D faible = T +	Sujet O - = T -
GR papainés O +	++	-	++	-
GR papainés O -	-	-	-	-
	Sujet D faible	Sujet D négatif		

2 - L'élution Directe

Elle est réalisée lorsqu'un test de Coombs direct s'avère positif (nouveau-né, malade atteint d'anémie hémolytique auto-immune). On parle d'épreuve d'élution directe = élution simplement. La fixation ayant eu lieu *in vivo*

Exemples d'application : (M.H.N.N et A.H.A.I)

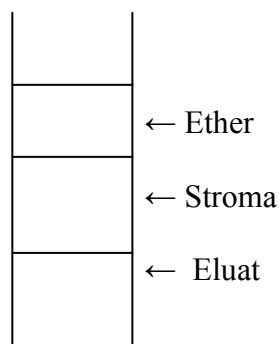
- laver 6 fois les hématies à tester afin de les débarrasser totalement du sérum.

** Elution par la chaleur

- 1 volume du culot globulaire lavé (20 gouttes minimum) + 1 volume d'eau physiologique (20 gouttes)
- Porter 15 minutes à 56°C = Elution
- Centrifuger aussitôt à 3000 ts/mn pendant 5 mn
- Recueillir aussitôt le surnageant (éluat) que l'on testera vis à vis d'un panel d'hématies afin d'identifier l'anticorps fixé.

** Elution par l'éther

- 1 volume du culot globulaire lavé
- 1 volume de sérum AB
- 2 volumes d'éther
- Agiter fortement 3 à 4 mn
- Centrifuger à forte vitesse
- Récupérer l'éluat qui est fortement laqué



- L'éluat est testé vis à vis d'un panel d'hématies afin d'identifier l'Ac fixé sur les globules rouges.

LES ANTICORPS IMMUNS ET LES METHODES D'HEMAGGLUTINATION ARTIFICIELLE

I – Les Paramètres de l'hémagglutination artificielle

II - Les Anticorps non hémagglutinants et la réaction d'hémagglutination

III – Les Enzymes protéolytiques

1 - Mécanisme d'action

2 - La papaine

2 -1- Préparation de la Papaine (méthode de Low)

2 -2 - Papaïnation des GR

3 - La trypsine

3 -1- Préparation de la Trypsine

3 -2 -Trypsination des GR

4- Les applications

4 -1- Recherche d'anticorps

- Technique à la papaine

- Technique en Coombs indirecte Trypsine

4 -2- Epreuve de compatibilité en papaine

IV – Les Réactions de Coombs

1 - La réaction de coombs direct

2 - La réaction de coombs indirect

3 - Les réactifs

4 - Les difficultés

5 - Quelle antiglobuline nous devons utiliser

6 - La technique de coombs direct

7 - La technique de coombs indirect

8 - La technique de coombs indirect à basse force ionique (BFI)

V – Le Gel Test

VI – L'Immuno- adhérence : Test de Coombs en Phase Solide

VII – Epreuve de Compatibilité

LES ANTICORPS IMMUNS ET LES METHODES D'HEMAGGLUTINATION ARTIFICIELLE

I - Les Paramètres de l'hémagglutination artificielle

Les GR sont chargés négativement. L'origine de cette charge est liée principalement à la présence à la surface de l'hématie des groupements carboxyliques des acides sialiques attachés à des glycoprotéines de la membrane.

Toutes les hématies étant porteuses de la même charge négative. En suspension saline il se crée une forte répulsion interglobulaire. Cependant en présence d'électrolytes, chaque GR est entouré d'un nuage d'ions positifs dont l'intensité diminue lorsque la distance à l'érythrocyte augmente. Il se forme donc une double couche composée par les charges superficielles de l'érythrocyte et le nuage de cations.

La force de répulsion interglobulaire dépend alors du potentiel qui existe au plan de cisaillement ainsi défini, c'est le potentiel Zéta du système.

$$Z = \frac{C}{D \sqrt{\mu}}$$

C = Charge électrique

D = Constante diélectrique du milieu

μ = Force ionique du milieu

BRAMSON a montré que : Pour des valeurs élevées de potentiel Zéta (en valeur absolue) les cellules ne s'agglutinent pas même en présence d'anticorps spécifiques.

Cependant si l'on diminue lentement le potentiel Zéta du système (en valeur absolue). On constate que l'agglutination apparaît.

Les facteurs qui sont capables de modifier principalement le potentiel Zéta sont : la charge électrique du GR et la constante diélectrique de milieu.

A - Réduction de la charge électrique

On range dans cette catégorie les effets dus à la fixation des Ac ou le traitement des hématies par les enzymes protéolytiques.

B - Variation de la composition du milieu réactionnel

Les substances macromoléculaires utilisées telle que l'albumine, le PVP, le Dextran et le Ficoll se polarisent dans le champ électrique des GR et diminuent la force de répulsion interglobulaire. L'effet de ces molécules est donc d'augmenter la constante diélectrique du milieu et de diminuer le potentiel Zéta.

Par ailleurs, il est important de mentionner que la force ionique (μ) intervient beaucoup plus sur la cinétique de la réaction antigène anticorps que sur la réaction d'hémagglutination. L'augmentation de la force ionique du milieu diminue la cinétique de la réaction antigène/anticorps alors que la diminution de μ augmente l'affinité de l'Ac vis à vis de son Ag.

C - Le test à l'antiglobuline

Lorsqu'un Ac spécifique de type IgG se fixe sur l'Ag correspondant, il n'engendre pas dans la grande majorité des cas de réaction d'hémagglutination cependant il est possible de révéler sa présence si l'on ajoute au milieu une antiglobuline. Cette agglutination apparaît également si des fractions du complément sont présentées à la surface du GR. L'antiglobuline joue le rôle de ciment entre les GR sensibilisés par des IgG ou des fractions du complément.

II - Les Anticorps non hémagglutinants et la réaction d'hémagglutination

Les anticorps non hémagglutinants ont la propriété de se fixer sur les hématies, mais sont incapables de les agglutiner. Leur détection repose sur l'utilisation d'artifices techniques dont les plus répandus sont :

- Le traitement des hématies par les enzymes protéolytiques = papaine, trypsine, broméline
- L'addition au milieu réactionnel de substance macro-moléculaire = albumine, PVP, Dextran
- Le test à l'antiglobuline ou réaction de coombs

En immuno-hématologie, ces méthodes apparaissent essentielles pour :

- c. La recherche et l'identification des allo-Ac chez les malades polytransfusés et les femmes multipares
- d. Le diagnostic des anémies hémolytiques immunologiques (auto-immunes et MHNN).

III – Les Enzymes Protéolytiques

1 - Mécanisme d'action

Les enzymes décapitent la surface de l'hématie en libérant des fragments polypeptidiques qui appartiennent aux glycoprotéines et qui sont riches en Ac sialique.

Les hématies ainsi traitées peuvent être agglutinées par les Ac IgG réputés non agglutinants (Ex : IgG anti D)

Cette propriété n'est pas liée à un démasquage de nouveaux déterminants antigéniques mais à la diminution de la charge électrique superficielle de l'hématies.

2 - Papaine

2 - 1 - Préparation de la papaine (méthode de Low)

- a - Préparer 800 ml de tampon-phosphate PH5,4
 - Préparer 800 ml de solution de KH_2PO_4 M/15
 - Préparer 40 ml de solution de Na_2HPO_4 (12H₂O) M/15
 - Préparer la solution de tampon en mélangeant 768 ml de KH_2PO_4 + 32 ml de Na_2HPO_4
- b - Dissoudre 16 g de papaine dans 400 ml de tampon (240 µ/ml)
- c - Laisser la solution de papaine pendant 30 mn sur agitateur magnétique
 - filtrer
- d - Dissoudre 3,14 g de chlorhydrate de cystéine (L +) dans 40 ml de Na OH 0,5 M
- e - Mélanger
 - 400 ml de solution de papaine filtrée
 - 40 ml de la solution de chlorhydrate de cystéine
 - 360 ml de tampon phosphate

f - Mettre 1 h à 37°C

g - Répartir en tube à hémolyse à raison de 2 ml et congeler à -20°C

2 - 2 - Papaination des GR

- 1 Volume de culot globulaire lavé 3 fois + 1 volume de solution de papaine
- 7 mn à 37°C
- Laver 3 fois
- Remettre en suspension à 3 % en eau physiologique
- Les globules rouges traités à la papaine se conservent 48 H .

3 - La Trypsine

3 - 1 - Préparation de la trypsine

- Dissoudre 0,2 g de trypsine dans 200 ml d'Eau distillée
- Laisser dissoudre pendant 1 h sur agitateur magnétique
- Ajouter
 - * 40 ml de Na₂HPO₄ anhydre (9,46 g/l d'Eau distillée)
 - * 10 ml de KH₂PO₄ anhydre (9,066 g/l d'Eau distillée)
 - * Ajuster le PH à 7,3
 - * Aliquoter et congeler à - 20°C

3 - 2 - Trypsination des globules rouges

- 2 Volumes de culot globulaire lavé 3 fois + 3 volumes de solution de trypsine
- 20 mn à 37°C
- Laver 3 fois
- Remettre en suspension à 3 % en Eau physiologique

4 - Les Applications

4 - 1 - Recherche d'anticorps

**** Technique à la papaine**

- Dans un tube à hémolyse, mettre 2 gouttes de sérum à tester + 2 gouttes d'hématies du panel papainées
- Incuber 35 mn à 37°C
- Avec une pipette pasteur transférer sur plaque d'opaline et lire directement la présence ou l'absence d'agglutination

**** Technique en Coombs indirect trypsine**

- Dans un tube à hémolyse, mettre 2 gouttes de sérum à tester + 1 goutte d'hématie trypsinée à 3 % en E φ
- Incuber pendant 45 mn à 37°C
- Laver 3 fois
- Bien égoutter après le 3^{ème} lavage et ajouter 1 goutte d'antiglobuline polyvalente
- Centrifugation 20 sec à 1500 trs /mn et lecture

2 - Epreuve de Compatibilité en Papaine (voir épreuve de compatibilité)

IV - Les Réactions de Coombs

C'est une méthode d'agglutination artificielle. Le plus souvent les anticorps irréguliers sont non agglutinants . Ils se fixent à la surface des globules rouges possédant l'antigène correspondant à leur spécificité, sans que cette fixation ne soit suivie d'agglutination. On dit que les globules rouges ainsi recouverts d'anticorps mais non agglutinés, sont « sensibilisés ».

Le test de coombs (Tc) est l'une des méthodes qui nous permet de mettre en évidence les hématies sensibilisées.

L'agglutination fait appel à un réactif particulier = antiglobuline humaine.

Deux tests de coombs sont distingués = TC direct et TC indirect.

1 – Le test de Coombs direct

Il met en évidence les anticorps fixés sur les globules rouges « in vivo ». Il est utilisée pour :

- Démontrer la sensibilisation des globules rouges du nouveau né au cours de la M.H.N.N
- Mettre en évidence la sensibilisation par des auto-anticorps ou du complément, des globules rouges des malades atteints d'A.H.A.I
- Dépister les accidents hémolytiques dus à l'usage de certains médicaments où les globules rouges sont également sensibilisés (pénicilline, rifamicine)
- Dans les cas d'accidents transfusionnels pour démontrer la fixation sur les globules rouges du donneur, en circulation chez le malade, d'allo-anticorps spécifiques présents dans le sérum du malade.

2 – Le test de Coombs Indirect

Il met en évidence la présence d'anticorps dans un sérum en mettant ce dernier en contact « in

vitro » avec les globules rouges test (Panel).

Il est donc utilisée pour :

- La recherche des anticorps irréguliers dans le sérum des femmes enceintes ou des malades transfusés
- Les épreuves de compatibilité entre le sérum du receveur et les globules rouges du donneur, qui est en fait une recherche d'anticorps anti-érythrocytes personnalisée
- La détermination de certains groupes sanguins (Kell, Duffy, etc...) utilisant des réactifs non agglutinants.

3 -Réactifs

Les antiglobulines (sérum de coombs) sont obtenus par immunisation d'animaux, en particulier le lapin et la chèvre. On trouve actuellement sur le marché les antiglobulines d'origine monoclonale. Ils doivent être de type agglutinant (et non seulement précipitant comme pour une immunoélectrophorèse), c'est à dire que les réactifs doivent être capables d'agglutiner les globules rouges, sensibilisés par des anticorps et lavés en milieu salin.

