



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

Année 2023

Thèse N° 238

Guide des analyses biologiques en hématologie

THÈSE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 07 /07 /2023

PAR

Mr. **Ayoub ANTIFI**

Né le 22 Novembre 1995 à khénifra

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MÉDECINE

MOTS-CLÉS

Hématologie biologique – Guide – Étudiant – Résident

JURY

Mr.	M. CHAKOUR	PRESIDENT
	Professeur d'Hématologie Biologique	
Mr.	M. AIT AMEUR	RAPPORTEUR
	Professeur d'Hématologie Biologique	
Mme.	S. SAYAGH	JUGE
	Professeur d'Hématologie	

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

رَبِّ أَوْزَعْنِي أَنْ أَشْكُرَ نِعْمَتَكَ الَّتِي أَنْعَمْتَ
عَلَيَّ وَعَلَى وَالِدِيَّ وَأَنْ أَعْمَلَ صَالِحاً
تَرْضَاهُ وَأُوخِّلَنِي بِرَحْمَتِكَ فِي عِبَادِكَ الصَّالِحِينَ.

صدق الله العظيم

سورة النمل الآية 19



Serment d'hippocrate

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

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

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

Je ne trahirai pas les secrets qui me seront confiés.

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

Les médecins seront mes frères.

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

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

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

Je m'y engage librement et sur mon honneur.

Déclaration Genève, 1948



*LISTE DES
PROFESSEURS*



UNIVERSITE CADI AYYAD
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE MARRAKECH

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

ADMINISTRATION

Doyen : Pr. Mohammed BOUSKRAOUI
Vice doyen à la Recherche et la Coopération : Pr. Mohamed AMINE
Vice doyen aux Affaires Pédagogiques : Pr. Redouane EL FEZZAZI
Vice doyen chargé de la Pharmacie : Pr. Said ZOUHAIR
Secrétaire Générale : Mr. Azzeddine EL HOUDAIGUI

LISTE NOMINATIVE DU PERSONNEL ENSEIGNANTS CHERCHEURS PERMANANT

N°	Nom et Prénom	Cadre	Spécialité
01	BOUSKRAOUI Mohammed (Doyen)	P.E.S	Pédiatrie
02	CHOULLI Mohamed Khaled	P.E.S	Neuro pharmacologie
03	KHATOURI Ali	P.E.S	Cardiologie
04	NIAMANE Radouane	P.E.S	Rhumatologie
05	AIT BENALI Said	P.E.S	Neurochirurgie
06	KRATI Khadija	P.E.S	Gastro-entérologie
07	SOUMMANI Abderraouf	P.E.S	Gynécologie-obstétrique
08	RAJI Abdelaziz	P.E.S	Oto-rhino-laryngologie
09	KISSANI Najib	P.E.S	Neurologie
10	SARF Ismail	P.E.S	Urologie
11	MOUTAOUAKIL Abdeljalil	P.E.S	Ophtalmologie
12	AMAL Said	P.E.S	Dermatologie

13	ESSAADOUNI Lamiaa	P.E.S	Médecine interne
14	MANSOURI Nadia	P.E.S	Stomatologie et chirurgie maxillo faciale
15	MOUTAJ Redouane	P.E.S	Parasitologie
16	AMMAR Haddou	P.E.S	Oto-rhino-laryngologie
17	ZOUHAIR Said	P.E.S	Microbiologie
18	CHAKOUR Mohammed	P.E.S	Hématologie biologique
19	EL FEZZAZI Redouane	P.E.S	Chirurgie pédiatrique
20	YOUNOUS Said	P.E.S	Anesthésie-réanimation
21	BENELKHAIAT BENOMAR Ridouan	P.E.S	Chirurgie générale
22	ASMOUKI Hamid	P.E.S	Gynécologie-obstétrique
23	BOUMZEBRA Drissi	P.E.S	Chirurgie Cardio-vasculaire
24	CHELLAK Saliha	P.E.S	Biochimie-chimie
25	SAMKAOUI Mohamed Abdenasser	P.E.S	Anesthésie-réanimation
26	LOUZI Abdelouahed	P.E.S	Chirurgie-générale
27	AIT-SAB Imane	P.E.S	Pédiatrie
28	GHANNANE Houssine	P.E.S	Neurochirurgie
29	ABOULFALAH Abderrahim	P.E.S	Gynécologie-obstétrique
30	OULAD SAIAD Mohamed	P.E.S	Chirurgie pédiatrique
31	DAHAMI Zakaria	P.E.S	Urologie
32	EL HATTAOUI Mustapha	P.E.S	Cardiologie
33	ELFIKRI Abdelghani	P.E.S	Radiologie
34	KAMILI El Ouafi El Aouni	P.E.S	Chirurgie pédiatrique
35	MAOULAININE Fadl mrabih rabou	P.E.S	Pédiatrie (Néonatalogie)
36	MATRANE Aboubakr	P.E.S	Médecine nucléaire
37	AIT AMEUR Mustapha	P.E.S	Hématologie biologique
38	AMINE Mohamed	P.E.S	Epidémiologie clinique
39	EL ADIB Ahmed Rhassane	P.E.S	Anesthésie-réanimation
40	MANOUDI Fatiha	P.E.S	Psychiatrie
41	CHERIF IDRISSE EL GANOUNI Najat	P.E.S	Radiologie
42	BOURROUS Monir	P.E.S	Pédiatrie
43	ADMOU Brahim	P.E.S	Immunologie
44	TASSI Noura	P.E.S	Maladies infectieuses

45	NEJMI Hicham	P.E.S	Anesthésie-réanimation
46	LAOUAD Inass	P.E.S	Néphrologie
47	EL HOUDZI Jamila	P.E.S	Pédiatrie
48	FOURAJI Karima	P.E.S	Chirurgie pédiatrique
49	ARSALANE Lamiae	P.E.S	Microbiologie-virologie
50	BOUKHIRA Abderrahman	P.E.S	Biochimie-chimie
51	KHALLOUKI Mohammed	P.E.S	Anesthésie-réanimation
52	BSISS Mohammed Aziz	P.E.S	Biophysique
53	EL OMRANI Abdelhamid	P.E.S	Radiothérapie
54	SORAA Nabila	P.E.S	Microbiologie-virologie
55	KHOUCANI Mouna	P.E.S	Radiothérapie
56	JALAL Hicham	P.E.S	Radiologie
57	OUALI IDRISSE Mariem	P.E.S	Radiologie
58	ZAHLANE Mouna	P.E.S	Médecine interne
59	BENJILALI Laila	P.E.S	Médecine interne
60	NARJIS Youssef	P.E.S	Chirurgie générale
61	RABBANI Khalid	P.E.S	Chirurgie générale
62	HAJJI Ibtissam	P.E.S	Ophthalmologie
63	EL ANSARI Nawal	P.E.S	Endocrinologie et maladies métabolique
64	ABOU EL HASSAN Taoufik	P.E.S	Anesthésie-réanimation
65	SAMLANI Zouhour	P.E.S	Gastro-entérologie
66	LAGHMARI Mehdi	P.E.S	Neurochirurgie
67	ABOUSSAIR Nisrine	P.E.S	Génétique
68	BENCHAMKHA Yassine	P.E.S	Chirurgie réparatrice et plastique
69	CHAFIK Rachid	P.E.S	Traumato-orthopédie
70	MADHAR Si Mohamed	P.E.S	Traumato-orthopédie
71	EL HAOURY Hanane	P.E.S	Traumato-orthopédie
72	ABKARI Imad	P.E.S	Traumato-orthopédie
73	EL BOUIHI Mohamed	P.E.S	Stomatologie et chirurgie maxillo faciale
74	LAKMICH Mohamed Amine	P.E.S	Urologie
75	AGHOUTANE El Mouhtadi	P.E.S	Chirurgie pédiatrique
76	HOCAR Ouafa	P.E.S	Dermatologie

77	EL KARIMI Saloua	P.E.S	Cardiologie
78	EL BOUCHTI Imane	P.E.S	Rhumatologie
79	AMRO Lamyae	P.E.S	Pneumo-phtisiologie
80	ZYANI Mohammad	P.E.S	Médecine interne
81	GHOUNDALE Omar	P.E.S	Urologie
82	QACIF Hassan	P.E.S	Médecine interne
83	BEN DRISS Laila	P.E.S	Cardiologie
84	MOUFID Kamal	P.E.S	Urologie
85	QAMOUSS Youssef	P.E.S	Anesthésie réanimation
86	EL BARNI Rachid	P.E.S	Chirurgie générale
87	KRIET Mohamed	P.E.S	Ophtalmologie
88	BOUCHENTOUF Rachid	P.E.S	Pneumo-phtisiologie
89	ABOUCHADI Abdeljalil	P.E.S	Stomatologie et chirurgie maxillo faciale
90	BASRAOUI Dounia	P.E.S	Radiologie
91	RAIS Hanane	P.E.S	Anatomie Pathologique
92	BELKHOU Ahlam	P.E.S	Rhumatologie
93	ZAOUI Sanaa	P.E.S	Pharmacologie
94	MSOUGAR Yassine	P.E.S	Chirurgie thoracique
95	EL MGHARI TABIB Ghizlane	P.E.S	Endocrinologie et maladies métaboliques
96	DRAISS Ghizlane	P.E.S	Pédiatrie
97	EL IDRISSI SLITINE Nadia	P.E.S	Pédiatrie
98	RADA Noureddine	P.E.S	Pédiatrie
99	BOURRAHOUE Aicha	P.E.S	Pédiatrie
100	MOUAFFAK Youssef	P.E.S	Anesthésie-réanimation
101	ZIADI Amra	P.E.S	Anesthésie-réanimation
102	ANIBA Khalid	P.E.S	Neurochirurgie
103	TAZI Mohamed Illias	P.E.S	Hématologie clinique
104	ROCHDI Youssef	P.E.S	Oto-rhino-laryngologie
105	FADILI Wafaa	P.E.S	Néphrologie
106	ADALI Imane	P.E.S	Psychiatrie
107	ZAHLANE Kawtar	P.E.S	Microbiologie- virologie
108	LOUHAB Nisrine	P.E.S	Neurologie

109	HAROU Karam	P.E.S	Gynécologie-obstétrique
110	BASSIR Ahlam	P.E.S	Gynécologie obstétrique
111	BOUKHANNI Lahcen	P.E.S	Gynécologie obstétrique
112	FAKHIR Bouchra	P.E.S	Gynécologie-obstétrique
113	BENHIMA Mohamed Amine	P.E.S	Traumatologie-orthopédie
114	HACHIMI Abdelhamid	P.E.S	Réanimation médicale
115	EL KHAYARI Mina	P.E.S	Réanimation médicale
116	AISSAOUI Younes	P.E.S	Anesthésie-réanimation
117	BAIZRI Hicham	P.E.S	Endocrinologie et maladies métaboliques
118	ATMANE El Mehdi	P.E.S	Radiologie
119	EL AMRANI Moulay Driss	P.E.S	Anatomie
120	BELBARAKA Rhizlane	P.E.S	Oncologie médicale
121	ALJ Soumaya	P.E.S	Radiologie
122	OUBAHA Sofia	P.E.S	Physiologie
123	EL HAOUATI Rachid	P.E.S	Chirurgie Cardio-vasculaire
124	BENALI Abdeslam	P.E.S	Psychiatrie
125	MLIHA TOUATI Mohammed	P.E.S	Oto-rhino-laryngologie
126	MARGAD Omar	P.E.S	Traumatologie-orthopédie
127	KADDOURI Said	P.E.S	Médecine interne
128	ZEMRAOUI Nadir	P.E.S	Néphrologie
129	EL KHADER Ahmed	P.E.S	Chirurgie générale
130	LAKOUICHMI Mohammed	P.E.S	Stomatologie et chirurgie maxillo faciale
131	DAROUASSI Youssef	P.E.S	Oto-rhino-laryngologie
132	BENJELLOUN HARZIMI Amine	P.E.S	Pneumo-phtisiologie
133	FAKHRI Anass	P.E.S	Histologie-embryologie cytogénétique
134	SALAMA Tarik	P.E.S	Chirurgie pédiatrique
135	CHRAA Mohamed	P.E.S	Physiologie
136	ZARROUKI Youssef	P.E.S	Anesthésie-réanimation
137	AIT BATAHAR Salma	P.E.S	Pneumo-phtisiologie
138	ADARMOUCH Latifa	P.E.S	Médecine communautaire (médecine préventive, santé publique et hygiène)
139	BELBACHIR Anass	P.E.S	Anatomie pathologique

140	HAZMIRI Fatima Ezzahra	P.E.S	Histologie–embyologie cytogénétique
141	EL KAMOUNI Youssef	P.E.S	Microbiologie–virologie
142	SERGHINI Issam	P.E.S	Anesthésie–réanimation
143	EL MEZOUARI El Mostafa	P.E.S	Parasitologie mycologie
144	ABIR Badreddine	P.E.S	Stomatologie et chirurgie maxillo faciale
145	GHAZI Mirieme	P.E.S	Rhumatologie
146	ZIDANE Moulay Abdelfettah	P.E.S	Chirurgie thoracique
147	LAHKIM Mohammed	P.E.S	Chirurgie générale
148	MOUHSINE Abdelilah	P.E.S	Radiologie
149	TOURABI Khalid	P.E.S	Chirurgie réparatrice et plastique
150	NADER Youssef	Pr Ag	Traumatologie–orthopédie
151	SEDDIKI Rachid	Pr Ag	Anesthésie–réanimation
152	ARABI Hafid	Pr Ag	Médecine physique et réadaptation fonctionnelle
153	BELHADJ Ayoub	Pr Ag	Anesthésie–réanimation
154	BOUZERDA Abdelmajid	Pr Ag	Cardiologie
155	ARSALANE Adil	Pr Ag	Chirurgie thoracique
156	ABDELFETTAH Youness	Pr Ag	Rééducation et réhabilitation fonctionnelle
157	REBAHI Houssam	Pr Ag	Anesthésie–réanimation
158	BENNAOUI Fatiha	Pr Ag	Pédiatrie
159	ZOUIZRA Zahira	Pr Ag	Chirurgie Cardio–vasculaire
160	SEBBANI Majda	Pr Ag	Médecine Communautaire (Médecine préventive, santé publique et hygiène)
161	ABDOU Abdessamad	Pr Ag	Chirurgie Cardio–vasculaire
162	HAMMOUNE Nabil	Pr Ag	Radiologie
163	ESSADI Ismail	Pr Ag	Oncologie médicale
164	MESSAOUDI Redouane	Pr Ag	Ophtalmologie
165	ALJALIL Abdelfattah	Pr Ag	Oto–rhino–laryngologie
166	LAFFINTI Mahmoud Amine	Pr Ag	Psychiatrie
167	RHARRASSI Issam	Pr Ag	Anatomie–patologique
168	ASSERRAJI Mohammed	Pr Ag	Néphrologie
169	JANAH Hicham	Pr Ag	Pneumo–phtisiologie

170	NASSIM SABAH Taoufik	Pr Ag	Chirurgie réparatrice et plastique
171	ELBAZ Meriem	Pr Ag	Pédiatrie
172	BELGHMAIDI Sarah	Pr Ag	Ophtalmologie
173	FENANE Hicham	Pr Ag	Chirurgie thoracique
174	GEBRATI Lhoucine	Pr Hab	Chimie
175	FDIL Naima	Pr Hab	Chimie de coordination bio-organique
176	LOQMAN Souad	Pr Ass	Microbiologie et toxicologie environnementale
177	BAALLAL Hassan	Pr Ag	Neurochirurgie
178	BELFQUIH Hatim	Pr Ag	Neurochirurgie
179	MILOUDI Mouhcine	Pr Ag	Microbiologie-virologie
180	AKKA Rachid	Pr Ag	Gastro-entérologie
181	BABA Hicham	Pr Ag	Chirurgie générale
182	MAOUJOURD Omar	Pr Ag	Néphrologie
183	SIRBOU Rachid	Pr Ag	Médecine d'urgence et de catastrophe
184	BAKZAZA Oualid	Pr Ag	Chirurgie Vasculaire périphérique
185	EL- AKHIRI Mohammed	Pr Ag	Oto-rhino-laryngologie
186	HAJJI Fouad	Pr Ag	Urologie
187	OUMERZOUK Jawad	Pr Ag	Neurologie
188	JALLAL Hamid	Pr Ag	Cardiologie
189	ZBITOU Mohamed Anas	Pr Ag	Cardiologie
190	RAISSI Abderrahim	Pr Ag	Hématologie clinique
191	BELLASRI Salah	Pr Ag	Radiologie
192	DAMI Abdallah	Pr Ass	Médecine Légale
193	AZIZ Zakaria	Pr Ass	Stomatologie et chirurgie maxillo faciale
194	ELOUARDI Youssef	Pr Ag	Anesthésie-réanimation
195	LAHLIMI Fatima Ezzahra	Pr Ag	Hématologie clinique
196	EL FAKIRI Karima	Pr Ass	Pédiatrie
197	NASSIH Houda	Pr Ag	Pédiatrie
198	LAHMINI Widad	Pr Ag	Pédiatrie
199	BENANTAR Lamia	Pr Ag	Neurochirurgie
200	EL FADLI Mohammed	Pr Ag	Oncologie médicale

201	AIT ERRAMI Adil	Pr Ag	Gastro-entérologie
202	CHETTATI Mariam	Pr Ag	Néphrologie
203	SAYAGH Sanae	Pr Ag	Hématologie
204	BOUTAKIOUTE Badr	Pr Ag	Radiologie
205	DOUIREK Fouzia	Pr Ass	Anesthésie-réanimation
206	EL HAKKOUNI Awatif	Pr Ass	Parasitologie mycologie
207	BELARBI Marouane	Pr Ass	Néphrologie
208	AMINE Abdellah	Pr Ass	Cardiologie
209	CHETOUI Abdelkhalek	Pr Ass	Cardiologie
210	WARDA Karima	Pr Ass	Microbiologie
211	EL AMIRI My Ahmed	Pr Ass	Chimie de Coordination bio-organique
212	CHAHBI Zakaria	Pr Ass	Maladies infectieuses
213	MEFTAH Azzelarab	Pr Ass	Endocrinologie et maladies métaboliques
214	ROUKHSI Redouane	Pr Ass	Radiologie
215	EL GAMRANI Younes	Pr Ass	Gastro-entérologie
216	ARROB Adil	Pr Ass	Chirurgie réparatrice et plastique
217	SALLAHI Hicham	Pr Ass	Traumatologie-orthopédie
218	ACHKOUN Abdessalam	Pr Ass	Anatomie
219	DARFAOUI Mouna	Pr Ass	Radiothérapie
220	EL-QADIRY Rabiya	Pr Ass	Pédiatrie
221	ELJAMILI Mohammed	Pr Ass	Cardiologie
222	HAMRI Asma	Pr Ass	Chirurgie Générale
223	ELATIQUI Oumkeltoum	Pr Ass	Chirurgie réparatrice et plastique
224	BENZALIM Meriam	Pr Ass	Radiologie
225	ABOULMAKARIM Siham	Pr Ass	Biochimie
226	LAMRANI HANCI Asmae	Pr Ass	Microbiologie-virologie
227	HAJHOUI Farouk	Pr Ass	Neurochirurgie
228	EL KHASSOUI Amine	Pr Ass	Chirurgie pédiatrique
229	SBAAI Mohammed	Pr Ass	Parasitologie-mycologie
230	FASSI FIHRI Mohamed jawad	Pr Ass	Chirurgie générale
231	BENCHAFAI Ilias	Pr Ass	Oto-rhino-laryngologie
232	SLIOUI Badr	Pr Ass	Radiologie

233	EL JADI Hamza	Pr Ass	Endocrinologie et maladies métaboliques
234	AZAMI Mohamed Amine	Pr Ass	Anatomie pathologique
235	YAHYAOUI Hicham	Pr Ass	Hématologie
236	ABALLA Najoua	Pr Ass	Chirurgie pédiatrique
237	MOUGUI Ahmed	Pr Ass	Rhumatologie
238	SAHRAOUI Houssam Eddine	Pr Ass	Anesthésie-réanimation
239	AABBASSI Bouchra	Pr Ass	Pédopsychiatrie
240	SBAI Asma	Pr Ass	Informatique
241	HAZIME Raja	Pr Ass	Immunologie
242	CHEGGOUR Mouna	Pr Ass	Biochimie
243	RHEZALI Manal	Pr Ass	Anesthésie-réanimation
244	ZOUITA Btissam	Pr Ass	Radiologie
245	MOULINE Souhail	Pr Ass	Microbiologie-virologie
246	AZIZI Mounia	Pr Ass	Néphrologie
247	BENYASS Youssef	Pr Ass	Traumato-orthopédie
248	BOUHAMIDI Ahmed	Pr Ass	Dermatologie
249	YANISSE Siham	Pr Ass	Pharmacie galénique
250	DOULHOUSNE Hassan	Pr Ass	Radiologie
251	KHALLIKANE Said	Pr Ass	Anesthésie-réanimation
252	BENAMEUR Yassir	Pr Ass	Médecine nucléaire
253	ZIRAOUI Oualid	Pr Ass	Chimie thérapeutique
254	IDALENE Malika	Pr Ass	Maladies infectieuses
255	LACHHAB Zineb	Pr Ass	Pharmacognosie
256	ABOUDOURIB Maryem	Pr Ass	Dermatologie
257	AHBALA Tariq	Pr Ass	Chirurgie générale
258	LALAOUI Abdessamad	Pr Ass	Pédiatrie
259	ESSAFTI Meryem	Pr Ass	Anesthésie-réanimation
260	RACHIDI Hind	Pr Ass	Anatomie pathologique
261	FIKRI Oussama	Pr Ass	Pneumo-phtisiologie
262	EL HAMDAR OUI Omar	Pr Ass	Toxicologie
263	EL HAJJAMI Ayoub	Pr Ass	Radiologie
264	BOUMEDIANE El Mehdi	Pr Ass	Traumato-orthopédie

265	RAFI Sana	Pr Ass	Endocrinologie et maladies métaboliques
266	JEHRANE Ilham	Pr Ass	Pharmacologie
267	LAKHDAR Youssef	Pr Ass	Oto-rhino-laryngologie
268	LGHABI Majida	Pr Ass	Médecine du Travail
269	AIT LHAJ El Houssaine	Pr Ass	Ophtalmologie
270	RAMRAOUI Mohammed-Es-said	Pr Ass	Chirurgie générale
271	EL MOUHAFID Faisal	Pr Ass	Chirurgie générale

LISTE ARRETEE LE 12/05/2023



DEDICACES



I would like to express my wholehearted gratitude to all the people who supported me along the way, who lifted me up to reach my goal. It is with great love, respect and gratitude that I dedicate this modest work as a token of respect and recognition.