Les antiglobulines polyvalentes décèlent la fixation sur les globules rouges, d'immunoglobulines de type IgG et / ou des fractions C3d du complément .Ce sont les antiglobulines le plus fréquemment utilisées en routine.

A coté des antiglobulines polyvalentes, des antiglobulines spécifiques sont disponibles : les plus utilisées en immuno-hématologie sont les anti IgG, anti C3d.

Ces réactifs spécifiques rares, comme l'anti – IgA , ne sont pas d'usage courant.

4 - Les difficultés

Apparemment simple à réaliser, la réaction de Coombs nécessite d'être effectuée avec grand soin.

C'est en effet une réaction très précise dans laquelle chacun des éléments compte :

- Concentration globulaire
- Lavage des globules rouges
- Propreté de la verrerie
- Qualité de l'antiglobuline
- Précision de la technique
- Concentration correcte du réactif

Si l'un ou l'autre de ces éléments est défectueux, la réaction de Coombs peut :

- Soit présenter des difficultés de lecture (mauvaise concentration globulaire, technique non appropriée à l'antiglobuline utilisée) qui rendent l'interprétation du résultat

discutable

- Soit donner des résultats erronés , on peut avoir des réactions faussement négatives liées à l'inhibition de l'antiglobuline due à l'utilisation :
 - ° d'une verrerie qui ne serait pas rigoureusement débarrassée de toutes traces de protéines
 - ° de globules rouges qui ne seraient pas rigoureusement lavés. En effet des traces de protéines encore présentes dans le milieu, peuvent négativer la réaction entre l'antiglobuline et les globules rouges sensibilisés, en absorbant l'antiglobuline.

5 Quelles antiglobulines devons nous utiliser ?

Pour tous les examens de routine (test de compatibilité, recherche d'Ac, phénotypage, érythrocytaire) on utilise une anti-globuline polyvalente. Elle permet de déceler les sensibilisations de type IgG et celles de type complément.

Les antiglobulines spécifiques (anti IgG et anti C3d) sont utilisées pour l'étude précise des AH auto-immunes, chaque fois que la réaction de coombs direct est positive avec l'antiglobuline polyvalente.

L'antiglobuline anti IgG peut aussi être utilisée, pour la mise en évidence d'un certain type d'allo-Ac difficiles (anti Duffy et anti Kidd)

6 - La Technique de Coombs Direct

- Laver 3 fois les GR à tester
 - A la dernière centrifugation décanter soigneusement le surnageant
 - Préparer une suspension globulaire en eau physiologique stérile à 3 %
 - Mettre dans un tube à hémolyse :
 - o 1 goutte de globule rouge à 3 % en milieu salin
 - o 1 goutte d'antiglobuline polyvalente
 - o Mélanger doucement
 - o Centrifuger 20 sec. à 1500 tours minute
 - o Lecture après agitation douce
- Si c'est négatif : lecture microscopique après étalement sur lame
- Les témoins du TCD :
 - Témoin positif : GR O Rh (+) sensibilisés par un anticorps non agglutinant Rh (D).

Ce témoin doit être positif. Il valide l'activité anti IgG de l'antiglobuline

- Un témoin salin : 1 goutte hématies + 1 goutte d'E ϕ à la place de l'antiglobuline
- Témoin AB : 1 goutte d'hématie + 1 goutte de sérum AB.

Les témoins salins et AB doivent être négatifs

Résultat

- La réaction à l'antiglobuline polyvalente est négative et les témoins sont négatifs : absence d'anticorps fixés sur les hématies
- La réaction à l'antiglobuline polyvalente est positive et les témoins AB et salin sont négatifs :
Présence d'anticorps ou du complément sur les hématies.

Il est alors parfois utile de refaire un test de coombs avec des antiglobulines spécifiques anti IgG et anti-complément, afin de déterminer la nature de l'anticorps ou le type de l'anémie hémolytique auto-immune.

7 - Techniques de Coombs Indirect

- Dans un tube à hémolyse, mettre 2 gouttes de sérum à tester + 1 goutte d'hématie du panel en suspension à 3 % en eau physiologique
- Incuber à 37°C pendant 45 mn
- Laver 3 fois
- Bien égoutter après le 3^{ème} lavage et ajouter 1 goutte d'antiglobuline polyvalente
- Centrifuger à 1500 t/mn pendant 20 sec. et lecture par agitation modérée

8 - Technique en Coombs indirect à basse force ionique

- 2 gouttes de sérum par tube
- 1 goutte d'hématie du panel en suspension dans une solution à basse force ionique (BFI)
- 15 mn à 37°C
- Faire 3 lavages avec l'eau physiologique
- Bien égoutter après le 3^{ème} lavage et ajouter une goutte d'antiglobuline polyvalente
- Centrifugation pendant 20 sec. à 1500 t/mn et lecture par agitation modérée.

VI - Le Gel Test

Le gel test a été initialement développé pour standardiser le mode d'obtention des agglutinations érythrocytaire et faciliter leur mise en évidence en les « filtrant ». Pour cela, les GR sont centrifugés dans des conditions précises à travers un gel contenu dans un micro tube.

Quand les hématies n'ont fixé aucun anticorps, elles traversent le gel et forment un sédiment au fond du tube.

Quand les hématies ont fixé des Ac elles forment des agglutinats en cours de centrifugation et ne peuvent sédimenter.

Le gel agit donc, comme un filtre capable de retenir les agglutinats, plus au moins efficacement selon leurs tailles.

Ces techniques de filtration « en gel » ont permis de standardiser plusieurs étapes de la technique de coombs indirect et des autres techniques de la RAI. Elles nécessitent un dispositif habituellement appelé cassette, où se déroule l'ensemble de l'analyse.

Tous les supports de filtration disponibles sur le marché comportent une série de tubes regroupés sur une cassette.

Dans la partie basse des tubes se trouve le matériel de filtration (gel, microbilles de verre selon les fournisseurs).

La partie située au dessus du matériel de filtration constitue une chambre d'incubation où seront déposés le sérum et les hématies tests et où se déroulera la phase de formation des complexes antigènes anticorps.

A- Les Aspects Positifs de la Technique de Filtration

- Meilleure reproductibilité des résultats
- Augmentation de la sensibilité de l'analyse :
Le principe même de la filtration est à l'origine d'une augmentation de la sensibilité
- Diminution des erreurs techniques
- Diminution du temps nécessaire à l'analyse
- Limitation des risques de contamination du personnel et de l'environnement.

B - Causes d'Erreurs et Limites de la Technique de Filtration

1 - Réactions non spécifiques

La fréquence des réactions non spécifiques peut être augmentée.

L'augmentation de la sensibilité peut entraîner une modification de la spécificité des résultats. Lorsque le seuil de détection est amélioré, il peut permettre la détection d'anticorps sans aucune signification clinique, il s'agit très souvent d'auto-Ac non titrables qui sont le plus souvent mis en évidence avec les hématies traitées par les enzymes.

2 - Fausses images de résultat positif

Elles sont liées essentiellement à la qualité de l'échantillon testé. Elle peuvent avoir l'aspect d'une réaction très positive avec des hématies stoppées à la partie haute de la colonne de filtration.

Il s'agit très souvent d'un accrochage des hématies dans un anneau de fibrine lié à une mauvaise coagulation du sérum ou d'un début de coagulation d'un plasma.

On peut observer aussi des réactions floues avec une dispersion des hématies tests dans toute la colonne de filtration. Il peut s'agir d'une réaction liée à une hyperprotidémie. Ce phénomène peut être observé chez des patients présentant une pathologie avec une hyper-sécrétion de gamma-globuline.

V - L'immuno-adhérence : Test de Coombs en phase solide

Dans ces systèmes, le sérum à tester est mis en présence d'hématies préalablement fixées au fond d'une microplaque. Après incubation, lavage rapide, on ajoute une antiglobuline. Après de nouveaux lavages, on ajoute des hématies révélatrices (Hématies revêtues d'anticorps).

Dans les réactions positives, les globules rouges fixent les anticorps du sérum à tester, puis le sérum antiglobuline et enfin les hématies révélatrice ce qui entraîne la formation d'une couche homogène au fonds des puits. Dans les réactions négatives, la première couche d'hématies n'a rien fixé et les hématies révélatrices sédimentent en bouton au centre de la cupule.

VII - Epreuve de compatibilité

Elle consiste à mettre en présence le sérum du malade avec les hématies des unités de sang qu'il va recevoir.

Pour assurer le maximum de sécurité transfusionnelle, il est préférable d'associer deux techniques (technique de coombs indirect à basse force ionique et technique avec les hématies traitées par la papaine).

Si aucune réaction ne se produit dans ces deux techniques, les unités seront alors délivrées, si non une recherche d'Ac irréguliers sera effectuée afin d'identifier l'anticorps responsable de la réaction positive (unité incompatible) et de transfuser le malade avec du sang dépourvu de l'antigène correspondant.

A -Technique

Laver 3 fois les GR des unités sanguines à tester et à partir du culot lavé.

1 - Epreuve de Compatibilité en Coombs Indirect BFI

- Préparer à partir du culot lavé une suspension à 3 % en BFI
- Dans un tube à hémolyse mettre 2 gouttes de sérum à tester + 2 gouttes de la suspension globulaire en BFI
- 15 mn d'incubation à 37°C
- Laver 3 fois
- Bien égoutter à la fin du 3^{ème} lavage et ajouter une goutte d'antiglobuline polyvalente
- Centrifuger 1500 t/mn pendant 20 sec. et lecture par agitation modérée.

2 - Epreuve de Compatibilité en Papaïne

**** Papaïnation des hématies**

- Dans un tube à hémolyse mettre 2 goutte du culot lavé + 2 gouttes de papaïne
- Incuber 7 mn à 37°C
- Laver 3 fois et mettre en suspension à 3 % en E φ.

**** Epreuve de compatibilité**

- Dans un tube à hémolyse, mettre 2 gouttes de sérum à tester, ajouter 2 gouttes de la suspension globulaire papaïnée
- Incuber 35 mn à 37°C
- Transférer sur plaque d'opaline et lire directement la présence ou l'absence d'hémagglutination.

Recherche et Identification des Agglutinines Irrégulières

I – Introduction

- 1) Panel érythrocytaire
- 2) Diversification des techniques
- 3) Date de la recherche des Ac

II – Mode Opérateur

- 1) Préparation du panel
- 2) Techniques de la recherche des agglutinines irrégulières
 - 2-1- Technique en salin à 22°C
 - 2-2- Technique en papaine
 - 2-3- Technique en coombs indirect à basse force ionique
 - 2-4- Technique en coombs indirect trypsiné BFI
 - 2-5- Technique en Gel

III – Lecture et Résultats

IV – Identification des allo-anticorps

- 1) Bonnes pratiques de l'identification
- 2) Procédures de l'identification
- 3) Résultats et piège
 - 3-1- Les identifications simples
 - 3-2- Les identifications complexes
 - 3-2-1- Mélange d'anticorps
 - 3-2-2- Toutes les hématies testées sont agglutinées :
 - Test de coombs direct négatifs et témoin auto négatif
 - Test de coombs négatif et témoin auto positif
 - Test de coombs direct positif et témoins auto positif

Recherche et Identification des Agglutinines Irrégulières

I - Introduction

La recherche des allo-anticorps anti-érythrocytes et leur identification sont indiquées chez la femme enceinte, le malade qui va recevoir des transfusions et en particulier le polytransfusé.

Le principe de la méthode est simple : à l'aide d'une gamme d'hématies tests détectrices, appelée panel, (GR de GS O dont la constitution phénotypique est connue), on cherche à dépister puis à identifier un anticorps ou un mélange d'anticorps dans un sérum (ou un éluat). La coïncidence entre les distributions de l'un des antigènes de la liste des hématies du panel et les réactions positives et négatives observées permet cette identification, par exemple, un anti D est identifié lorsque des hématies D + donnent une réaction positive avec le sérum étudié, alors que les hématies D - donnent une réaction négative.

Si le principe est simple, les modalités techniques sont relativement complexes, cette complexité provient en particulier de deux faits :

** On ne peut pas prévoir à priori par quelle technique l'anticorps sera actif et pourra être mis en évidence.

** La liste des hématies utilisées ne permet pas toujours toutes les possibilités d'identification.

La validité des résultats d'une RAI, dépend de trois principes élémentaires dont certains sont parfois méconnus, ce qui peut aboutir à des résultats erronés.

1 - Il faut un bon panel

C'est la condition essentielle d'un dépistage correcte et d'une identification sérieuse.