I dedicate this work to

To Allah

*The Almighty, Merciful and Forgiving thank you for
illuminating the path before me, for the guidance,
strength, power of mind, protection and skills and for
giving us a healthy life. All of these,*

we offer to you.

*I thank you and ask you to help me carry out my
profession as a doctor with conscience and dignity.*

A Tribute to My Honorable Father Mohammed

I dedicate this thesis to you, my beloved father, whose unwavering support and guidance have been the bedrock of my academic journey. From the very beginning, you have believed in me, encouraged my pursuits, and instilled in me a passion for learning. Your wisdom, patience, and unconditional love have shaped me into the man I am today.

Throughout the challenges and triumphs of this research endeavor, your constant encouragement and unwavering belief in my abilities have been a wellspring of inspiration. Your words of wisdom and advice have guided me through the toughest times, providing me with the strength to persevere.

I am eternally grateful for the sacrifices you have made to ensure that I have had access to a quality education. Your dedication to my academic success has been a driving force behind my accomplishments. This thesis stands as a testament to our shared commitment to lifelong learning and intellectual growth.

Thank you, Dad, for being my pillar of strength, my mentor, and my role model. Your love, support, and unwavering belief in me have been invaluable. I cannot express enough gratitude for having you by my side on this remarkable journey.

With heartfelt appreciation,

A Tribute to My Remarkable Mother Fatima

To the most extraordinary woman in my life, my beloved mother,

This thesis stands as a testament to your unwavering love, unyielding support, and boundless sacrifices. You have been my guiding light, my pillar of strength, and my ultimate inspiration throughout my academic journey.

Through the sleepless nights and endless sacrifices, you paved the way for my success. You gave up so much of yourself to provide me with opportunities you never had, and I am forever grateful for your selflessness. Your determination and resilience have taught me the true meaning of perseverance and hard work.

This thesis is not just a culmination of my academic endeavors; it is a tribute to you, Mom. It is a reflection of the values you instilled in me - integrity, compassion, and a thirst for knowledge. Your unwavering belief in my abilities and your unconditional love have given me wings to soar and the confidence to pursue my dreams.

Thank you, Mom, for being my rock, my confidante, and my best friend. Your presence in my life has been a blessing beyond measure, and I am eternally grateful for the gift of your love. I dedicate this thesis to you, as a token of my deepest appreciation and as a symbol of the incredible woman you are.

With all my love and admiration,

A Tribute to my remarkable sister Hasna

In this momentous milestone of my academic journey, I find it fitting to dedicate this thesis to you, a beacon of inspiration and a guiding force in my life. Your unwavering support, wisdom, and love have shaped my path and propelled me towards success.

From my earliest memories, you have been my constant companion and confidante. Your presence has brought light and joy into my life, and your belief in my abilities has fueled my ambition. You have been there through every challenge and triumph, offering guidance, encouragement, and a shoulder to lean on.

Your strength and resilience have been a source of inspiration for me. You have overcome obstacles with grace and determination, showing me what it means to persevere. Your unwavering faith in my dreams has instilled in me the confidence to pursue them wholeheartedly, knowing that I have your unwavering support.

This thesis stands not only as a testament to my academic achievements but also as a tribute to the incredible sister you are. It symbolizes the bond we share, the lessons you have imparted, and the love that has shaped me into the person I am today.

Thank you, dear sister, for being my guiding light, my mentor, and my greatest ally. Your unwavering presence in my life has been an immeasurable blessing. I dedicate this thesis to you with heartfelt gratitude and profound admiration for the incredible sister you are.

With love and appreciation that knows no bounds

A tribute to my esteemed elder brother Yassine

With immense gratitude and admiration, I dedicate this thesis to you. You have been my constant source of inspiration and support, guiding me on this academic journey.

Your belief in my abilities and unwavering encouragement have pushed me to achieve greatness. Your wisdom and guidance have shaped my perspective and fueled my intellectual curiosity.

Beyond being a brother, you have been my mentor and confidant. Your presence has brought strength and comfort, and your unwavering belief in my potential has given me the confidence to overcome challenges.

I am indebted to you for your unwavering support, late-night discussions, and countless hours of helping me refine my ideas. Your sharp intellect and keen insights have always propelled me to think critically and aim for excellence.

This thesis stands as a testament to the impact you have had on my life and academic success. Your support has been invaluable, and I am forever grateful for your love and guidance.

With heartfelt appreciation and love

A tribute To my extraordinary younger brother Mohammed

This thesis is dedicated to you, my partner in crime, whose sense of humor and kindness have brought joy and warmth to every moment we've shared. Through the highs and lows of life, you have been my constant companion, lifting my spirits with your infectious laughter and unwavering support.

Our shared moments have been filled with laughter, inside jokes, and unforgettable adventures. Your unique ability to find humor in even the most challenging situations has been a constant reminder to approach life with a light heart and a smile on my face. Your wit and quick thinking have turned ordinary moments into extraordinary memories that I will cherish forever.

Beyond your humor, your kindness and compassion have touched the lives of those around you. Your genuine concern for others, your willingness to lend a helping hand, and your empathetic nature have made a lasting impact on me and everyone lucky enough to know you. Your acts of kindness have inspired me to be a better person and have taught me the power of selflessness.

As I reflect on our journey together, I am filled with gratitude for the incredible bond we share. From childhood adventures to late-night conversations, you have been more than a brother; you have been my confidant, my friend, and my guiding light. Your unwavering support and belief in me have given me the strength and confidence to pursue my dreams.

This thesis is a testament to our shared moments, your sense of humor, and your kindness that has shaped my perspective and enriched my life. Thank you for being the incredible person you are and for being by my side every step of the way.

With heartfelt love and appreciation,

A tribute to my To my wonderful nephew Adam and niece Yasmine

This thesis is dedicated to both of you, the lights of my life, whose innocence, curiosity, and boundless energy have brought immense joy and inspiration into my world. Your presence has reminded me of the beauty of wonder and the importance of nurturing young minds.

Watching you grow and discover the world has been a source of endless delight.

Your insatiable curiosity and eagerness to learn have sparked my own intellectual curiosity and motivated me to delve deeper into my field of study.

Your innocent questions and wide-eyed wonder have reminded me of the importance of never losing our sense of awe and inquisitiveness.

As you embark on your own journeys of education and exploration, I hope this thesis serves as a symbol of the endless possibilities that lie ahead. May it inspire you to pursue your passions with unwavering determination, to seek knowledge with an open mind, and to embrace the challenges that come your way.

My dear nephew and niece, you have taught me the true meaning of unconditional love. Your pure hearts and genuine affection have reminded me of the importance of cherishing the relationships that matter most. Through your laughter, hugs, and innocent smiles, you have brightened even the darkest of days and filled my heart with warmth.

May this dedication serve as a reminder that you are both capable of achieving greatness and making a positive impact in the world. Know that I am always here to support and encourage you, just as you have done for me.

With all my love and pride,

To my dear friends

This thesis is dedicated to each and every one of you who has been an invaluable part of my life's journey. Your friendship has been a source of unwavering support, laughter, and inspiration. Thank you for standing by my side, lifting me up, and making this experience unforgettable.

With gratitude,

To all those who have helped in any way in the realization of this work

I would like to express my deep respect, gratitude and esteem for the encouragement and help they have given me.

To all the teachers at the Faculty of Medicine and Pharmacy in Marrakech



REMERCIEMENTS



A notre Maître et Président professeur MONSIEUR CHAKOUR Mohamed

Nous sommes très touchés par l'honneur que vous nous faites en acceptant d'assurer la présidence de cette thèse. Votre compétence professionnelle incontestable ainsi que vos qualités humaines vous valent l'admiration et le respect de tous. Vous êtes et vous serez pour nous l'exemple de rigueur et de droiture dans l'exercice de la profession. Veuillez, cher Maître, trouver dans ce modeste travail l'expression de notre haute considération, de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect.

A notre Maître et Rapporteur professeur MONSIEUR AIT AMEUR Mustapha

C'est avec un grand plaisir que je me suis adressée à vous dans le but de bénéficier de votre encadrement et j'étais très touchée par l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de me confier ce travail. Merci pour m'avoir guidé tout au long de ce travail. Merci pour l'accueil bienveillant et l'attention que vous m'avez réservée à chaque fois. Veuillez accepter, cher maître, dans ce travail l'assurance de mon estime et de mon profond respect.

A notre Maître et Juge de these professeure Madame SAYAGH Sanae

Je vous adresse mes sincères remerciements pour l'honneur que vous m'avez accordé en siégeant parmi mon noble jury. Permettez-moi de vous exprimer ma gratitude, mon respect et ma profonde admiration pour vos grandes qualités à la fois humaines et professionnelles. Votre compétence et votre conscience professionnelle ne peuvent que susciter notre admiration et notre respect, Veuillez trouver ici l'expression de notre grand respect et notre haute considération.



ABBREVIATIONS

Liste des abréviations

AC : Anticorps
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AG : Antigène
AHAI : Anémies Hémolytiques Auto-Immunes
BSA : Albumine De Sérum Bovin
CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne En Hémoglobine
CD : Cluster Of Differentiation
CIVD Coagulation intravasculaire disséminée
CMF : Cytométrie En Flux
CSTf : Coefficient De Saturation De La Transferrine
CTF : Capacité Totale De Fixation Du Fer Par La Transferrine
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPO : Erythropoïétines
ESR : Erythrocyte Sedimentation Rate
FL : Femtolitre
FT : Le Facteur Tissulaire
GAT : Granulocyte Agglutination Test
GIFT : Granulocyte Immunofluorescence Test
GPI : Glycophosphatidylinositol
GR : Globule Rouge
HandE : Hématoxyline-Éosin
Hb : Hémoglobine
HFR : High-Fluorescence Reticulocytes
IRF : Immature Reticulocyte Fraction
LBA : Lavage Broncho Alveolaire
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LFR : Low-Fluorescence Reticulocytes
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
MAIGA : Monoclonal Antibody-Specific Immobilization of Granulocyte Antigens
MAIPA : Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigens
McL : Micro Litre
MFR : Medium-Fluorescence Reticulocytes
MGG : Coloration de May-Grünwald Giemsa
NFS : Numération-Formule Sanguine
NIBSC : National Institute For Biological Standards And Controls
PBS : Tampon Phosphate Salin

PCA : Protéine C Activée
PE : Polynucléaire Eosinophile
PG : Picogramme
PM : Poids Moléculaire
PML2 : Bodies Promyelocytic Leukemia
PNN : Polynucléaires Neutrophiles
RAI : Recherche Des Agglutinines Irrégulières
Ret-he : Reticulocyte Hemoglobin Equivalent
TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne En Hémoglobine
TDA : Test Direct A L'antiglobuline
TP : Taux De Prothrombine
TPO : Thrombopoïétine
TQ : Temps De Quick
TCA : Temps De Céphaline Activée
UI : Unité Internationale
UMP : Uridine Monophosphate
VGM : Volume Globulaire Moyen
VHC : Virus De L'hépatite C
VIH : Virus De L'immunodéficience Humaine
VS : Vitesse De Sédimentation

PLAN



INTRODUCTION.....	1
DEFINITION ET OBJECTIFS DU GUIDE	3
CYTOLOGIE	5
CYTOMETRIE EN FLUX	43
EXPLORATION DES PATHOLOGIES ERYTHROCYTAIRES.....	61
EXPLORATION DES ANOMALIES DU MÉTABOLISME DU FER ET HÉMOLYSE	75
EXPLORATION DES ANOMALIES DE L'HEMOGLOBINE.....	88
TESTS GLOBAUX ET FACTEURS DE COAGULATION	107
GROUPES SANGUINS ERYTHROCYTAIRES	147
ANTICORPS ANTI-ERYTHROCYTAIRES.....	163
AUTRES ANTICORPS ANTI-ELEMENTS.....	194
RESUMES	216
BIBLIOGRAPHIE.....	220



INTRODUCTION

Ce guide est conçu pour vous fournir une vue d'ensemble complète des différentes analyses biologiques utilisées en hématologie, un domaine de la médecine dédié à l'étude des cellules sanguines et des troubles hématologiques.

Les analyses biologiques jouent un rôle essentiel dans le diagnostic, le suivi et le traitement des maladies hématologiques. Elles permettent d'évaluer la composition, la fonction et les caractéristiques des cellules sanguines, telles que les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes, ainsi que les composants du plasma sanguin.

Dans ce guide, nous explorerons les différentes techniques et tests utilisés en hématologie, tels que l'hémogramme complet, la numération des réticulocytes, l'étude de la coagulation, les tests de la fonction plaquettaire et bien d'autres encore, à exclure les examens complémentaires pour l'exploration d'un syndrome hémorragique, examens complémentaires pour l'exploration d'une consommation de facteurs de la coagulation, et le suivi biologique des traitements antithrombotiques.

Nous vous expliquerons également leur importance clinique, les valeurs normales de référence et les indications spécifiques pour chaque analyse. Que vous soyez un professionnel de la santé ou un étudiant en médecine, ce guide sera votre compagnon idéal pour comprendre les analyses biologiques en hématologie et leur utilisation dans la pratique médicale.



*DEFINITION
ET OBJECTIFS
DU GUIDE*



Les guides pédagogiques font référence à l'organisation systématique du matériel pédagogique destiné à améliorer la compréhension des concepts et des principes médicaux par les apprenants.

Les enseignants en médecine doivent relever le défi suivant de faciliter le processus de développement actif, constructif et intégratif dans le cadre de programmes d'études normalisés et personnalisés et/ou des programmes d'études formels et informels standardisés et personnalisés et/ou formelles et informelles (1) . Par essence, les guides pédagogiques fournissent un cadre pour organiser et présenter l'information de manière à ce que le matériel soit facilement compris et retenu par les apprenants.

Les guides pédagogiques médicaux sont essentiels dans l'enseignement médical car ils permettent de combler le fossé entre la théorie et la pratique. Ils fournissent aux apprenants les compétences et les connaissances pratiques nécessaires pour fonctionner efficacement dans un environnement clinique.

Un bon guide de formation médicale doit présenter un aperçu clair et concis des sujets à couvrir.

Le plan doit être conçu pour répondre aux objectifs du cours et doit permettre une compréhension claire de la portée et de la séquence des objectifs d'apprentissage. Le contenu du guide pédagogique doit être pertinent, actuel et fondé sur des données probantes. Il doit intégrer les derniers résultats de la recherche, les meilleures pratiques et les tendances actuelles de l'enseignement médical. Le guide doit également être structuré de manière à faciliter l'apprentissage actif et l'engagement de l'apprenant.

En conclusion, Un guide pédagogique est un outil utilisé dans le domaine médical pour aider les professionnels de la santé et les étudiants en médecine à développer des stratégies efficaces afin de promouvoir l'éducation des patients et de prévenir les erreurs médicales.

Il s'agit essentiellement d'un ensemble de lignes directrices et de meilleures pratiques basées sur des théories et des principes éducatifs établis.



CYTOLOGIE

I. Hémogramme

1. Généralités

L'hémogramme est une analyse quantitative et qualitative des éléments figurés du sang faite sur un prélèvement à partir d'une ponction de sang veineux ou capillaire réalisée sur anticoagulant EDTA.

Egalement appelé numération-formule sanguine (NFS), elle permet d'évaluer les trois lignées sanguines : les hématies ou globules rouges ou encore érythrocytes, les leucocytes ou globules blancs, et les plaquettes. Elle permet aussi de mettre en évidence un processus inflammatoire ou infectieux.

- La numération de la lignée érythrocytaire fournit des informations sur la capacité de l'organisme à transmettre de l'oxygène aux cellules car, en effet, lors de cet examen, il est possible de calculer le taux d'hémoglobine contenu dans les hématies, cette protéine assurant le transport de l'oxygène dans le sang. Elle fournit également des données complémentaires :

- l'hématocrite, le volume occupé par les globules rouges par rapport au sang total (en %)
- le volume globulaire moyen (VGM) des hématies (en fL)
- la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), c'est-à-dire la quantité moyenne d'hémoglobine contenue dans une hématie (pg/cellule)
- la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), c'est-à-dire la quantité moyenne d'hémoglobine contenue dans un litre d'hématies (g/dL ou g/L).

Enfin, en association à la numération érythrocytaire, il est possible d'évaluer les réticulocytes qui sont des hématies jeunes circulant dans le sang témoignant de la capacité de la moelle à produire des hématies. Elle permet aussi une panoplie de nouveaux paramètres essentiels pour poser le diagnostic d'une manière pointue (IRF, HFR, MFR, LFR, Ret-He, ...)

- Dans la lignée leucocytaire on mesure le nombre total de leucocytes (en Giga [10⁹] par litre), Dans cette lignée sont retrouvés :

- les polynucléaires ou granulocytes, parmi lesquels se distinguent les polynucléaires neutrophiles, qui jouent un rôle important dans l'immunité et la défense de l'organisme contre des agents pathogènes, les polynucléaires éosinophiles, dont le nombre peut augmenter en réponse à certaines infections parasitaires ou en cas d'allergie, et les polynucléaires basophiles qui participent à certaines réactions allergiques ;

- les lymphocytes B qui sont responsables de la production d'anticorps et les lymphocytes T qui interviennent dans la sécrétion de cytokines (ils ne sont pas différenciés lors de la NFS) ;

- les monocytes qui permettent la présentation de l'antigène et interviennent dans la phagocytose.

- La lignée plaquettaire intervient essentiellement dans l'hémostase.

2. indications :

Cet examen permet de dépister, explorer et assurer le suivi de la plupart des anomalies des lignées sanguines. Il a pour but d'apporter des informations quantitatives et qualitatives sur les cellules sanguines.

Une NFS est pratiquée devant des signes évoquant une diminution d'une ou plusieurs lignées sanguines :

- syndrome anémique (pâleur, anoxie...)

- syndrome hémorragique aigu (purpura, épistaxis, ecchymoses, hématomes anormaux...)

- syndrome infectieux inexpliqué, persistant, récidivant ou grave, adénopathies chroniques, etc.

Elle est, par ailleurs, prescrite lors d'une altération de l'état général (asthénie prolongée, anorexie, amaigrissement, fièvre persistante, douleurs osseuses, etc.).

Elle est aussi pratiquée face à des signes évoquant une augmentation d'une ou plusieurs lignées sanguines : érythrose cutanée, thromboses artérielles ou veineuses, syndrome tumoral (adénopathies, splénomégalie, etc.).

Enfin, la numération des plaquettes est intéressante afin de surveiller la coagulation et de dépister un risque hémorragique. Elle permet enfin de repérer une thrombocytémie (augmentation du nombre de plaquettes) ou une thrombopénie (diminution du nombre de plaquettes).(2)

3. Matériels :

1 – Tube de prélèvement : Un tube à essai ou un tube de prélèvement spécifique contenant un anticoagulant, généralement de l'EDTA (éthylène diamine tétra-acétique), est utilisé pour recueillir l'échantillon de sang. L'EDTA empêche la coagulation du sang et maintient les cellules sanguines dans un état viable pour l'analyse ultérieure.

2 – Aiguille et seringue : Une aiguille stérile et une seringue sont utilisées pour prélever le sang de la veine du patient. Ils doivent être manipulés avec soin pour éviter les blessures et les contaminations croisées.

3 – Gants et désinfectant : Des gants jetables en latex, en nitrile ou en vinyle doivent être portés par le professionnel de la santé lors du prélèvement sanguin pour assurer l'hygiène et prévenir les infections. Un désinfectant pour les mains doit également être utilisé avant et après la procédure.

4 – Bande élastique ou garrot : Une bande élastique ou un garrot est utilisé pour créer une stase veineuse et faciliter le prélèvement sanguin en augmentant le flux sanguin dans la veine.

5 – Tampons d'alcool : Des tampons d'alcool sont utilisés pour nettoyer la zone de ponction avant le prélèvement sanguin, afin de minimiser le risque d'infection.

6 – Tubes d'échantillons : Une fois le sang prélevé, il est transféré dans des tubes spécifiques pour l'analyse. Différents tubes sont utilisés pour les différentes composantes de

l'hémogramme, tels que le comptage des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes, ainsi que pour les tests biochimiques.