Les hématies du panel de dépistage doivent être de groupe O. Le panel de dépistage doit associer plusieurs antigènes immunogènes :

D, C, c, E, e, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, Le^a, Le^b, M, N, S, s, P1 au moins. C^w, Kp^a, Lu^a si possible.

-L'inclusion d'hématies homozygotes complémentaires dans le panel (notamment pour les antigènes des systèmes Duffy, Kidd, et Ss et Rhesus) est préférable à celle des hématies hétérozygotes.

Pour toutes ces raisons, les panels de dépistage ont tendance à évoluer du minimum légal de 2 vers 3 ou 4 hématies. Un panel de dépistage permet seulement de détecter la présence ou l'absence d'allo-anticorps. Il ne permet en aucun cas d'identifier l'allo-Ac.

- L'importance de la qualité des hématies est primordiale, autre la qualité de leur conservation, il est important que leur antigénicité dans les différents systèmes ait été bien contrôlée.

2 - Il faut impérativement utiliser un éventail de technique

Rien ne permet de prévoir dans quelles conditions l'anticorps éventuel va être actif. Il peut être agglutinant ou non, actif seulement par le test de coombs indirect ou encore n'être visible que sur des hématies déjà préparées par un traitement enzymatique ou encore par des techniques utilisant à la fois le coombs indirect et les hématies traitées par les enzymes (voir comportement sérologique des allo-Ac Tbn°II).

Il faut donc impérativement utiliser une stratégie de détection et d'identification, qui laisse le moins de chance possible de ne pas apercevoir l'anticorps.

Quelles techniques faut il associer ?

Voici à titre indicatif celles utilisées en recherche systématique au C.N.T.S

** Salin 22°C : elle dépistage les principaux anticorps naturels (Lewis, P1, M, N)

** Papaine à 37°C : elle détecte anti Rh, la plupart des anti Kell, certains anti Kidd et les auto-Ac.

A rappeler que les antigènes du système Duffy, et du système MNSs sont détruits par les enzymes protéolytiques.

** Test de coombs indirect à BFI à 37°C sur des hématies trypsinées détecte les anti Rh anti Kell, anti Duffy, anti Kidd mais la sensibilité est moins importante que la technique à la papaine pour les anti- Rh.

3 - Il faut faire attention à la date de la RAI, particulièrement chez les polytransfusés

On ne doit jamais oublier que la concentration des anticorps varie selon le rythme des stimulations. Une recherche d'agglutinines effectuée juste avant une série de transfusion peut être négative, puis devenir positive vers le 10^{ème} jour qui suit la dernière transfusion. En effet l'absence d'Ac avant la transfusion ne signifie pas, chez un sujet ayant eu dans le passé des transfusions ou chez une femme ayant eu des enfants, que le sujet ne soit pas immunisé. Une nouvelle transfusion peut réactiver

cette immunisation infra-sérologique et faire réapparaître un Ac qui provoquera la lyse retardée des hématies injectées. L'Ac ne sera pas révélé immédiatement puisqu'il est absorbé au fur et à mesure sur les hématies. Il faudra attendre 5 à 10 jours, ou plus, pour le dépister.

II – Mode Opératoire

- La RAI se fait toujours en deux étapes :

- Un dépistage : le sérum est testé vis-à-vis des GR du panel de dépistage (3à4).
- Une identification : dans le cas où le dépistage est positif le sérum est testé vis-à-vis d'un panel d'identification composé de 8 à 12 hématies

Des techniques différentes mais qui se complètent du fait de la spécificité variée des anticorps sont utilisées.

- Technique en salin à 22°C = technique d'agglutination spontanée
- Technique en papaïne = technique d'agglutination artificielle
- Technique de coombs indirect sur des hématies trypsinées en suspension dans un milieu de basse force ionique
- Technique de coombs indirect à basse force ionique.

1 - Préparation du Panel

Le panel de dépistage est constitué de 2 ou 4 hématies tests et le panel d'identification est constitué de 8 à 10 hématies tests.

** Globules rouges en milieu salin, pour la technique en salin et la technique du TCI en salin

A partir du culot globulaire lavé 3 fois, réaliser une suspension à 3 % en eau physiologique

** Globules rouges pour la technique en papaïne

- Volume de culot globulaire lavé 3 fois + 1 volume de solution de papaïne
- 7 mn à 37°C
- Laver 3 fois
- Remettre en suspension à 3 % en eau physiologique

** Globules rouges pour la technique en coombs indirect trypsiné

- 2 volumes de culot globulaire lavé 3 fois + 3 volumes de solution de trypsine
- 20 mn à 37°C
- Laver 3 fois
- Remettre en suspension à 3 % en eau physiologique ou en BFI

** Globules rouges en solution à basse force ionique pour le TCI en BFI
A partir du culot globulaire lavé 3 fois, réaliser simplement une suspension à 3 % avec la solution de basse force ionique.

2 -Techniques de la Recherche des Agglutinines Irrégulières

2 -1 -Technique en salin à 22°C

- Dans un tube à hémolyse, mettre 2 gouttes de sérum à tester + 2 gouttes d'hématies du panel en suspension à 3% dans l'eau physiologique.
- Laisser 30 mn à la température ambiante
- Centrifuger 1500 ts/mn pendant 20 secondes et lecture par agitation modérée

2 -2 - Technique en papaïne

- Dans un tube à hémolyse, mettre 2 gouttes de sérum à tester + 2 gouttes d'hématies papainées du panel en suspension à 3% dans l'eau physiologique.
- 35 minutes à 37°C
- Centrifuger 1500 ts/mn pendant 20 sec. et lecture par agitation modérée ou lecture directe sur plaque d'opaline

2 -3 - Technique en coombs indirect à basse force ionique

- Dans un tube à hémolyse, mettre 2 gouttes de sérum à tester + 2 gouttes d'hématies du panel en suspension à 3% en milieu à basse force ionique
- 15 minutes à 37°C
- Laver 3 fois
- Bien égoutter après le 3^{ème} lavage et ajouter 1 goutte d'antiglobuline polyvalente
- Centrifuger 1500 ts/mn pendant 20 sec. et lecture par agitation modérée.

2 -4 - Technique en coombs indirect trypsine – BFI

(Procédé utilisé en particulier pour les anti Jk^a)

Dans un tube à hémolyse mettre 2 gouttes de sérum à tester + 2 gouttes d'hématies trypsinées en suspension à 3% dans l'eau physiologique.

- 15 mn à 37°C
- Laver 3 fois
- Bien égoutter après le 3^{ème} lavage et ajouter 1 goutte d'antiglobuline polyvalente

- Centrifuger 1500 ts/mn pendant 20 secondes et lecture après agitation modérée.

2 -5 - Technique en GEL TEST :

**** Préparation du Panel**

La concentration du panel pour le gel test est très inférieure à celle utilisée dans les techniques en tubes. La concentration des hématies est de 0,8 %.

**** Cartes de Gel Test**

2 types de cartes sont utilisés :

- Nacl Coombs

Les cartes imprimées en vert contiennent de l'antiglobuline polyvalente.

Elles servent donc pour la technique de coombs indirect en BFI.

- Liss enzyme

Les cartes imprimées en orangé contiennent un gel neutre et servent pour la technique enzymatique.

Technique Liss Coombs

- Numéroter les cartes
- Distribuer les hématies du panel = 50 µl de chaque hématie par cupule
- Distribuer 25 µl de sérum par cupule
- Veuillez à ce que la goutte de sérum entre bien en contact avec les hématies
- Incuber à 37° pendant 20 mn (incubateur)
- Centrifuger, lire chaque puit et noter le résultat sur la feuille de paillasse.

Technique Nacl enzyme

- Numéroter les cartes
- Distribuer les hématies du panel = 50 µl de chaque hématie par cupule
- Distribuer 25 µl de broméline
- Distribuer 25 µl de sérum par cupule
- Veuillez à ce que la goutte de sérum entre bien en contact avec les hématies
- Incuber à 37° pendant 20 mn (incubateur)
- Centrifuger, lire chaque puit et noter le résultat sur la feuille de paillasse.

III - Lecture et Résultats

- Lecture macroscopique de l'agglutination appréciée en +
- Une recherche d'anticorps permet seulement de dire, il y a présence ou absence d'Ac

dans le sérum. Elle ne permet en aucun cas son identification

- La technique ayant donné le meilleur résultat et le meilleur score est celle qui doit être utilisée pour l'identification.
- Les résultats sont exprimés en nombre de signe +

IV - L'identification des allo-anticorps

L'identification doit être pratiquée chaque fois que le dépistage est positif.

1 - Bonnes Pratiques de l'Identification

Toujours identifier dans la ou les techniques trouvées positives et ayant donné le meilleur score en dépistage. Les discordances (dépistage positif, identification négative) proviennent toujours d'une non identité technique.

Les panels primaires d'identification sont composés de 10 à 12 hématies tests sélectionnées de groupe O.

Les panels pré-traités par des protéases (papaine, bromeline) sont dépourvus des antigènes M, N, Fy^a, Fy^b et parfois aussi S. Ils sont donc non valables à l'identification des anticorps correspondants. L'aptitude accrue de ces panels à déceler et à identifier d'autre anticorps (anticorps du système Rh et anti-Lewis par exemple) ne doit pas conduire à les utiliser isolément.

2 - Procédure d'identification

**** Les Caractéristiques d'un Panel d'Identification**

-Il doit être équilibré, c'est à dire autoriser l'identification non équivoque des anticorps courants (anti D, anti C, anti E, anti Kell, anti Fy^a, anti Fy^b, anti Jk^b...).

- Il doit être également discriminants, c'est à dire ne pas permettre de confondre deux anticorps entre eux. Il n'est pas toujours possible de satisfaire ces deux conditions avec un seul panel de 10 ou 12 hématies tests pour toutes les identifications. En conséquence, il est recommandé d'analyser préalablement les faiblesses de chaque panel en ce qui concerne :

- Les Ag manquants
- Les Ag présents ou absents sur une seule hématie test
- Les Ag ayant une même distribution au sein du panel et de faire appel à un autre panel en cas de besoin

**** Prévoir une méthodologie stricte de distribution des échantillons et un contrôle final du volume réactionnel**

**** Coter de 1 à 3 (+ à + + +) pour la technique en tube, et de 1 à 4 pour la technique en gel les agglutinations observées**

Cette précaution permet de bien faire ressortir les groupes d'hématies test fortement ou faiblement agglutinées. L'identification s'en trouve facilitée pour les anticorps exprimant un effet dose marqué sur hématies homozygotes. De même un mélange d'anticorps peut être plus facilement évoqué.

**** Inscrire les réactions positives et négatives sur une matrice verticale coïncidant avec la matrice de la feuille de panel puis balayer l'ensemble des colonnes à la recherche d'une identité de distribution entre les réaction d'agglutinations et présence ou non d'un antigène sur les hématies tests. Si les réactions d'agglutination sont peu intense, seules les hématies homozygotes peuvent être agglutinées.**

**** Confirmer ou faire confirmer l'anticorps présumé sur un panel d'identification différent du premier**

**** Rechercher sur les hématies du patient que l'Ag correspondant à l'anticorps est absent S'il est présent, il s'agit alors d'auto-Ac. Le témoin outo est forcément positif Plus rarement, les hématies du patient, bien que porteuses de l'Ag, ne sont pas agglutinées : il peut s'agir d'un anticorps « Partiel » chez un patient dépourvu de la fraction antigénique correspondant (Ag « Partiel »).**

3 - Résultats et Pièges

3 -1 - Les Identifications Simples

Plusieurs situations peuvent être rencontrées :

**** L'identification est simple si l'anticorps est puissant, il agglutine toutes les hématies possédant l'antigène correspondant, qu'elles soient d'expression phénotypique homozygote ou hétérozygote.**

**** L'identification est plus difficile si le taux de l'anticorps est « faible », il ne reconnaît que les hématies d'expression phénotypique homozygote. Il est alors nécessaire de tester le sérum avec un nombre plus important d'hématies d'expression homozygote pour l'antigène correspondant à**

l'anticorps suspecté.

** Une seule hématie est agglutinée : c'est le cas des anticorps reconnaissant des Ag de faible fréquence voire un antigène privé . Il faut tester un grand nombre d'hématie (un autre panel) pour prouver le caractère anti-antigène privé. A l'inverse des Ac « anti public », ces Ac anti Ag privé agglutinent au plus une hématie test du panel - Leur présence est suspectée à la suite d'une transfusion inefficace ou d'un test de compatibilité prétransfusionnel positif avec une seule unité de CGR avec une RAI négative. Parfois c'est à la suite d'une maladie hémolytique néo-natale avec coombs direct positif type IgG chez le nouveau-né RAI chez la mère négative. L'Ag est mis en évidence sur les hématies du père et de quelques un de ses ascendants, descendants ou collatéraux.