7 – Appareil d'analyse automatisé : L'échantillon de sang est introduit dans un appareil d'analyse automatisé appelé hémato-analyseur, qui mesure et compte les différentes cellules sanguines. Ces appareils utilisent des techniques telles que la cytologie en flux, la microscopie électronique ou l'impédance électrique pour effectuer l'analyse.

8 – Logiciel d'interprétation : Une fois les données obtenues, un logiciel d'interprétation permet d'analyser et d'interpréter les résultats de l'hémogramme. Il fournit des valeurs numériques des différents

4. Mode opératoire :

Différentes méthodes d'analyse physique des cellules sont utilisées, seules ou associées à des techniques cytochimiques ou à des marqueurs fluorescents(3)(4) :

-Analyse manuelle :

première méthode de comptage, dans laquelle un volume de sang spécifique était étalé sur une lame.

La lame est ensuite recouverte d'une grille en verre et les 4,6 à 5,8 millions d'érythrocytes par μl ont été comptés(5). En 1924, Neubauer a publié sa structure en filet(6). Cela a mené à la numération cellulaire manuelle, qui est toujours considérée comme l'étalon-or dans certains domaines(7)(8)

le décompte manuel par microscopie optique reste une méthode classique, mais les méthodes automatisées développées pendant les deux dernières décennies ont montré leur exactitude et leur précision, à un coût inférieur du fait du faible temps technique nécessaire.(9)

- Analyse par cytochimie ou lyse chimique (exemple comptage des polynucléaires basophiles) :

Ces techniques sont utilisées par certains constructeurs pour identifier ou sélectionner les populations leucocytaires

- Analyse par fluorocytométrie en flux

Un marqueur donné peut être détecté par l'analyse de la fluorescence émise. Cette technique a surtout été appliquée pour la formule leucocytaire proposée sur certains automates en même temps que les autres données de l'hémogramme. Elle est également utilisée pour la numération des plaquettes avec le paramètre IPF : si $IPF > 15\%$ → thrombopénie périphérique .

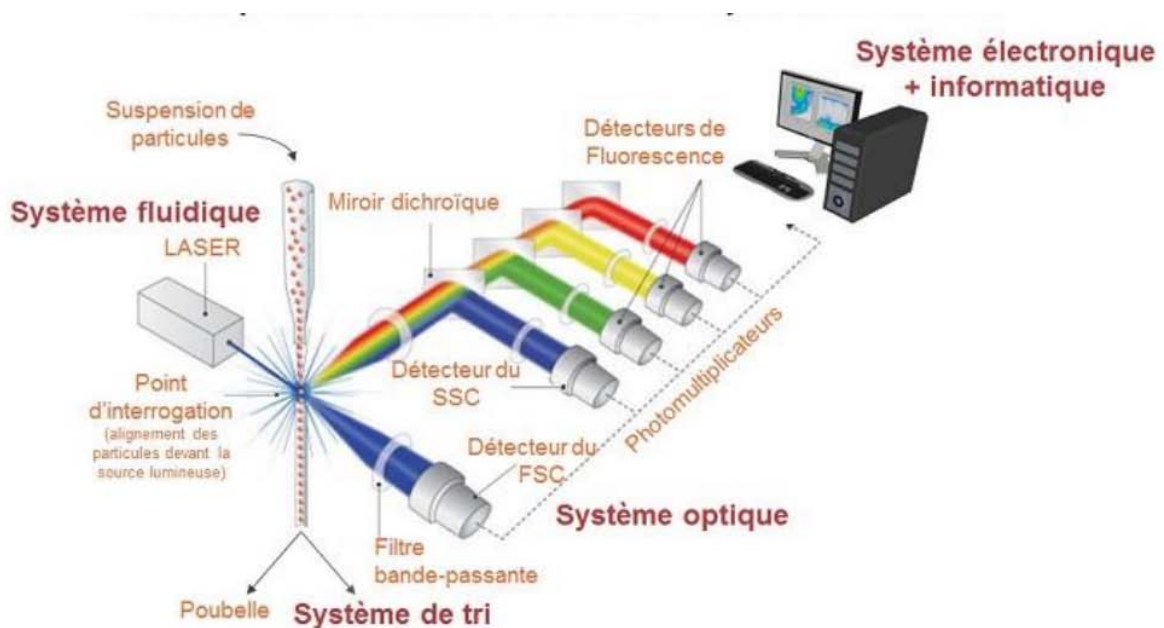


Fig 5 : Composition d'un cytomètre en flux (10)

- Analyse par impédance :

L'analyse par impédance permet de compter les hématies, les leucocytes et les plaquettes. Elle utilise le « principe Coulter ». Les cellules mises en suspension dans un liquide conducteur et guidées à travers un petit orifice cylindrique vont déclencher lors de leur passage entre deux électrodes immergées dans ce liquide une augmentation de la résistance électrique (variation d'impédance) qui génère une impulsion électrique (fig 5) :

- le nombre d'impulsions correspond au nombre de cellules ayant franchi l'orifice ;
- l'amplitude de l'impulsion est proportionnelle au volume de la cellule.

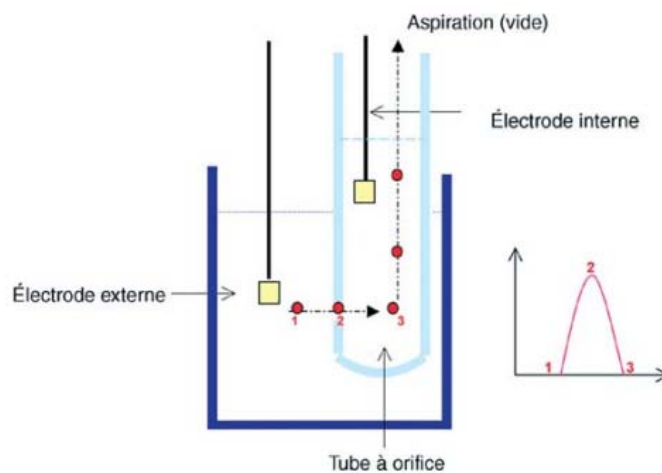


Fig 6 : Principe de l'analyse par variation d'impédance. L'analyse par impédance permet de compter les hématies, les leucocytes et les plaquettes. Elle utilise le « principe Coulter ». Les cellules mises en suspension dans un liquide conducteur et guidées à travers un petit orifice cylindrique vont déclencher lors de leur passage entre deux électrodes immergées dans ce liquide une augmentation de la résistance électrique (variation d'impédance) qui génère une impulsion électrique : - le nombre d'impulsions correspond au nombre de cellules ayant franchi l'orifice ; - l'amplitude de l'impulsion est proportionnelle au volume de la cellule. Les impulsions sont ensuite classées dans différents canaux selon leur amplitude, ce qui permet la construction d'histogrammes de distribution volumétrique(11)

5. Résultats :

5.1 Valeurs normales :

- ◆ Hématies :
 - homme, $4,2-5,7 \cdot 10^{12}/L$ ou 4 200 000-5 700 000/mm³ ;
 - femme, $4,0-5,3 \cdot 10^{12}/L$ ou 4 000 000-5 300 000/mm³.
- ◆ Taux d'hémoglobine :
 - homme, 130-180 g/L ou 13-18 g/100 mL de sang ;
 - femme, 120-160 g/L ou 12-16 g/100 mL de sang.
- ◆ Hématocrite :
 - homme, 40-52 % ;
 - femme, 37-46 %.
- ◆ Volume globulaire moyen : homme/femme, 80-95 fl ou μ^3 .
- ◆ Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine : homme/femme, 28-32 pg.
- ◆ Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine : homme/femme, 32 à 36 % ou 320-360 g/L.

Fig 7 : Valeurs normales de la numération-formule sanguine :
lignée érythrocytaire(12)

- ◆ Leucocytes : $4-10 \cdot 10^9/L$ ou 4 000 à 10 000/mm³.
- ◆ Neutrophiles : $2,5-7,5 \cdot 10^9/L$ ou 2 500 à 7 500/mm³.
- ◆ Éosinophiles : $0,1-0,5 \cdot 10^9/L$ ou 100 à 500/mm³.
- ◆ Basophiles : $0-0,150 \cdot 10^9/L$ ou 0 à 150/mm³.
- ◆ Lymphocytes : $1,5-4 \cdot 10^9/L$ ou 1 500 à 4 000/mm³.
- ◆ Monocytes : $0,4-1,0 \cdot 10^9/L$ ou 400 à 1 000/mm³.
- ◆ Plaquettes : $150-400 \cdot 10^9/L$ ou 150 000 à 400 000/mm³.

fig 8 : Valeurs normales de la formule sanguine et des plaquettes(15)

5.2 Interprétation : valeurs anormales :

Tableau. Valeurs seuils de l'hémogramme (établies selon un accord professionnel fort). Ne sont indiquées ici que les valeurs ayant une signification clinique.

Anémie	homme	Hb < 13 g/dL
	femme	Hb < 12 g/dL
	femme enceinte	Hb < 11 g/dL
	à la naissance	Hb < 13,5 g/dL
	de la naissance à 6 ans	Hb < 11 g/dL
Microcytose	de 6 ans à 14 ans	Hb < 12 g/dL
	adulte	VGM < 82 µ ³
	avant 2 ans	VGM < 70 µ ³
	de 2 à 6 ans	VGM < 73 µ ³
Macrocytose	de 6 à 14 ans	VGM < 80 µ ³
		VGM > 98 µ ³
Hypochromie		CCMH < 32 %
Polyglobulie	homme	Hb > 17 g/dL (+ Ht > 50 %)
	femme	Hb > 16 g/dL (+ Ht > 45 %)
Réticulocytopenie*		Réticulocytes < 20 000 x 10 ⁹ /L
Hyperréticulocytose*		Réticulocytes > 120 000 x 10 ⁹ /L

* Une numération des réticulocytes ne peut s'apprécier que de façon fonctionnelle, en tenant compte du taux d'hémoglobine.

Leucocytes** : tenir compte des chiffres absolus et non des pourcentages

Neutropénie	< 1 500 x 10 ⁹ /L
Polynucléose neutrophile	> 7 000 x 10 ⁹ /L
Éosinophilie	> 400 x 10 ⁹ /L
Basocytose	> 100 x 10 ⁹ /L
Lymphopénie	< 1 500 x 10 ⁹ /L
Lymphocytose	> 4 000 x 10 ⁹ /L
Monocytopenie	< 200 x 10 ⁹ /L
Monocytose	> 800 x 10 ⁹ /L

** La signification d'une leucopénie ou d'une hyperleucocytose globale n'est médicalement pas claire. En pratique, il faut analyser les variations des différents types de leucocytes et pas celles de la leucocytose totale.