** Les Ac les plus souvent rencontrés sont :

- Anticorps anti Rhésus

Généralement immuns et dangereux en transfusion et en obstétrique. Parfois naturels (anti E, anti C^w) actif uniquement en technique enzymatique appelé enzyme only non dangereux au moment où ils sont dépistés.

- Les Ac du système Kell, Duffy, Kidd, Ss

Il sont généralement immuns et dangereux en transfusion (surtout K, k, Fya, S, s), parfois en obstétrique. Ils présentent un problème essentiel car la prévention de l'immunisation par le respect du groupe est moins systématique que dans le système Rh et le dépistage de ces Ac est plus aléatoire (le système Kidd est un système perfide).

- Les anti Lewis, M, P1

Relativement fréquents, souvent naturels, rarement dangereux en transfusion et jamais en obstétrique.

3 - 2 - Les Identifications Complexes

Il peut s'agir :

D'un mélange d'anticorps

D'un anticorps anti public

D'un anticorps anti H

3 - 2 - 1 - Mélange d'anticorps

Chez les polytransfusés haut répondeurs, les immunisations post-transfusionnelles se cumulent au fil des transfusions itératives. Trois, quatre etc... allo-Ac sont alors présents, leurs spécificités

dépendant des phénotypes érythrocytaires du patient et des unités transfusées.

Un mélange d'Ac est suspecté lorsque

** Les réactions positives et négatives ne coïncident avec une distribution antigénique simple sur toutes les hématies du Panel, les intensités de réaction d'agglutination « varient » d'une hématie à une autre ou quand on observe des distorsions de réactivité entre le TCI et les tests enzymatiques. Si l'utilisation d'un 2^{ème} panel ne permet pas d'identifier le mélange d'Ac, des épreuves de fixation et d'élution doivent être pratiquées. Ces épreuves permettent de séparer ce mélange et d'identifier séparément chaque anticorps rentrant dans l'association.

Avec le temps, certains anticorps disparaissent mais le dossier transfusionnel doit impérativement conserver la trace de ces immunisations infra-sérologiques. Chez ces patients l'identification d'un nouvel anticorps devient de plus en plus délicate, et nécessite de disposer d'une collection très étendue d'hématies tests largement phénotypés

3 - 2 - 2 - Toutes les hématies testées sont agglutinées

Ils peut s'agir d'un auto-Ac, un Ac dirigé contre un Ag de grande fréquence ou encore un mélange complexe d'Ac. Le témoin autologue et le T.C.D à l'antiglobuline doivent être réalisés.

b-1-TCD (-) et témoin auto (-) :

- Anti H

Toutes les hématies sont agglutinées dans les deux techniques et les réactions sont plus nette en technique enzymatique.

Un anti H est suspecté lorsque le patient est de groupe A1 ou A1B. La RAI sera effectuée avec plusieurs hématies A1 et A2. L'anti H peut être éliminé en incubant le sérum avec la salive de sujet O sécréteur de substance ABH.

- Allo-anticorps « anti-public »

Leur présence est évoquée lorsque toutes les hématies sont également agglutinées, mais les hématies autologue sont négatives.

Ces anticorps ont pour cible des antigènes très communs (Ag publics) absent dans moins de 1% de la population.

L'identification de ces Ac implique de disposer de multiples gamme d'hématies test et de recourir éventuellement à des hématies informatives de phénotype rare conservées à - 80°C ou en azote liquide et des sérums test permettant de déterminer le statut phénotypique du patient vis à vis

d'antigène particulier.

- Anticorps anti H.T.L.A

Ils sont suspectés quand la réaction est positive seulement en TCI en BFI et de faible intensité.

Les anticorps regroupés sous le nom de HTLA (High titer, low affinity) présentent les mêmes caractères. Ce sont des anticorps rencontrés chez les sujets polytransfusés, de type IgG réagissant avec leurs antigènes spécifiques par la technique à l'antiglobuline. En général leurs constantes d'association sont faibles, mais leurs titres sont élevés. La plupart des antigènes correspondant à ces Ac ont des fréquences élevées de sorte qu'il est très difficile de trouver du sang compatible.

Les antigènes généralement reconnus par ces Ac sont les suivants :

- Antigène YK^a (York)
- Antigène Cs^a (Cost)
- Antigène McC^a (Mac.Coy)
- Antigène Kn^a (Knops)
- Antigène Rg (Rodgers)
- Antigène ch (Chido)

Il est communément admis maintenant, que ces anticorps ne détruisent pas les GR transfusés. Cependant il faut savoir les identifier pour pouvoir prendre la décision de transfuser le malade.

Comment démontrer la présence des anti HTLA ?

- Préparer une série de dilution du sérum à tester en saline volume final minimum 5 gouttes (de 1 à 4096 = 12 tubes)
- Placer 3 gouttes de chaque dilution (préparer 3 tubes de dépistage pour chaque dilution)
- Tester chaque dilution vis à vis des 3 hématies du panel de dépistage (ajouter une goutte d'hématie dans chaque tube)
- Agiter et incuber 1h à 37°C
- Laver 3 fois avec de l'eau physiologique et teste avec l'anti globuline poly spécifiques
- Examiner l'agglutination
- Confirmer les réactions négatives par une lecture microscopique
- Donner un score à chaque résultat.

Interprétation

Le sérum qui continue à réagir au delà de 4 dilutions avec une réaction 1 +, peut être considéré contenir des Ac anti HTLA.

Les GR qui réagissent à des intensités différentes avec des sérums non dilués, doivent être retestées pour voir qu'elle est la dilution qui donne le même aspect que le reste des réactions. Si plusieurs GR réagissent seulement ou préférentiellement avec des dilutions faibles de sérum, le sérum peut contenir aussi des Ac non HTLA, tel que anti E ou anti K.

Les anti HTLA les plus fréquents sont les anti Chido (ch) et Rodgers (Rg) dont l'activité est neutralisée après incubation du sérum dans un mélange de plasma qui contient les Ag Ch et Rg.

b -2- TCD (-) et Témoin auto (+) en enzymatique

Il s'agit le plus souvent d'auto enzymes mis en évidence après traitement des hématies par les enzymes protéolytiques et en particulier la papaïne.

Ces anticorps sont dirigés contre les antigènes cryptiques et communément dénommés auto-papaïne, auto - broméline etc....

Quoique sans intérêt clinique, ces agglutinines nécessitent un travail d'identification pour éviter de les confondre avec des anticorps cliniquement important mais de faible concentration (allo-Ac public).

On confirme les auto-enzymes par leur adsorption avec des hématies autologues dans des conditions opératoires reproduisant la technique de leur mise en évidence.

Une fois « absorbé » le sérum est alors repris en identification. On rejoint alors les procédures d'auto-absorption à appliquer lors des anémies hémolytiques à auto-Ac.

Il n'existe pas actuellement de solution pour éviter ces agglutinines.

b -3- TCD (+) et Témoin auto (+)

Les auto-anticorps peuvent entraîner des difficultés d'identification très longues à résoudre, il est difficile voire impossible de détecter un allo-anticorps masqué sans avoir recours à des techniques complémentaires.

** Si le TCD est positif type C3d, les réactions positives sont observées dans les deux techniques avec une intensité supérieure lorsque les hématies sont traitées par les enzymes. Il s'agit probablement d'auto-Ac froids. Pour détecter les éventuels allo anticorps masqués il suffit de traiter le sérum par un agent réducteur (2 ME) et refaire la RAI sur le sérum traité.

** Si le TCD est positif du type IgG, il est nécessaire d'adsorber l'auto-Ac pour détecter et identifier l'éventuel allo-Ac masqué. A chaque fois où cela est possible (patient transfusé depuis 3 mois) les auto-adsorption sont privilégiées. Si l'auto adsorption ne peut être pratiquée, on fait des adsorption homologues avec des hématies de phénotype Rhésus antigéno-compatible avec celui du patient et dépourvues des principaux antigènes immunogènes et refaire la RAI sur le sérum adsorbé.

Le réactif ZZAP

il s'agit d'un mélange de DTT à 0.1 M et de papaine (0.1% cysteine activated papaine) il permet de

:

- dissocier les immunoglobulines des la surface des hématies (négative les TCD+)
- décortiquer les associations complexes d'allo- anticorps par-ce qu'il permet de détruire les antigènes suivants :

Kell (K,k,Kpa,Kpb,Js_a,Js_b,Ku, K:11,K:12,K:13,K14,K:18,K:19,)

Gerbich ; Duffy, MNS,

s (non totalement altéré)

Yta (cartwright): variable : altère

certaines mais pas tous les Ag Yta

- il favorise la fixation des auto Ac sur les hématies autologues traitées par le ZZAP

Traitement des hématies par le ZZAP

A deux volumes d' hématies à 3 % sont lavés avec de l'eau physiologique sont ajoutés 2 volumes de

ZZAP

Incuber 30 mn à 37°C, à ambiante et laver trois fois et resuspendre les hématies dans l'eau physiologique ou dans la BFI

ETUDE DES ANEMIES HEMOLYTIQUES AUTO-IMMUNES

I - Introduction

II - Nature et Spécificité des Auto-anticorps anti-érythrocytaire

1 - Les auto-anticorps chauds

1 -1 - Auto-anticorps « chaud » de nature IgG

1 -2 - Auto-anticorps « chaud » de nature IgM

2 - Les auto-anticorps froid : IgM « froides »

3 - L'hémolysine biphasique

4- les AHAI liées aux médicaments

III - Les Méthodes du diagnostic immunologique

1 - Le prélèvement

2 - Le test de coombs direct

3 - L'élution directe

4 - L'étude du sérum

4 -1- Cas des AHAI chaudes

4 -2- Cas des AHAI froides

4 -3- Cas de l'hémolysine biphasique.

IV – Annexes

1) Etude de la spécificité des auto-Ac

2) Détermination de l'optimum thermique d'un auto-Ac

3) Recherche des hémolysines associées aux auto-Ac

4) La procédure d'étude des AHAI

V - Procédure d'étude des auto-anticorps anti-érythrocytaires

ETUDE DES ANEMIES HEMOLYTIQUES AUTO-IMMUNES

I - Introduction

Les anémies hémolytiques auto-immunes (A.H.A.I) se définissent comme étant des états acquis d'hyper-hémolyse. Elles s'accompagnent de la présence, à la surface des hématies et parfois dans le sérum, d'immunoglobuline, ayant une activité anticorps, dirigée contre les antigènes des hématies du malade. Cependant, dans certains cas, uniquement la fraction C3d est retrouvée sur les hématies. Les A.H.A.I doivent être distinguées des autres anémies hémolytiques immunologiques :

- Par allo-immunisation fœto-maternelle dans le cas de la maladie hémolytique néo-natale.
- Par incompatibilité transfusionnelle
- Par mécanisme immuno-allergique lié à une sensibilisation de l'organisme à un médicament et la fixation d'un complexe immunitaire à la surface des hématies.

Par ailleurs, il est important de savoir que l'aspect clinique dépend pour une grande part du type immunologique en cause, et que l'identification immunologique renseigne sur :

- L'étiopathogénie
- Le pronostic
- La conduite thérapeutique

II - Nature et Spécificité des Auto-anticorps anti-érythrocytaire

1 - Les auto-anticorps chauds

1 - 1 - Auto anticorps « chauds » de nature IgG

- Ils sont les plus fréquents, ils sont présents à la surface des hématies (test de coombs direct type IgG ou mixte) d'où ils peuvent être élués. Ils sont présents dans le sérum à titre faible ou absent.
- Leur optimum thermique est à 37°C (anticorps chauds).
- Leur capacité de fixer le complément varie selon la sous classe de l'IgG. Le TCD sera le plus souvent de nature IgG, plus rarement de type IgG + complément.
- auto-anticorps sont dirigés contre des antigènes de grande fréquence du système RH. La spécificité la moins rare restant la spécificité « e », ce qui permet de disposer pour les transfusions, de sang compatible (R2 R2). Cependant, le plus souvent l'auto-Ac est dirigé contre, des antigènes publics du système RH anti-nl ; anti-pdl ; anti-dl. [«nl » (normal) « pdl » (partiel délétion) « dl » (délétion)].

Spécificité de l'auto Ac	GR du Malade	GR Normal R2 R2	D - - / D - -	Rh nul - - - / - - -
Anti e	+	-	-	-
Anti nl	+	+	-	-
Anti Pdl	+	+	+	-
Anti dl	+	+	+	+

Spécificités anti-Rhésus des auto-Ac de type IgG

1 - 2 - Auto Ac « chauds » de nature « IgM »

Certains auto-Ac de type IgM sont actifs à 37°C et gardent une activité agglutinante jusqu'à 45°C. Ces auto Ac sont dirigés généralement contre les spécificités I et i. Ils sont responsables de la fixation de la fraction C3d sur les hématies et hémolysent à 37°C les hématies traitées par les enzymes protéolytiques = Hémolysine chaude neutre (PH = 7,3)

2 - Auto anticorps froids « Agglutinines Froides »

Ils sont fréquents et surviennent dans 20 – 30 % des cas d'AHAI. Leur spécificité étant le plus souvent anti I, parfois anti P.

Dans la très grande majorité des cas les auto-Ac sont des agglutinines froides qui provoquent une agglutination à froid, réversible à 37°C. Ils doivent être distingués des agglutinines froides de titre faible (1/32 à 4°C, O à 30°C) présents dans de nombreux sérums en dehors de toute hyperhémolyse.

En pratique, on distingue généralement :

** Les agglutinines froides dont le titre est modérément élevé (< 1000)

Elles sont rencontrées généralement chez les enfants et sont secondaires à une infection virale. Elles sont parfois responsables d'hémolyse et répondent bien à la corticothérapie

** Les agglutinines froides de titre élevé (> 1000 – 100000) rencontrées chez les sujets âgés, d'évolution chronique et peu sensible à la corticothérapie.

Les agglutinines froides responsables d'anémies hémolytiques possèdent généralement les caractéristiques suivantes :

- Un Titre élevé à 4°C (1/2000 à 1/100 000 et plus) avec réversibilité totale à 37°C ou tout au moins à 45°C (ce titre n'a de signification que si dès le prélèvement, le sang a été maintenu à 37°C jusqu'à décantation du sérum, de façon à éviter la fixation des Ac sur les hématies).

- Une amplitude thermique étendue, l'activité se manifeste, quoiqu'en diminution progressive, (jusqu'à 30°C, parfois plus)
- Une Agglutination maximale obtenue en sérum physiologique
- Une Activité hémolytique in vitro en général plus nette en milieu acidifié et vis à vis des hématies traitées par les protéases (hémolysine-acide)
- Un Test de coombs direct de type complément
- Spécificité : ces agglutinines sont généralement dirigées contre un antigènes public
 - * Fréquemment I + + +
 - * Possible = i +
 - * Parfois spécificité complexe AI, BI, HI

Pour ces spécificités l'activité agglutinante augmente lorsque les hématies sont préalablement soumises à l'action des enzymes protéolytiques.

- * Dans 2 à 3 % une spécificité dirigée contre des Ag Pr présents sur toutes les hématies humaines et disparaît sous l'action des protéases et / ou des neutraminidases)
- * D'autres spécificités antigéniques = anti M, anti N... ont été rapportées.

3 - Hémolysine biphasique

L'hémolysine biphasique est une IgG de spécificité anti P. Cet anticorps présent dans le sérum caractérise l'hémoglobinurie paroxystique a frigore , devenue exceptionnelle. Il peut être observé plus souvent au cours d'épisodes hémolytiques aigus post infectieux de l'enfant. Il est mis en évidence par une réaction en 2 temps.

****Une Phase froide** (30 mn à 0°C, voire à + 4°C) au cours de laquelle l'hémolysine se fixe, ainsi que le complément sur les hématies du malade, ce que l'on peut prouver en mettant en évidence (les lavages étant faits à + 4°C) une réaction de coombs de type IgG + complément.

****Une Phase chaude** : la lyse n'apparaît que lorsque le milieu est ramené à 37°C, d'où le terme biphasique ou bithermique. Le titre de cette hémolysine est relativement faible de l'ordre de 1/8 à 1/64. L'auto anticorps est de classe IgG fixant le complément. Au cours de passage à 37°C, l'anticorps s'élue mais le complément restant à la surface des hématies (TCD type complément). Cet auto-anticorps a une spécificité anti P reconnaissant les hématies P1 et P2. Seules les exceptionnelles hématies pp, P K1 et P K2 ne s'ont pas agglutinées.

4- les AHAI liées aux médicaments

les auto anticorps induits par les médicaments forment une autre catégorie d'AHAI, dans laquelle les auto Ac présentant une affinité pour les globules rouges le médicament impliqué. le mécanisme d'attachement peut être de type haptène classique.

le médicament se lie de façon non covalente au globule rouge qui est alors ciblé par l'auto anticorps de manière dépendante du médicament (Ex : la pénicilline)

- dans d'autres mécanismes un auto Ac se développe spécifiquement au médicament impliqué , mais il est aussi capable de reconnaître ses propres antigènes érythrocytaires, déclenchant une hémolyse dépendante du médicament (Ex méthyl dopa).

- le troisième mécanisme est la formation d'un immun complexe entre le médicament et l'auto Ac , qui se dépose sur la membrane érythrocytaire, et engage l'activation du système complément qui serait à l'origine de l'hémolyse (Ex quinine).

Actuellement, l'AHAI la plus fréquente liée à la drogue est celle rencontrée dans LLC avec le traitement à la fludarabine .

l'AHAI liée à la fludarabine peut mettre la vie du patient en danger et nécessite une intervention rapide.

III -Les Méthodes du diagnostic immunologique

1 - Le prélèvement = Un tube sec + un tube citraté

2 - Le T.C.D

Le test de Coombs direct doit être effectué à 37° aussi bien pour l'étude des anémies hémolytiques auto-immunes chaudes que pour des agglutinines froides (incubation du tube de prélèvement à 37°C et lavage des hématies avec l'E φ pré-incubation à 37°C).

Le TCD démontre la sensibilisation, soit par une immunoglobuline, soit par le complément soit par les deux à la fois.

On utilise dans un premier temps une antiglobuline polyvalente. En cas de positivité, on complète les investigations par l'utilisation des antiglobuline spécifiques : anti IgG et anti C3d.

Un test de coombs direct positif ne permet pas à lui seul de diagnostiquer l'AHAI .En effet de l'ordre de 1/10000 donneurs de sang sains et 8 % des malades hospitalisés ont un TCD positif.

Le TCD doit être interprété en même temps que l'évaluation clinique et la présence d'hémolyse évidente.

Les problèmes du TCD

** Les AHAI à test direct à l'antiglobuline négatif

La réaction négative peut s'expliquer par :

- L'insuffisance qualitative de l'antiglobuline, par exemple lorsque l'antiglobuline est dépourvue d'activité anti IgA.

Cette situation peut également s'expliquer par les limites de détection de la technique utilisée : le chiffre 100 à 150 molécules d'IgG par hématie reste le seuil de détection pour une technique classique correctement réalisée (technique en tube).

- Faible affinité de l'auto anticorps

****Les tests directs à l'antiglobuline positifs en l'absence d'AHAI**

En fait, la présence d'IgG et de fractions du complément (C3d) a été décrite chez les sujets normaux. La responsabilité d'auto-anticorps dans l'hémolyse physiologique est aujourd'hui le plus souvent admise.

**** Un coombs direct positif peut s'observer dans le cadre des transfusions incompatibles. Les hématies transfusées étant sensibilisées par l'allo-anticorps produit par le receveur.**

3 - Elution directe

Elle a pour but de détacher de la surface des hématies les anticorps fixés, afin de permettre leur étude.

L'élution est réalisée par méthodes physiques et / ou chimiques, nous citerons à titre d'exemple l'élution à la chaleur, à l'éther, au xylène qui sont les plus utilisées. Cette élution va permettre éventuellement :

- De confirmer la présence d'un Ac fixé sur les hématies, que le test de coombs direct soit positif ou négatif. Elle s'impose donc, quelque soit le résultat de ce dernier. Le fait qu'aucun anticorps ne soit détecté dans l'éluat direct n'est cependant pas un argument formel en faveur de l'absence d'auto-anticorps.

- D'étudier la nature, les caractéristiques, la spécificité de l'Ac dissocié des hématies et de comparer ces résultats à ceux qui sont apportés par l'étude de l'anticorps dans le sérum.

4 - L'étude du sérum

Elle comporte :

- Une recherche d'anticorps irréguliers faits à différentes températures :
+ 4°C + 22°C + 37°C sur des hématies traitées et non traitées avec les enzymes protéolytiques.
- Détermination de l'optimum thermique de l'auto anticorps. Annexe II.
- Détermination du titre de l'auto anticorps
- Etude de la spécificité de l'auto anticorps et la comparaison de la spécificité avec celle trouvée dans l'éluat. Annexe I
- Recherche d'allo anticorps associé
- Recherche d'hémolysine réalisée si le TCD est positif type C3d ou mixte Annexe III et IV.

Les résultats de la recherche des Ac à différentes températures, de l'optimum thermique et du TCD nous permettent d'orienter les investigations soit dans le sens des auto-anticorps « chauds » soit dans le sens des auto-anticorps « froids » et des hémolysines biphasiques.

4 - 1 - Cas des AHAI Chaudes

Dans les AHAI chaudes, l'auto anticorps libre est souvent mis en évidence dans le sérum par un test de Coombs indirect (dans 57 % des cas) ou par une technique utilisant les enzymes protéolytiques (dans 89 % des cas). Il est important lors de l'étude du sérum :

- De vérifier qu'il ne s'agit pas d'un allo anticorps en comparant la spécificité de l'anticorps sérique et celle de l'éluat
- De chercher les allo anticorps associés qui peuvent être masqués par l'auto anticorps. En effet la RAI dans les AHAI chaudes est rarement informative (toutes les réactions sont positives). Pour résoudre cette difficulté, il y a différentes procédures :
 - Refaire la RAI avec du sérum dilué ceci permet de détecter un allo anticorps si son titre est supérieur à celui de l'auto anticorps
 - Faire une auto-adsorption du sérum à 37°C (volume de culot globulaire + volume de sérum, incubation à 37°C pendant 1h c'est une technique efficace mais longue et nécessite plusieurs passages. Elle est sans valeur chez un malade transfusé.
 - Adsorption du sérum à 37°C sur des hématies de phénotype connu. C'est une bonne technique, applicable à un malade récemment transfusé. C'est une technique lourde, 2 ou 3 hématies de phénotype différents sont nécessaire en quantité convenable.

4 - 2 - Cas des AHAI Froides (Agglutinines froides)

L'auto-anticorps est rarement actif à 37°C, mais il peut réagir en présence d'hématies traitées par

la papaïne. L'étude du sérum

**** L'étude de la spécificité et du titre (annexe I)**

Le sérum est testé à + 4°C vis à vis des GR OI + OI (-) et auto non traité et traité par la papaïne.

La papaination des hématies permet de déceler une éventuelle spécificité Pr des agglutinines froides.

	GR non traités		GR traité par la papaïne
	I +	I -	
Anti I	+++	+	↑
Anti i	+	+++	↑
Anti I i	+++	+++	↑
Anti Pr	++	++	↓

**** L'étude de l'amplitude thermique (Annexe II)**

**** L'étude de la nature immuno-chimique.**

L'utilisation des antiglobulines spécifiques (anti IgG et anti C3d) permet de conclure sur la nature immuno-chimique de l'auto anticorps. La nature immuno-chimique peut être étudiée par l'inactivation par le dimercaptoéthanol 0,2 M ou par le Dithiothréitol 0,04.

- 1 volume sérum + 1 volume 2 ME 0,2 M

- Incuber 30 mn à 37°C.

**** Recherche d'allo anticorps associés**

- Le traitement du sérum par le 2 ME permet de détruire l'auto-anticorps IgM et d'identifier un éventuel allo-anticorps associé.
- Auto-adsorption sur les GR papainés

**** Recherche d'hémolysines acides associées aux auto-anticorps**

(Annexe III).

4 - 3 - Cas de l'hémolysine biphasique : Test de DONATH-LANDSTEI (Annexe IV)

L'auto anticorps est mis en évidence par une réaction qui se déroule en 2 temps :

**** Une phase froide : fixation de l'auto-Ac**

****Une phase chaude : activation du complément**

ANNEXE I

Etude des spécificités des agglutinines froides

- Le sérum est testé pur et dilué au 1/15 et au 1/10, en tube à hémolyse, vis à vis des hématies du malade, d'hématies OI+ (adulte) et OI – (sang de cordon).