Plaquettes

Thrombopénie	< 150 000 x 10 ⁹ /L
Thrombocytose	> 400 000 x 10 ⁹ /L

Les unités utilisées sont les unités internationales, même si les valeurs sont données, par souci de facilité de lecture, sous une forme qui tient compte des habitudes médicales (6 500 x 10⁹/L au lieu de 6,5 x 10⁹/L leucocytes par exemple).

ration des lymphocytes. Les valeurs observées chez les enfants de moins de 4 ans sont plus élevées que chez l'adulte et la valeur seuil choisie peut être physiologiquement dépassée. A un moindre degré, la valeur seuil choisie pour définir une neutropénie chez l'adulte expose également à un diagnostic par excès chez l'enfant de moins de 4 ans.

- La race

La neutropénie ethnique est bien établie chez les patients de race noire et ne devrait pas conduire à des explorations inutiles à condition que cette neutropénie, habituellement modérée

(polynucléaires neutrophiles > 500 x 10⁹/L), soit isolée cliniquement, hématologiquement et bien tolérée (pas de notion d'infections sévères ou à répétition).

- La grossesse

Lors de la grossesse, il existe une hyperleucocytose et une polynucléose neutrophile dont les maximums surviennent entre la 30^e et la 34^e semaine. L'augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles est le plus souvent modérée et le seuil choisi pour la polynucléose neutrophile (7000 x 10⁹/L) reste valable chez la femme enceinte.

- La consommation du tabac

La consommation de cigarettes est significativement associée à une augmentation des diverses lignées leucocytaires. Elle est particulièrement notable pour les polynucléaires neutrophiles qui peuvent être augmentés de 20 %. Cette augmentation est proportionnelle au nombre de cigarettes fumées par jour, mais peu influencée par l'ancienneté du tabagisme. Ce fait doit être pris en compte dans l'interprétation de toute polynucléose neutrophile. Le tabagisme est également responsable d'une hyperlymphocytose qui se majore avec l'ancienneté du tabagisme.

- Les rythmes nycthémeraux

Les seules variations nycthémerales qui ont une importance clinique sont celles des différents types de leucocytes. Ces variations peuvent expliquer certaines différences constatées par exemple entre un hémogramme réalisé le soir et un hémogramme réalisé le matin. Ces données sont en faveur d'un horaire standardisé et *a priori* matinal pour les prélèvements.

- L'effort physique

Des variations significatives de la leucocytose

(polynucléose et lymphocytose) ont été observées après des efforts pouvant être brefs. Dans tous les cas, le retour à des valeurs de base est obtenu après un repos de 20 minutes.

● Facteurs à l'origine de variations des plaquettes

- La grossesse

Lors de la grossesse, il existe une diminution très modérée de la numération plaquettaire. Ceci peut, chez certaines femmes qui ont habituellement des numérations de plaquettes aux limites inférieures des valeurs de référence, faire porter le diagnostic de « thrombopénie de la grossesse ». Néanmoins, toute thrombopénie au cours de la grossesse doit être considérée comme potentiellement pathologique et faire proposer au minimum une enquête clinique, un contrôle de l'hémogramme, une analyse du frottis plaquettaire et une évaluation du volume plaquettaire, voire des explorations plus poussées.

- L'altitude

La thrombocytose liée à l'altitude ne s'observe que chez des patients vivant à des altitudes extrêmes (3 000 à 4 000 m), situation rare en clinique pour la population française.

fig 9 : Valeurs seuils de l'hémogramme(13)

II. Frottis sanguin :

1 – Généralités :

Le frottis sanguin est un étalement sur lame d'une goutte de sang veineux ou capillaire prélevé sur anticoagulant EDTA qui analyse les cellules du sang périphérique étalées sur une lame.

Malgré les progrès de l'automatisation de l'hématologie et de l'application des techniques moléculaires, le frottis sanguin reste un test diagnostique très important pour l'hématologue.(14)

2 – Indications :

D'un point de vue clinique, l'examen du frottis sanguin répond à quatre objectifs importants.

– Premièrement, il sert d'outil de contrôle de la qualité en vérifiant les résultats générés par les analyseurs automatisés ou suite à la génération d'alarmes par les automates.(15)

–Deuxièmement, il permet d'identifier les cellules anormales/immatures/atypiques, si elles sont présentes.

–Troisièmement, il permet de reconnaître les anomalies morphologiques cliniquement significatives que les analyseurs sont incapables de signaler ou de détecter et d'identifier.(16)

–Quatrièmement, La recherche d'antigènes cellulaires par immunomarquage concerne des marqueurs non détectables en cytométrie en flux. (exemple : PML2-bodies)

3 – Matériels :

1 – Lamelle de verre : Une lamelle de verre de taille standard est utilisée comme support pour étaler l'échantillon de sang et créer le frottis.

2 – Lame de microscope : Une lame de microscope propre et non rayée est utilisée pour étaler l'échantillon de sang sur la lamelle de verre.

- 3 – Lancette ou aiguille : Une lancette stérile ou une aiguille est utilisée pour percer la peau et prélever une petite quantité de sang capillaire, généralement à partir du bout du doigt. La lancette ou l'aiguille doit être manipulée avec soin pour éviter les blessures et les contaminations.
- 4 – Bande élastique ou garrot : Une bande élastique ou un garrot peut être utilisé pour augmenter le flux sanguin dans la région où le prélèvement sera effectué. Cela facilite le prélèvement du sang capillaire.
- 5 – Tampons d'alcool : Des tampons d'alcool sont utilisés pour nettoyer la zone de ponction avant le prélèvement sanguin, afin de minimiser le risque d'infection.
- 6 – Microscope : Un microscope optique est utilisé pour visualiser et examiner le frottis sanguin. Le microscope doit être équipé d'objectifs de différents grossissements, généralement 10x, 40x et 100x, ainsi que d'un éclairage adéquat.
- 7 – Colorants : Des colorants spécifiques, tels que le colorant de Wright ou le colorant de Giemsa, sont utilisés pour colorer le frottis sanguin. Ces colorants permettent de distinguer les différentes cellules sanguines et d'améliorer leur visibilité sous le microscope.
- 8 – Solution de fixation : Une solution de fixation, telle que le méthanol, peut être utilisée pour fixer le frottis sanguin avant la coloration. Cela permet de préserver les cellules et d'empêcher leur dégradation.

4 Mode opératoire :

Peut-être fait de façon manuelle ou automatisée, cependant Les résultats) étaient statistiquement significatifs lorsqu'ils étaient mesurés avec la méthode automatisée par rapport à la méthode manuelle traditionnelle.(17)

Préparation d'un frottis sanguin	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Nettoyer 2 lames à l'alcool (faces et tranches), les sécher avec du papier absorbant, les déposer sur papier absorbant. 2. Prélever, une goutte de sang à l'aide du compte-goutte. 3. Déposer la goutte de sang à l'extrémité d'une lame (figure 1). 4. Appliquer une autre lame inclinée à 45° en avant de la goutte de sang de façon à ce que le sang s'étale sous la lame par capillarité. (figure 2 et 3). 5. Faire glisser la lame inclinée à 45° pour étaler uniformément la goutte. (figure 4). 6. Sécher le frottis avec le sèche-cheveux. 7. Repérer au marqueur, avec une lettre F, la face où se trouve le sang. 	
Coloration variante de la coloration de MAY- GRÜNWARD - GIEMSA	
(Porter lunettes et gants et travailler sous la hotte ou dans un local bien aéré)	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Aligner devant soi, dans l'ordre, les trois flacons : Flacon 1 = fixateur (couleur violette), Flacon 2 = colorant rouge, Flacon 3 = colorant bleu. 2. Placer la lame sur une boîte de Petri 3. Recouvrir le frottis de quelques gouttes de fixateur (flacon1) et attendre 5 secondes, égoutter verticalement au contact du papier absorbant. 4. Procéder comme à l'étape 2 pour le colorant (flacon 2 puis flacon 3). 5. Rincer la lame en l'arrosant délicatement avec la pissette d'eau distillée au dessus de l'évier. 6. Egoutter sur papier absorbant puis sécher la lame au sèche-cheveux. 7. Observer au microscope sans lamelle aux objectifs x10 x50 x100 	

fig 10 : REALISATION D'UN FROTTIS SANGUIN

5 Résultats :

5.1 Résultats normaux :

En plus des décomptes des types cellulaires (fig 6 et 7) , il permet la mise en évidence et la caractérisation de cellules :

Éléments	Caractéristiques morphologiques et cytologiques
HÉMATIES	<ul style="list-style-type: none"> Cellules de 7 µm de diamètre les plus nombreuses, colorées en rosée (grises si coloration mal réalisée) Cellules anucléées, en forme de disques biconcaves Cellules dépourvues d'organites cytoplasmiques
LEUCOCYTES	Les granulocytes ont un noyau polylobé (de 2 à 4 lobes reliés entre eux par des ponts peu visibles) et un cytoplasme contenant des granulations différentes permettant de les distinguer : <ul style="list-style-type: none"> Neutrophiles : 10-15 µm, noyau plurilobé violet, cytoplasme rosé ou jaune clair, granulations fines, nombreuses et colorées en violet-lilas (→ 60 à 70 % des leucocytes) Basophiles : 10-12 µm, noyau bilobé violet-rouge, cytoplasme rose pâle, granulations grosses, peu nombreuses et colorées en bleu-noir (→ 0,5 à 1 % des leucocytes) Éosinophiles : 10-15 µm, noyau bilobé symétrique violet, granulations nombreuses grosses, serrées, colorées en orange (→ 2 à 4 % des leucocytes)
	Les monocytes sont les plus grosses cellules sanguines (15-30 µm) ; noyau avec une encoche profonde, violet, aspect filamenteux. Cytoplasme gris clair, avec de fines granulations rouges. (→ 3 à 8 % des leucocytes).
	Les petits lymphocytes sont les plus petits leucocytes (7-9 µm) ; noyau à chromatine dense, coloré en violet arrondi, occupant la quasi-totalité du cytoplasme coloré en bleu. Les grands lymphocytes : 9-15 µm, noyau ovalaire violet-rouge, cytoplasme bleu-clair et une dizaine de fines granulations pourpres intense. (→ 20 à 25 % des leucocytes)
PLAQUETTES	Les plaquettes ou thrombocytes sont des fragments de cellules, peu nombreux, parfois regroupés et, colorés en violet

fig 11 : Caractéristiques morphologiques et cytologiques des hématies, globules blancs et plaquettes

5.2 – Interprétation : Résultats anormaux :

1 – les globules rouges :

- **Des anomalies de taille :**

- L'anisocytose indique une hétérogénéité de taille des hématies examinées. Elle est causée par des modifications dans la production des hématies et par la transfusion de culots globulaires.