A une goutte de sérum ou de ses dilutions on ajoute une goutte de GR en suspension saline à 5 %. Après 1H30 d'incubation à + 4°C on lit l'agglutination au microscope, après étalement sur lame.

- Positif vis à vis des hématies OI+ et négatif vis à vis du sang de cordon = spécificité I.

- Si l'Ac ne reconnaît que les hématies autologue, on recherche une spécificité AI ou BI, selon le GS du malade en testant vis à vis des hématies A ou B d'adulte et du cordon.

- Si la réaction est encore positive au 1/10, avec OI+ et OI- le sérum est repris en titrage par double dilution vis à vis des même hématies papainées et non papainées .

Le titre de l'agglutinine froide n'a pas de signification si le sang a été gardé à + 4°C

- Si le titre est plus faible vis à vis des hématies papainées que sur les hématies non traitée, le sérum est repris sur des hématies de phénotype MM et NN. S'il n'apparaît pas de spécificité dans ce système, l'étude de la spécificité doit être entre prise sur des GR de phénotypes particuliers.

ANNEXE II

Détermination de l'Optimum Thermique d'un Auto-Anticorps

L'optimum thermique d'un auto-Ac est déterminé par des titrages effectués à des températures différentes + 4°, 22°C et 37°C.

L'optimum thermique est la température à laquelle l'Ac donne le titre le plus élevé.

Réalisation

Dans 10 tubes à hémolyse, procéder à des dilutions géométriques de 2 en 2 du sérum à tester dans l'eau physiologique (8 gouttes de sérum + 8 gouttes E φ)

Préparer 3 séries de titrage de l'Ac (série + 4°C, série à 22°C et série 37°C)

Ajouter dans chaque tube 2 gouttes de la dilution de sérum correspondante

Ajouter 2 gouttes de la suspension d'hématies à 5 % dans chaque tube

Incuber chaque série de titrage à la température correspondante pendant 1 H

Centrifuger pendant 20 sec. à 1000 t/mn

Lecture par légère agitation

Déterminer le titre de l'anticorps au niveau de chacune des 3 séries

S'il n'y a pas de réaction positive au niveau des 3 séries. Reprendre la série incubée à 37°C par réaction de Coombs indirect et déterminer le titre après, addition de l'antiglobuline.

ANNEXE III

Recherche des Hémolysines Associées au Auto-anticorps

Elles doivent être recherchées chez tout sujet ayant un TCD positif de type complément.

Elle est réalisée sur sérum décomplémenté pendant 30 mn à 56°C.

On utilise du sérum AB frais comme source de complément.

Le même sérum AB décomplémenté est utilisé comme témoin.

Des hématies OI+ et OI – et auto traitées par la papaine.

Ces hémolysines peuvent être chaudes et neutres ou froides et acides.

Acidification du sérum est faite par le Hcl N/10 (9 gouttes de sérum + 1 goutte d'acide).

Recherche d'hémolysines neutres

	Réaction	Témoin
Mélange réactionnel	2 gttes sérum non acidifié + 2gttes sérum AB frais + 1 gttes OI (+) à 5 %	2 gttes sérum non acidifié + 2 gttes sérum AB décomplémenté
Résultat	Hémolyse	Absence
	- Incuber et lire après 2 h	- 1 goutte de GR OI + à 5 % - 2 H d'incubation

Recherche des hémolysines acides

	Réaction	Témoin
Mélange réactionnel	- 2 gttes de sérum acidifié - 2 gttes de sérum ABF acidifié - 1 gtte de la suspension de GR OI + à 5% - Incuber et lire après 2 H	- 2 gttes de sérum acidifié - 2 gttes de sérum AB décomplémenté et acidifié - 1 gtte de la suspension de GR OI + à 5 % - 2 H d'incubation
Résultat	Hémolyse	Absence d'hémolyse

ANNEXE IV

Test de Donath-Landsteiner

La première application de ce test, dans le diagnostic différentiel de l'hémolyse immune est hémoglobinurie paroxysmal à frigore. En particulier, cette procédure doit être considérée chaque fois que :

L'auto-Ac froid est absent au niveau du sérum, seul le C3d est présent au niveau des hématies. L'éluat est non réactif et le patient présente une hémoglobinémie ou une hémoglobinurie ou les deux.

Matériels

- 1) Le sérum à tester, séparé à partir d'un échantillon de sang frais, maintenu à 37°
- 2) Le sérum AB collecté fraîchement constitue une source de complément
- 3) GR OP + (P1 ou P2) lavés et mis en suspension dans E ϕ à 20 %.

Méthodes

- 1) Numéroté 3 séries de tube à hémolyse comme suit : A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3
- 2) Dans le tube N°1 et 2 de chaque série, ajouter 10 gouttes de sérum du patient
- 3) Dans le tube 2 et 3 de chaque série, ajouter 10 gouttes de sérum AB frais
- 4) A tous les tubes, ajouter 1 goutte de GR à 20 % OP +
- 5) Placer les 3 tubes de la série A, dans de la glace pilée pendant 30 mn puis à 37°C pendant 1h
- 6) Placer les 3 tubes de la série « B » dans la glace et les laisser pendant 90 mn
- 7) Placer les tubes de la série « C » à 37°C et les laisser à 37°C pendant 90 mn
- 8) Centrifuger l'ensemble des tubes, et examiner l'hémolyse dans le surnageant.

NB : Pour réduire les pertes de l'auto-Ac par l'auto adsorption avant le test, le sang du patient doit être incubé à 37°C pendant 30 mn et la séparation du sérum doit être fait à 37°C.

Interprétation

Le test de Donath-Landsteiner, est considéré comme positif, lorsque le sérum du patient, avec ou sans addition de complément cause l'hémolyse seulement dans les tubes, qui ont été incubées au départ dans la glace et par la suite à 37°C.

L'hémolyse ne doit pas être observée dans les tubes, incubé à 37°C et dans la glace uniquement.

V - Procédure d'étude des auto-anticorps anti-érythrocytaires

1 - Test de Coombs Direct

- Antiglobuline polyvalente
- Antiglobuline anti C3d
- Antiglobuline anti IgG

2 - Etude du Sérum

- 1 - RAI = +4° + auto
= +22° + auto
= +37° + auto
- 2 - Détermination de l'optimum thermique (Annexe II)
- 3 - Détermination du titre
- 4 - Destruction DTT + TCD → nature immunologie
- 5 - Etude des spécificités
 - Auto froids
 - Auto chauds
- 6 - Recherche de l'association allo-auto anticorps
 - Auto de type IgM → Destruction DTT = RAI
 - Auto de type IgG → Auto adsorption sur les hématies du malade papainées.
- 7 - Pouvoir hémolysant
 - TCD C3d (+)
 - * Agglutinines froides → Recherche d'hémolysines acide
 - TCD (+) de type C3d ou mixte
 - * Auto de type IgM et actif à 37°C
 - * Recherche d'Ac dans le sérum faiblement positive ou négative → Hémolysine neutre
 - TCD (+) de type C3d ou mixte
 - * RAI à 37° négatif ou faiblement positif
 - * Enfant → Hémolysine biphasique
 - * Stigmates d'hémolyses

3 - Epreuve Elution

- Eluat = RAI
- Etude des caractéristiques de l'auto Ac
- Comparaison avec le résultat du sérum.

IMMUNOLOGIE LEUCO- PLAQUETTAIRE

SEPARATION DES LYMPHOCYTES TOTAUX SUR FICOLL

I - Prélèvement

1 - Anticoagulants

- ACD ou CPD (1 V / 9 V)

Les cellules doivent être isolées le jour du prélèvement ou dans un délai maximum de 3 jours pour les lymphocytes T et dans 24 h pour les lymphocytes B.

- Héparine de Na : Les cellules doivent être isolées le jour du prélèvement
- Héparine de Lithium et EDTA : non recommandés

2 - Conditions de conservation du prélèvement

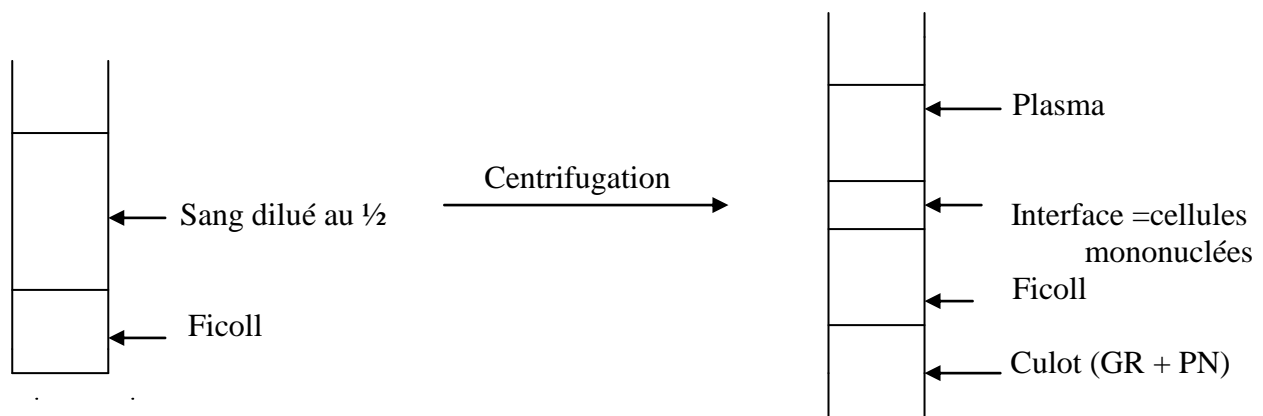
Le prélèvement de sang doit être conservé horizontal, à 22°C (il ne faut pas réfrigérer)

II - Isolement des lymphocytes

L'isolement des lymphocytes comporte plusieurs étapes :

- Diluer le sang au ½ avec du PBS
- Déposer le sang dilué sur le mélange Ficoll-Metrizoate ($d = 1,077$) par manipulation douce (veiller à ne pas mélanger les 2 phases)
- Centrifuger 20 mn à 800 g

Au cours de cette centrifugation, un gradient de densité est créé. Toutes les cellules qui ont une densité $>$ à 1,077 (GR et polynuclées) vont pénétrer le gradient de Ficoll alors que les lymphocytes et les monocytes vont rester à la surface du Ficoll puisque leur densité est égale à 1,077.



- Aspirer la couche interfaciale à l'aide d'une pipette Pasteur

- Faire un premier lavage en PBS pendant 10 mn à 400 g
Rejeter le surnageant, essuyer les plaquettes ayant adhéré aux parois
- Faire un 2^{ème} lavage en PBS pendant 10 mn à 160 g
Rejeter le surnageant
- Reprendre le culot lymphocytaire par un volume minimal de PBS (100 µl par exemple)
- Numérer la suspension lymphocytaire (SL) en la diluant au 1/10^{ème} dans le lazarus (90 µl Lazarus + 10 µl SL)
- Ajuster la SL à 3.10⁶ lymphocytes / ml en PBS
- La suspension fraîchement isolée est prête pour le typage.

Préparation du ficoll

- **Ficoll 400 : Solution à 9 %**

90 g de Ficoll / 1 l ED

La déssolution se fait sur agitateur à + 4°C

- **Métrizoate**

Solution à 32,8 % (1,2 g / ml)

- **Ficoll-Métrizoate**

Ficoll.....73 ml

Métrizoate27 ml

La densité est mesurée par un densitomètre dans une éprouvette. Cette densité doit être de 1,077 (1,076 – 1,078)

Le mélange se conserve à 4°C pendant 2 à 3 semaines.

Remarque : Avant chaque usage du Ficoll, il faut réajuster la densité.

ISOLEMENT DES LYMPHOCYTES T PAR SEPARATION IMMUNOMAGNETIQUE

Applications

Méthode simple d'isolement des lymphocytes T pour le typage HLA Classe I.

Principe

Les billes immuno magnétiques sont des particules paramagnétiques couplées à des anticorps monoclonaux spécifiques. La spécificité de l'anticorps monoclonal définit le type de cellules isolées qui peuvent être ensuite collectées à l'aide d'un séparateur magnétique.

En l'absence de champ magnétique, les billes en suspension ne présentent aucun résidu magnétique. Elles peuvent être ainsi indéfiniment magnétisées ou en dispersion.

Description

Les FluoroBeads-T sont des billes immunomagnétiques de diamètre inférieur à 1 micron.

Les anticorps monoclonaux anti-CD2 couplés à leur surface sont spécifiques des récepteurs E des lymphocytes T. Les FluoroBeads-T permettent sur le sang total un isolement rapide du complexe billes-lymphocytes T à l'aide d'un séparateur magnétique. Cette méthode n'exige aucune incubation au froid, agitation ou centrifugation.

Conservation

Les FuloroBeads-T doivent être conservées à + 4°C et utilisées avant leur date de péremption.

Ne pas congeler.

Matériel

A - Matériel fourni

- 1- FluoroBeads T
- 2- Méthode d'isolement cellulaire et instructions pour le test
- 3 - Solution « T Developer » (solution Mère 10x)

B – Matériel nécessaire (non fourni)

- 1- Tube de verre ou plastique de 5 ml
- 2- Tampon PBS déficient en sels Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺
- 3- Milieu McCoy's + 5 % SVF inactivé
- 4- Séparateur magnétique (one Lambda ou équivalent)
- 5-Pipettes
- 6- Plaques de typage HLA Classe I

C – Prélèvement de l'échantillon

- Prélever environ 2 ml de sang total pour un rendement d'environ $1 - 2 \times 10^6$ cellules. L'anticoagulant de choix est l'ACD ou le CPD, l'héparine de sodium peut être utilisé.
- Ne pas utiliser l'héparine Lithium ou l'EDTA
Les cellules T doivent être isolées dans les 24 heures pour obtenir un rendement optimum, cependant l'isolement peut être effectué sur un prélèvement de 3 jours
- Conserver le prélèvement sanguin à 22-25°C (tube horizontal).

Méthode

Isolement des LT du Sang Total

1. Répartir 2 ml de sang total dans un tube de 5 ml
2. Resuspendre très soigneusement les FluoroBeads-T avant l'emploi.
Vortexer environ 10 secondes.
3. Ajouter 50 µl de FluoroBeads-T
Boucher immédiatement le tube et mélanger 2-3 fois par retournement.
4. Agiter pendant 3 minutes à 22-25°C (ne pas dépasser 4 minutes)
Utiliser un appareil rotatif ou agiter par retournement
5. Ajouter 2 ml de Solution de Travail « T Developer ». Mélanger par retournement 2-3 fois.
Cette étape est essentielle.
6. Déboucher et placer le tube sur l'aimant pendant 3 minutes
7. Rejeter le surnageant à l'aide d'une pipette, puis retirer le tube de l'aimant
8. Laver les cellules avec 1-2 ml de PBS. Resuspendre doucement les billes et replacer le tube sur l'aimant pendant 1 minute. Rejeter le surnageant et laver encore 2 fois.

REACTION DE MICROLYMPHOCYTO-TOXICITE

Principe

- La technique est une adaptation de celle de TERASAKI
- La réaction a lieu en plusieurs temps

On met en présence l'anticorps spécifique (sérum du sujet immunisé anti – HLA) et l'Ag (Lymphocytes à grouper)

On rajoute du complément du lapin

- Si les lymphocytes portent l'Ag HLA reconnu par le sérum, la réaction de lyse cellulaire a lieu ⇒ Cellules mortes
- Si les lymphocytes ne portent pas l'Ag HLA reconnu par le sérum, la réaction de lyse cellulaire n'a pas lieu ⇒ Cellules vivantes

Révélation différentielle des cellules mortes et des cellules vivantes à l'aide d'un bicolore.

- Le groupage CI I s'effectue sur les lymphocytes totaux ou lymphocytes T
- Le groupage CI II s'effectue uniquement sur les lymphocytes B.

Méthode

A - Réactifs

1 - Les sérums – tests

Ils proviennent généralement de multipares ou de polytransfusés. Ils sont testés sur un panel de donneurs typés et sont sélectionnés pour les critères suivants :

- être les plus monospécifiques que possible
- être reproductibles

Les sérums dont la spécificité a été identifiée, sont distribués en aliquots et conservés à – 30°C.

Les sérums – tests sont répartis dans des plaques de Terasaki préalablement enduites d'huile minérale. (5 µl). 1 µl de sérum est délivré dans chaque puit à l'aide d'un répartiteur automatique.

Les plaques sont soigneusement fermées et conservées à – 30°C.

Remarques

- Pour caractériser chaque antigène, il est nécessaire d'utiliser au moins deux ou mieux 3 Sérums « Spécifiques »
- Le plus grand soin doit être apporté à la préparation des sérums
 - Les dilutions doivent être faites en sérum AB non cytotoxique
 - Les sérums troubles doivent être centrifugés avant emploi

- Les produits de plasmaphérèse doivent être convenablement recalifiés

2 - La suspension Cellulaire

La suspension cellulaire doit être ajustée de façon à avoir 3×10^6 cellules / ml

3 - Le complément

Il est apporté par du sérum de lapin stocké à -80°C . Chaque échantillon de complément n'est décongelé qu'une seule fois au moment de l'emploi.

Avant utilisation, chaque lot de complément est testé sur des plaques de sérums anti – HLA connus comparativement à un lot de référence.

4 - CFDA / EB (IP) et Réactif d'extinction

B - Typage

- Utiliser des lymphocytes ajustés à 3×10^6 / ml. (3×10^3 / mm^3)
- Décongeler des plaques de TERASAKI contenant des anti – sérums
- Dans chaque puit, où se présente un sérum, mettre 1 μl de la suspension lymphocytaire avec la micro-seringue (ou répartiteur automatique)
- Incuber la plaque à T° ambiante pendant 30 mn
- Rajouter 5 μl de complément de lapin décongelé au moment de l'emploi et incuber à 25°C pendant 1 heure ou 1h 30 selon les lots de complément

C - Lecture de la lyse cellulaire

a - Coloration avec éosine formol

- Ajouter 4 μl d'éosine filtrée, laisser en contact 10 mn
- Ajouter 6 μl de formol à PH = 7,2 filtré
- Laisser en contact 10 mn

Les cellules lysées prennent le colorant (apparaissent noires et gonflées). Les cellules vivantes sont réfringentes .

Lire au microscope inversé et attribuer à chaque puit un score

Les scores sont fonction du pourcentage de cellules tuées :

Score 1	= 0 à 10 % de cellules mortes		
Score 2	= 11 à 20 %	«	«
Score 4	= 20 à 50 %	«	«
Score 6	= 50 à 80 %	«	«
Score 8	= 80 à 100 %	«	«
Score 0	= illisible ou pas de cellules		

Les plaques colorées peuvent être conservées à + 4°C pendant 3 jours.

b - Lecture en double Fluorescence (CFDA et iodide de propidium)

Les cellules vivantes sont vertes et les cellules mortes sont rouges.

D - Interprétation

L'interprétation se fait grâce à un plan de batterie indiquant la localisation et la spécificité des sérums anti – HLA.

ISOLEMENT DES LYMPHOCYTES B PAR SEPARATION IMMUNO-MAGNETIQUE ET MARQUAGE DES CELLULES

Application

Il s'agit d'une méthode simple d'isolement des lymphocytes B pour le typage HLA CI II .

Principe

Les billes immunomagnétiques sont des particules paramagnétiques couplées à des anticorps monoclonaux spécifiques (anti-CD19) des lymphocytes B. Les lymphocytes B viennent se fixer aux billes magnétiques et sont récupérés rapidement à l'aide d'un séparateur magnétique.

En l'absence de champ magnétique, les billes en suspension ne présentent aucun résidu magnétique et peuvent alors rester indéfiniment en dispersion.

Les lymphocytes B sont utilisés pour le typage DR.

Prélèvement

- L'anticoagulant de choix est l'ACD ou le CPD
- L'héparinate de Na peut être utilisé
- Ne pas utiliser l'héparinate de lithium ou EDTA

Les cellules doivent être isolées de préférence dans les 24h pour avoir un rendement optimum, cependant l'isolement peut être effectué sur un prélèvement de 24 h.

Le prélèvement doit être conservé à 22°C en tube horizontal.

Matériel

- Séparateur magnétique
- Microscope inversé U.V

Réactifs

- Billes magnétiques couplées à l'anti - CD 19
- PBS + citrate de Na 0,6 %
- PBS.

Technique

1 - Séparation des cellules B

- Dans un tube de 12 ml travailler avec 5 ml de sang total dilué dans 5 ml de PBS citraté
- On peut travailler aussi sur 1 ml de Buffy coat (10 ml de sang ACD) + 4 ml de PBS citraté)
- Ajouter 70 µl de billes magnétique (mettre en suspension avant utilisation)

- Agiter doucement pendant 3 mn
- Placer le tube sur séparateur magnétique pendant 3 mn
- Aspirer le surnageant
- Laver la suspension avec 4 ml de PBS
- Placer sur le séparateur magnétique pendant 1 mn
- Répéter les lavages pendant 4 fois.

4 - Typage DR

- Déposer 1 μ l de suspension B dans chaque puit d'une plaque pour typage DR (ne pas remplir jusqu'en haut la seringue Hamilton car les billes se déposent très vite)
- Laisser incuber 30 mn à 22°C
- Ajouter 5 μ l de complément
- Incuber 1 h à 22°C (suivant le lot de complément)
- Ajouter 5 μ l de fluoroquem (CFDA + Iodide de propodium + encre de chine)
- Lire en U V.

CONGELATION DES LYMPHOCYTES

Préparation des Lymphocytes

- Cellules isolées par la technique de Ficoll Triosil
- Les resuspendre dans du sérum (ou plasma) autologue (à défaut dans du sérum AB décomplémenté et dilué au ¼ en eau physiologique)

Congélation de Lymphocytes B isolés :

Resuspendre en Hanks + 10 % sérum veau foetal

- Ajuster entre 3000 et 15000 lymphocytes / mm³
- Placer la suspension à 4°C.

(Le DMSO étant très avide d'eau, aspire l'eau des cellules, ce qui permet leur congélation sans dommage, mais ceci avec dégagement de chaleur d'où au préalable, nécessité de refroidir les réactifs et les cellules).

Préparation du Matériel

- Incrire la congélation dans le registre
- Numéroter les paillettes
- Préparer de la poudre pour obturer
- Brancher l'aspiration
- Prévoir de l'eau dans un bécher ainsi que quelques papiers d'essuyage

Mise en Paillettes

- Ajouter aux lymphocytes à 4°C un volume égal de DMSO à 20 % en PBS (également à 4°C) goutte à goutte en agitant. On doit ensuite procéder le plus rapidement possible
- Aspirer la suspension dans les paillettes, secouer légèrement les paillettes pour faire entrer une bulle d'air, les boucher au moyen d'une poudre de couleur qui obture ensuite la paillette au contact de l'eau du bécher, les disposer, poudre en haut sur une plaque contenant des alvéoles.
- Placer la plaque dans une boîte de carton et mettre le tout à – 80°C pendant une douzaine d'heures environ . (la prise de froid doit être très progressive d'où la boîte en carton).
- Le lendemain, disposer les paillettes dans l'azote.

DECONGELATION DES CELLULES

I – Décongélation des Paillettes

Préparer :

- Un bain marie contenant de l'eau à 37°C
- Un tube conique par paillette
- Du plasma gel dilué au ½ en PBS et placé à température ambiante ou bien du SAB à 10 % minimum (20 % si l'on peut) en PBS
- Une paire de ciseaux et un papier d'essuyage
- Repérer le cylindre, l'hexagone, la paillette à décongeler
- Dès la sortie de l'azote, plonger pendant 30" la paillette dans l'eau à 37°C, puis l'essuyer et sectionner l'extrémité contenant la poudre
- Plonger cette extrémité dans le tube conique puis couper l'autre extrémité de manière à ce que la paillette se vide dans le tube
- Rajouter alors rapidement 2 ml de plasmagel dilué. Mélanger. (Dans le cas où l'on décongèle plusieurs paillettes de même donneur, on peut en mettre deux par tube conique et ajouter alors 4 ml de plasmagel dilué)
- Placer au bain marie à 37°C au moins 5 minutes, mieux : 30 minutes*
- Centrifuger alors 6 mn à 1500 tours / mn
- Jeter le surnageant . Bien égoutter le tube puis rajouter sans attendre quelques gouttes de HANKS selon la concentration désirée
- Remettre en suspension, numérer et ajuster à la concentration voulue
- Vérifier éventuellement le pourcentage de cellules mortes. La suspension est à utiliser aussitôt
- Les cellules ayant perdu leur eau lors de la congélation, elles ont perdu du volume. Les protéines du plasmagel (bovines) ou du SAB (humaines) pénètrent dans la cellule. Le DMSO s'évapore car il est très volatil.

Mais cette opération fragilise les cellules, et l'on a intérêt à attendre avant de les soumettre à la centrifugation .