- La microcytose se définit par la présence d'hématies de taille diminuée avec un volume globulaire moyen (VG M) abaissé. Elle résulte en général d'un défaut de synthèse de l'hémoglobine et se rencontre au cours des anomalies du métabolisme du fer, des syndromes thalassémiques, des hémoglobinoses C et E, des déficits en enzymes intervenant dans la synthèse de l'hème

- la macrocytose est caractérisée par des hématies de diamètre augmenté Elle est en général reliée à une anomalie de synthèse de l'ADN [carence en vitamine B12, acide folique, déficit en uridine monophosphate (UMP) synthetase].(18)

- **Des anomalies de formes**, aussi nommées poikilocytose, qui sont caractérisées par des variations au niveau de la forme des globules rouges :

- en forme d'oursin (échinocytes) de forme ovale (elliptocytes ou ovalocytes)

- en forme de larve (dacrocytes)

- en forme de faucille (drépanocytes)

- **Des anomalies de teinte :**

- L'anisochromie se définit par la présence d'hématies de teinte variable

- La polychromatophilie correspond à des hématies de grande taille et de couleur gris bleu au MGG

- L'hypochromie correspond à des hématies plus claires que normalement au MGG

• Des inclusions intra-érythrocytaires :

Les corps de Howell-Jolly sont des corpuscules sphériques (0,5 à 1 µm de diamètre) de même teinte que le noyau en général unique dans la cellule.

Les ponctuations basophiles sont des granulations arrondies ou irrégulières de taille et de nombre variable, colorées en bleu au MGG, et réparties dans l'ensemble du cytoplasme (hématies ponctuées).

Les corps de Pappenheimer sont de petits granules de 0,5 µm de diamètre, colorés en bleu par le MGG et regroupés au sein du cytoplasme, les hématies qui en contiennent sont appelées des sidérocytes.

Les anneaux de Cabot correspondent à des restes de microtubules formant le fuseau mitotique. Ils se présentent au sein de l'hématie comme des figures en anneaux, en huit, rouges violacés au MGG.

• Des anomalies de distribution :

Agglutination

Distribution en rouleaux






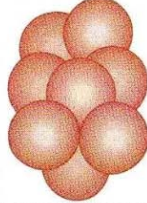






















RED BLOOD CELL MORPHOLOGY					
Size variation	Hemoglobin distribution	Shape variation		Inclusions	Red cell distribution
Normal 	Hypochromia 1+ 	Target cell 	Acanthocyte 	Pappenheimer bodies (siderotic granules) 	Agglutination 
Microcyte 	2+ 	Spherocyte 	Helmet cell (fragmented cell) 	Cabot's ring 	Rouleaux 
Macrocyte 	3+ 	Ovalocyte 	Schistocyte (fragmented cell) 	Basophilic stippling (coarse) 	
Oval macrocyte 	4+ 	Stomatocyte 	Tear drop 	Howell-Jolly 	
Hypochromic macrocyte 	Polychromasia (Reticulocyte) 	Sickle cell 	Burr cell 	Crystal formation HbSC  HbC 	

fig 12 : Anomalies des globules rouges

2- les globules blancs :

A – Les Neutrophiles :

1. Neutropénie : diminution du nombre de neutrophiles $< 1\,500 \times 10^6 /L$

2. Neutrophile : augmentation du nombre de neutrophiles $> > 7\,000 \times 10^6 /L$

3. La déviation à gauche : désigne la multiplication de neutrophiles non segmentés ou l'apparition de leur précurseurs dans le sang périphérique.

4. Neutrophiles Hypersegmentés : le nombre de segments du noyau dépasse cinq

5. Des modifications cytoplasmiques :

– Les granulations toxiques : grains de couleur plus foncée que l'on peut observer au microscope dans les neutrophiles, Ces granules sont souvent plus gros et plus abondants que les granules normaux.

– Vacuoles cytoplasmiques : se présentent comme des trous dans le cytoplasme.

– Corps de Döhle: Petite inclusion basophile ronde ou ovale, de moins de 2 mm de diamètre

– corps « en fagot » d'Auer : corps abondants disposés en faisceaux ou en bottes dans le cytoplasme.

6. L'anomalie de Pelger–Huet : un défaut héréditaire interférant avec la lobulation normale du noyau qui apparaît sous forme de bâtonnet ou de sphère.

7. anomalie d'Alder : granules azurophiles de très grande taille, dans le cytoplasme des polynucléaires de patients atteints de maladie de Hurler.

B– Les lymphocytes :

1. lymphopénie : une numération lymphocytaire totale de $< 1\,500/mm^3$ chez l'adulte ou $< 1,5 \times G / litre$

2. lymphocytose : une numération lymphocytaire totale de $> 4000/\text{mm}^3$ ou $> 4\text{G} / \text{litre}$.

3. Blastes lymphoïdes néoplasiques :

- cellules lymphomateuses: cellules folliculaires et cellules du manteau
- lymphocytes villeux
- cellules chevelues

C – Les éosinophiles :

1. l'éosinopénie : définie par une concentration sanguine de polynucléaires éosinophiles $< 0,05 \text{ G/L}$.

2. L'éosinophilie : définie comme un nombre élevé d'éosinophiles de sang périphérique $> 0,5 \text{ G/L}$

3. Hyperéosinophilie : définie par un nombre d'éosinophiles $> 1500/\text{mm}^3$ ou $1,5 \text{ G/L}$

D – Les basophiles :

1. Basocytose : définie par un nombre de basophiles $> 0,4 \times \text{G/L}$

2. Basocytopénie : définie par une baisse significative du nombre de polynucléaires basophiles.

E – Les monocytes :

1. Monocytose : définie par un nombre de monocytes $> 0.8 \text{ G /L}$

2. Monocytopénie : définie par un nombre de monocytes $< 0,5 \text{ G/L}$

3 – Les plaquettes :

1. Thrombocytopénie : définie par un nombre de plaquettes $< 150\ 000 \times G/L$

2. Thrombocytose : définie par un nombre de plaquettes $> 500\ 000 \times G/L$.

III. Dosage de la thrombopoïétine (TPO) :

1 – Généralités :

La thrombopoïétine (TPO) est le facteur humoral qui régule physiologiquement la production plaquettaire, Il est maintenant clairement établi qu'en plus de son action prépondérante sur la lignée mégacaryocytaire, cette cytokine joue aussi un rôle important dans la régulation des étapes précoces de l'hématopoïèse. La TPO est une glycoprotéine dont l'action est essentiellement endocrine puisqu'elle est fabriquée majoritairement par le foie et à un moindre degré par le rein(19)

2 – indications :

A. Thrombopénies :

Pour déterminer si la thrombopénie est liée à :

⇒ une anomalie de production :

- syndromes myélodysplasiques.(20)
- Maladie hépatique chronique, où le degré de thrombopénie est proportionnel à la sévérité de la maladie.(21)(22)
- aplasie médullaire.(23)

⇒ une anomalie par excès de destruction :

- purpura thrombopénique idiopathique(24)

B. Thrombocytoses :

Pour déterminer chez les patients sans anomalies moléculaires caractéristiques des néoplasies myéloprolifératives (thrombocytémie essentielle) si une production de TPO augmentée est responsable de la thrombocytose ou dans les thrombocytoses réactionnelles (en particulier dans certains cancers, hépatoblastome, certains lymphomes).(25)

3 Matériels:

- Sang sur tube sec ou EDTA(26) ou hépariné
- Kit Elisa(27)
- Lecteur de microplaques
- Pipettes de précision permettant de délivrer des volumes de 2 ml à 1 ml
- Cylindres gradués de 100 ml et 1 litre
- Pipettes de précision calibrées et réglables, de préférence avec des embouts en plastique jetables
- Papier absorbant
- Incubateur à 37°C
- Eau distillée ou désionisée
- Tubes pour préparer les dilutions de l'étalon ou de l'échantillon.
- Logiciel d'analyse de données et de représentation graphique.
- Papier graphique : linéaire (cartésien)



fig 13 : ELISA kit (R&D, Minneapolis, USA)(28)

4. Mode opératoire :

Technique Elisa Sandwich avec :

- un anticorps de capture (ex : anticorps monoclonal de souris)
- un anticorps de détection (ex : anticorps polyclonal de lapin biotinylé)(29)

Ces deux anticorps servent à piéger l'antigène à mesurer, dans notre cas la thrombopoïétine.

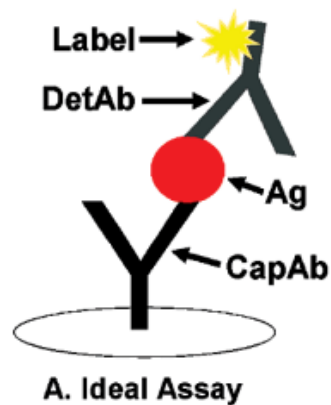


Fig 14 : Méthode Elisa Sandwich(30)

⇒ Les étapes :

l'ELISA sandwich commence par :

- l'application d'un anticorps de capture sur les puits de la plaque.
- Après avoir ajouté l'anticorps de capture aux plaques, celles-ci sont couvertes et incubées pendant une nuit à 4°C.
- les plaques sont lavées avec du PBS (tampon phosphate salin) , puis tamponnées/bloquées avec de la BSA (albumine de sérum bovin)
- Les lavages au tampon sont effectués pendant au moins 1 à 2 heures à température ambiante.
- Enfin, la plaque est lavée une nouvelle fois avec du PBS avant l'ajout de l'antigène.
- L'antigène d'intérêt est ensuite ajouté aux plaques pour se lier à l'anticorps de capture et incubé pendant 90 minutes à 37 degrés Celsius
- La plaque est lavée à nouveau, puis l'anticorps de détection primaire est ajouté à la plaque et incubé pendant encore 1 à 2 heures à température ambiante, suivi d'un lavage au tampon.
- L'anticorps secondaire conjugué à une enzyme est ensuite ajouté et incubé pendant 1 à 2 heures supplémentaires.
- La plaque est lavée à nouveau et le substrat est ajouté pour produire un changement de couleur.(31)

Le lecteur de plaque donne des densités optiques correspondantes à chaque puit, à extraire dans un tableur pour le traitement.