Le passage à 37°C a pour effet de leur donner le temps de reprendre leur taille et leurs fonctions.

LA RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI-HLA PAR LYMPHOCYTOTOXICITE

Principe

La recherche, par réaction de lymphocytotoxicité (LCT) dépendante du complément, des éventuels anticorps (Ac) anti-HLA présents dans le sérum s'effectue en étudiant la réactivité du sérum vis-à-vis d'un échantillonnage (panel) d'au moins 30 variétés de cellules porteuses d'antigènes (Ag) HLA connus, en présence de complément de lapin.

Si des Ac anti-HLA sont présents dans le sérum, ils reconnaissent les déterminants antigéniques (Ag) HLA spécifiques présents à la membrane des cellules cibles, la séquence du complément est activée au site de la réaction antigène-anticorps, une lésion de la membrane est induite par les composants terminaux du complément et les cellules cibles sont alors lysées, la lyse est mise en évidence par un colorant (éosine Y) ajouté en fin de réaction : le colorant, normalement exclu des cellules vivantes, marque les cellules mortes, la proportion de cellules vivantes et mortes est évaluée à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase.

Cet examen se déroule le plus souvent en 2 temps :

- 1) un temps de dépistage (screening)**, au terme duquel la réponse donnée est : absence ou présence d'Ac anti-HLA de classe I, ou de classe II (mention de la largeur de l'immunisation)
- 2) et un temps d'identification** des Ac (détectés lors du dépistage), au terme duquel les spécificités d'Ac sont données (si elles ont pu être identifiées).

Chez les patients en attente de transplantation, la recherche des Ac est réalisée en présence ou non de DTT. Le DTT a la propriété de détruire les immunoglobulines IgM et permet ainsi de différencier les Ac IgM des Ac IgG.

- POSITIF avec et sans DTT = IgG
- POSITIF sans DTT, NEGATIF avec DTT = IgM
- NEGATIF sans DTT, POSITIF avec DTT = Possibilité d'Ac IgM idiotypiques qui bloquent les Ac IgG

On peut donc distinguer :

- les Ac anti-HLA de classe I et ceux de classe II (selon le panel utilisé)
- les Ac de type IgG et ceux de type IgM (avec le test au DTT).

Les Différents Types d'Anticorps

Ils sont à l'origine de la définition des spécificités antigéniques HLA. Il existe 3 types d'Ac anti-HLA :

- les Ac naturels
- les Ac immuns
- les Ac monoclonaux obtenus grâce à la technique des hybridomes (Kohler et Milstein, 1975)

1) Les Ac naturels (Tongio et coll.1985)

- Présents dans le sérum de sujets jamais immunisés
- Ils sont rares (1 %)
- Souvent plus faibles que les Ac immuns de type IgM
- Spécificités décrites : anti-A2 (Lepage et coll. 1976), B8 (Collins et coll.1973)

2) Les Ac immuns

Ils sont la conséquence d'immunisations induites (greffes cutanées, injections de leucocytes,...) ou non induites : c'est le cas habituel et l'on retrouve l'une et / ou l'autre des trois causes d'immunisations dans l'espèce humaine, à savoir :

- La grossesse
- La transfusion
- La transplantation

Immunsation Anti-HLA Fœto-maternelle

Fréquence

Environ 10 % des femmes au cours de la première grossesse

Un tiers lors des grossesses suivantes

Cause

Passage de cellules fœtales dans la circulation maternelle

Moment

Dès la 16^{ème} semaine de grossesse, souvent vers les 6^{ème}, 8^{ème} mois

Spécificités

Les allo-antigènes paternels du fœtus, avec ou non des réactions croisées

La recherche des Ac anti-HLA devrait idéalement être faite en utilisant comme cibles les lymphocytes du nouveau-né et / ou du père. Pratiquement cette recherche est faite sur un panel.

Conséquences

- Aucun effet néfaste
- Bon réactif de typage, le plus souvent

On estime le rendement d'une telle recherche à environ 3 % de sérums tests de qualité à partir des sérums tout venant récoltés dans les maternités. Les réactifs de classe II sont plus rares que ceux de classe I.

Le dépistage de ces anticorps peut se faire à grande distance de l'accouchement, en testant systématiquement toutes les donneuses de sang multipares : moins de 10 % des sérums testés s'avèrent positifs, en revanche la stabilité de la spécificité observée et les quantités de sérum récupérées en font une source de réactifs privilégiée.

Immunisation Anti-HLA Post-Transfusionnelle

Fréquence

Fonction du nombre d'unités de sang transfusées, du rythme et du type de sang

Symptomatologie

- Réactions fébriles : frissons, hyperthermie
- Syndrome de détresse respiratoire aiguë
- Inefficacité transfusionnelle (pour les transfusions plaquettaires)

Spécificités

Larges

Prévention

- Choix du produit : déleucocyté
- Choix du donneur pour les transfusions plaquettaires.

Immunisation anti-HLA Post-Transplantation

Spécificités

- Antigène du greffon
- Avec ou non réactions croisées
- Souvent très larges en raison :
 - des transfusions antérieures
 - des éventuelles grossesses antérieures

Conséquences

- Il s'agit d'un sujet bon répondeur
- Nécessité d'une bonne compatibilité HLA entre donneur et receveur
- Nécessité d'un greffon dépourvu des antigènes vis-à-vis desquels le sujet s'est immunisé
- Epreuve de compatibilité : négative

3) Les Ac monoclonaux

Ils proviennent d'une xéno-immunisation (souris anti-homme). Ils sont généralement produits chez une souris immunisée par des cellules humaines ou des molécules HLA plus ou moins purifiées.

Les anticorps produits peuvent être :

- Des Ac monoclonaux monomorphes

Ce sont des Ac isotypiques reconnaissant un épitope donné chez tous les individus d'une même espèce (exemples : anti-DR, anti-beta2 microglobulaire, anti-chaîne lourde des molécules de classe I,...). Ces Ac sont utilisés principalement pour les études biochimiques.

- Des Ac monoclonaux polymorphes

Ce sont des Ac allotypiques, reconnaissant une structure génétiquement variable au niveau de la molécule, ils peuvent être monospécifiques (reconnaissant un épitope unique pour un allèle donné) : ils peuvent alors être utilisés pour la détermination sérologique des antigènes HLA (exemples : A2, A3, B13, DQ1,...), ou reconnaissant un épitope partagé par plusieurs allèles, confirmant les réactions croisées anciennement décrites ou reconnaissant des associations de spécificités connues (exemple : A2+A28, B27+B7, A2+B17,...).

Les Cellules Cibles

1) Source

- a) Source habituelle : sang périphérique
 - Cellules mononucléées du sang périphérique
 - Suspensions cellulaires enrichies en lymphocytes T ou en lymphocytes B
- b) Autres sources
 - Ganglions, rate, lignées

2) Etat des cellules

- Cellules fraîches
- Cellules congelées / décongelées

La conservation des cellules cibles par congélation est souhaitable, voire nécessaire. Elle permet de disposer en permanence de cellules de référence (panel). Les lymphocytes sont congelés en présence de 10 % de diméthyl-sulfoxyde (DMSO) et de 20 à 90 % de sérum. Les suspensions lymphocytaires sont mises en ampoules ou en paillettes dans une boîte de polystyrène qui est placée dans un congélateur à - 80°C. Après 24 heures, les ampoules ou les paillettes sont transférées dans l'azote liquide (-196°).

La décongélation est faite par réchauffement rapide de la suspension à 37°C et dilution rapide du DMSO, Après lavage, les cellules sont utilisables pour les tests sérologiques.

Composition du Panel

Le phénotype HLA des donneurs dont les cellules sont utilisées doit être établi avec rigueur et archivé. A mon sens, ceci veut dire que :

- Le phénotype est établi deux fois sur deux prélèvements différents .

- Tout antigène blanc en sérologie doit être contrôlé par une technique de biologie moléculaire

1) Panel de dépistage

Règles générales

- Taille du panel (transplantation d'organes) : au moins 30 donneurs
- Respecter la fréquence des antigènes HLA dans la population locale : Noter pour chaque panel le nombre de fois où chaque antigène est représenté, établir la fréquence de représentation de chaque Ag et la comparer à la fréquence dans la population locale.
- Composition semblable d'un test à l'autre.

2) Panel d'identification

Panel de classe I

- Davantage de cellules présentant des antigènes de faible fréquence (exemple : B45, B58, B63,...)
- Donneurs ayant des origines géographiques diversifiées pour avoir des Ag peu représentés dans la population locale (A34, B75,...)
- Associations d'antigènes peu habituelles pour une bonne discrimination des spécificités

Panel de classe II

- Davantage de cellules présentant des antigènes de faible fréquence (exemple : DR16, DR18, DR14, DR9,...)
- Donneurs ayant des origines géographiques diversifiées pour avoir des associations DR-DQ peu habituelles, pour une bonne discrimination des spécificités DR et DQ.

Le problème majeur de l'identification des anticorps anti-HLA de classe II est que les spécificités dépendantes d'un locus vont apparaître super typiques pour celles d'un autre locus, sauf si l'on inclut des cellules d'individus présentant des associations haplotypiques rares.

Ainsi :

- DR3+DR5+DR8+DR6 et DR52
- DR4+DR7+DR9 et DR53
- DR1+DR2+DR6+DR10 et DQ1
- etc...

Les Serums à tester

- Obtenus à partir de prélèvements de sang total sur tube sec
- Non dilués pour le dépistage
- Eventuellement dilués pour l'étude des spécificités chez un sujet hyperimmunisé (> 80 %⁻)
- Eviter les congélations / décongélations successives qui peuvent altérer la réactivité du sérum.

Réaction de lymphocytotoxicité

Etapes

- 1) Disposition des sérums
- 2) Préparation des cellules cibles
- 3) Incubation Ag-Ac
- 4) Ajout du complément
- 5) Détection de la réaction par ajout d'un colorant.

Lecture

Au microscope inversé, en contraste de phase, la proportion de cellules mortes et vivantes est évaluée.

- T (-) = sérum AB dont la recherche d'anticorps anti-HLA est négative
- T (+) = pool de sérums dont la recherche d'anticorps anti-HLA est positive (sérums polyspécifiques).

Les réactions sont notées en fonction du pourcentage de cellules mortes :

+ ou score de 2 (< 20 %) ++ ou score de 4 (20 à 50 %) +++ ou score de 6 (50 à 75 %)
++++ ou score de 8 (75 à 100 %).

Etude de la spécificité des anticorps

L'analyse des résultats, à l'aide d'un programme informatique le plus souvent, consiste à mesurer la corrélation existant entre un sérum et un antigène donné.

Les spécificités sont établies après étude vis-à-vis d'un panel de 50 à 100 individus parfaitement typés dans le système HLA. L'assignation des spécificités s'effectue couramment par une méthode itérative recherchant successivement les différents types d'Ac présents dans un sérum : on calcule pour chacun des n antigènes présents sur le panel de cellules tests, le coefficient de corrélation (r) avec le sérum.

CROSS – MATCH LYMPHOCYTAIRE

Le cross match lymphocytaire est une épreuve de compatibilité réalisée entre le sérum du receveur du greffon et les lymphocytes totaux (L.T) du donneur de celui ci.

Sérum utilisé

Le cross match doit être réalisé avec le sérum du jour ou au moins avec le sérum le plus récent.

Témoins

- Témoin négatif : Sérum AB
- Témoin positif : Sérum testé poly spécifique pour les Ac anti-HLA ou sérum anti-lymphocytaire

Suspension lymphocytaire

- Séparer les L.T du donneur
 - Soit par la méthode utilisant le gradient Ficoll
 - Soit par la méthode utilisant les billes immuno magnétiques
- Ajuster la suspension lymphocytaire à 3×10^6 cellules par μl

Technique

- Huiler la plaque Terasaki (5 μl d'huile minérale par puit)
- Distribuer à l'aide de la seringue Hamilton 1 μl du témoin négatif, 1 μl du témoin positif, 1 μl du sérum dilué au 1/2, 1 μl du sérum pur et 2 μl du sérum pur.
- Distribuer 1 μl de la suspension lymphocytaire préparée dans tous les puits
- Laisser incuber pendant 30 mn à 22°C
- Décongeler le complément de lapin 10 mn avant la fin de l'incubation
- Distribuer 5 μl de complément par puit
- Laisser incuber pendant 60 à 90 mn à 22°C
(en fonction de la réactivité du complément)
- Révéler la réaction par un bicolorant (CFDA/BET)
- Lire au microscope à fluorescence.