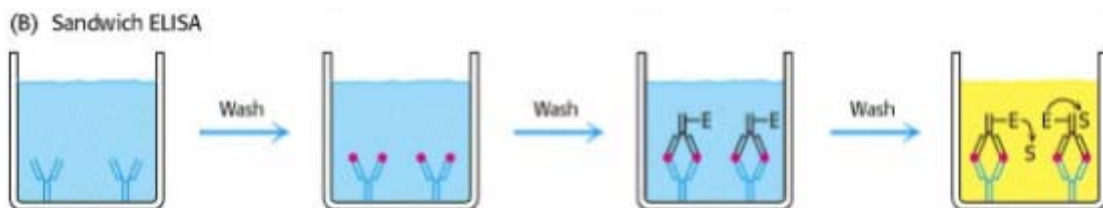


fig 15 : Méthode Elisa Sandwich

5 Résultats :

5.1 Valeurs normales :

Le taux médian du TPO au sérum est de 121,1 pg/ml (81,25–237,7 pg/ml) sans différence significative entre les deux sexes.(32)

5.2 Interprétation : valeurs anormales

- Dans les thrombopénies :

- chez les patients atteints de PTI, les taux de TPO sont normaux ou seulement légèrement élevés.(33)
- Le taux de TPO est diminué dans les maladies chroniques du foie.(34)
- Le taux de TPO est élevé dans les syndromes myélodysplasiques.(35)
- Le taux de TPO est élevé dans les aplasies médullaires et les thrombopénies post-chimiothérapie.(36)

- Dans les thrombocytose :

- Le taux de TPO est élevé dans les thrombocytoses essentielles et réactives(37), avec des différences mineures observées entre les patients atteints de thrombocytoses primaires et secondaires, ces derniers ayant des taux plus élevés.(38)

IV. Cytologie des liquides et appositions :

1 - Généralités :

Plusieurs types de liquides biologiques peuvent contenir, de façon normale ou anormale, des éléments cellulaires. L'analyse cytologique de ces liquides permet de dénombrer et caractériser ces cellules. À noter que, dans de nombreux cas, cet examen cytologique peut être complété utilement par une étude en cytométrie en flux. Les appositions consistent à effleurer la surface d'une lame de verre avec la tranche d'une pièce biopsique (en hématologie essentiellement un ganglion excisé et coupé ou une biopsie ostéoméduillaire) de manière à

déposer une couche des cellules composant ce tissu. L'examen cytologique après coloration permet alors de déterminer si l'échantillon est normal ou contient des éléments tumoraux.

2 – Indications :

les indications hématologiques varient selon les échantillons :

- liquide céphalo-rachidien: la plupart du temps, il s'agit du bilan d'extension d'une leucémie aiguë ou d'une suspicion de lymphome du système nerveux central.
- vitré : recherche d'un lymphome oculaire.
- lavage broncho-alvéolaire (LBA) : suspicion de syndrome lymphoprolifératif, de sarcoïdose, d'alvéolite allergique, de pneumonie à éosinophiles, de métastases d'une tumeur solide.
- liquide pleural, liquide d'ascite : suspicion de lymphome.
- ganglion : suspicion de lymphome, d'envahissement métastatique d'une tumeur solide.(39)

3 – Matériels :

1 – Échantillon de liquide ou d'apposition : Vous aurez besoin d'un échantillon de liquide corporel, tel que le liquide céphalorachidien, le liquide pleural, le liquide péritonéal, l'urine, le liquide synovial, ou d'un échantillon d'apposition, comme un frottis cutané ou un frottis d'une lésion. Cet échantillon doit être collecté dans un contenant approprié selon la nature du liquide ou de l'apposition.

2 – Lamelles de verre : Des lamelles de verre de taille standard sont utilisées comme supports pour étaler les échantillons de liquides ou d'appositions. Elles doivent être propres et non rayées.

3 – Lames de microscope : Des lames de microscope sont nécessaires pour déposer les échantillons de liquides ou d'appositions sur les lamelles de verre. Les lames de microscope doivent être propres et non rayées.

4 – Seringue et aiguille : Une seringue stérile et une aiguille fine peuvent être utilisées pour prélever les échantillons de liquides directement à partir de cavités corporelles, comme la cavité

pleurale ou péritonéale. Les seringues et les aiguilles doivent être manipulées avec soin pour éviter les blessures et les contaminations.

5 – Fixatif : Un fixatif approprié est utilisé pour fixer les cellules dans les échantillons et les préserver pour l'analyse cytologique. Le fixatif couramment utilisé est l'alcool éthylique absolu ou une solution de fixateur cytologique commercial.

6 – Colorants : Différents colorants cytologiques, tels que le colorant de Papanicolaou, le colorant de May-Grünwald-Giemsa (MGG) ou le colorant de Diff-Quik, sont utilisés pour colorer les échantillons et rendre les cellules plus visibles sous le microscope.

7 – Microscope : Un microscope optique est utilisé pour l'examen et l'analyse cytologique des échantillons. Le microscope doit être équipé d'objectifs de différents grossissements, généralement 10x, 40x et 100x, ainsi que d'un éclairage adapté.

8 – Logiciel d'imagerie ou appareil photo : Un logiciel d'imagerie intégré au microscope ou un appareil photo numérique peut être utilisé pour capturer des images des

4 – Mode opératoire :

1 – Préparation de l'échantillon :

- Les liquides non hémorragiques peuvent être recueillis sur tube sec sans anticoagulant.
- Les appositions doivent être faites très légèrement pour déposer une couche cellulaire la plus fine possible (monocellulaire) et sans mouvement latéral pour ne pas déformer les cellules.

2 – Préparation des appositions cytologiques :

- Placer une goutte de l'échantillon prélevé au centre d'une lame de verre propre et non endommagée.
- Utiliser la cytopspin ou la centrifugeuse à faible vitesse pour réaliser une apposition cytologique sur la lame de verre. La centrifugation permet de concentrer les cellules au centre de la lame, formant ainsi une monocouche.

3 – Fixation des échantillons :

- Immédiatement après la réalisation des appositions cytologiques, fixer les échantillons en les exposant à un fixateur approprié. Cela peut être réalisé en plaçant les lames dans un contenant rempli de fixateur ou en appliquant directement le fixateur sur les lames.
- Respecter le temps de fixation recommandé pour assurer une fixation adéquate des cellules.

4 – Coloration :

- Rincer les lames fixées à l'eau distillée pour éliminer l'excès de fixateur.
- Procéder à la coloration des lames à l'aide d'un colorant de cytologie approprié. Les frottis initiaux sont généralement colorés avec une coloration rapide, telle que la coloration Diff Quick, une coloration de Romanowsky modifiée. Les autres lames fixées dans une solution basique à base d'éthanol sont colorées avec la coloration de Papanicolaou. Suivre les instructions du fabricant pour la préparation et l'application du colorant.
- Laisser les lames colorées sécher à l'air ou utiliser une méthode de séchage appropriée.

5 – Observation microscopique :

- Examiner les lames colorées au microscope optique équipé d'un objectif à immersion d'huile et d'un système de visualisation en contraste de phase.
- Observer les cellules présentes dans l'échantillon, en se concentrant sur leur morphologie, leur taille, leur couleur et leur distribution.
- Effectuer une analyse systématique des différentes cellules pour identifier les anomalies ou les caractéristiques spécifiques.

Les trois types de colorants mentionnés, à savoir la coloration Diff Quick, la coloration de Papanicolaou et la coloration Hématoxyline-Éosine (HandE), sont couramment utilisés dans différents laboratoires de cytologie. Chacune de ces colorations présente des avantages et des inconvénients spécifiques pour l'observation et l'analyse des échantillons cytologiques. Par

exemple, la coloration Diff Quick est particulièrement utile pour la détection des micro-organismes, le cytoplasme et la coloration du matériel de fond. En revanche, la coloration de Papanicolaou est plus performante pour mettre en évidence les détails nucléaires, qui sont essentiels pour établir un diagnostic de malignité. (40)

5 – Résultats :

Normalement le LCR et le vitré sont acellulaires.

La composition normale d'un LBA est connue, comportant essentiellement des macrophages (~90 %), quelques lymphocytes T avec un rapport CD4/CD8 normal (~2), des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles.

Un épanchement pleural ou ascitique est par définition anormal mais peut ne contenir que des éléments inflammatoires réactionnels.(41)

V. Myélogramme :

1 – Généralités :

Le myélogramme est un examen cytologique permettant l'analyse qualitative et quantitative des cellules appartenant au compartiment des précurseurs médullaires hématopoïétiques. C'est un examen central fondamental dans la démarche diagnostique, la stadification et le suivi thérapeutique de la majorité des hémopathies.(42)

2 – Indications :

En générale, les indications du myélogramme sont conditionnées par la découverte d'anomalies de l'hémogramme (exploration d'une anémie arégénérative inexpiquée, d'une thrombopénie, leucopénie, bi- ou pancytopenie, découverte de blastes circulants)

Le myélogramme permet de détecter trois principales catégories d'anomalies :

- présence de cellules anormales (leucémies, lymphomes par exemple) ;
- anomalies quantitatives de répartition des lignées hématopoïétiques. Devant une cytopénie, le myélogramme permet de trancher entre une étiologie centrale ou périphérique, selon que la lignée concernée est quantitativement diminuée ou non dans la moelle ;
- anomalies qualitatives concernant la morphologie cellulaire (syndromes myélodysplasiques, carences vitaminiques ou autres causes de mégalo blastose, par exemple).

En dehors d'anomalies de l'hémogramme, le myélogramme fait aussi partie du bilan d'autres anomalies telles qu'un pic monoclonal, une splénomégalie ou le bilan d'extension médullaire d'une tumeur solide.(43)

3 – Matériels :

1 – Aiguille de prélèvement : Une aiguille spéciale appelée aiguille de Jamshidi est utilisée pour prélever l'échantillon de moelle osseuse. Cette aiguille est généralement munie d'une pointe creuse et d'une partie intérieure mobile pour faciliter l'extraction de la moelle osseuse.

2 – Seringue : Une seringue stérile est utilisée pour aspirer l'échantillon de moelle osseuse à travers l'aiguille de prélèvement. La taille de la seringue peut varier en fonction du volume de moelle osseuse nécessaire.

3 – Antiseptique : Un antiseptique, tel que de l'alcool ou de la solution d'iode, est utilisé pour nettoyer et désinfecter la peau à l'endroit où l'aiguille sera insérée. Cela réduit le risque d'infection.

4 – Anesthésique local : Un anesthésique local, tel que de la lidocaïne, peut être utilisé pour engourdir la peau et les tissus environnants avant l'insertion de l'aiguille. Cela aide à réduire l'inconfort et la douleur pour le patient.

5 – Tubes de prélèvement : Des tubes spécifiques contenant des anticoagulants, tels que l'EDTA (éthylène diamine tétra-acétique) ou l'héparine, sont utilisés pour recueillir l'échantillon de moelle osseuse. Ces anticoagulants empêchent la coagulation du sang et permettent une analyse ultérieure.

6 – Pansements : Des pansements stériles sont utilisés pour couvrir le site de ponction après le prélèvement de la moelle osseuse. Ils aident à prévenir les infections et à maintenir la zone propre.

7 – Microscope : Un microscope est utilisé pour examiner l'échantillon de moelle osseuse prélevé. Il permet d'observer les différentes cellules présentes et d'identifier d'éventuelles anomalies.

8 – Équipement de sécurité : Certains équipements de sécurité, tels que des gants, des lunettes de protection et des blouses, sont recommandés pour assurer la sécurité et la protection du personnel médical pendant la procédure.

4 – Mode opératoire :

1. Préparation du patient :

- Informer le patient sur la procédure et obtenir son consentement éclairé.
- Préparer le patient en position allongée, généralement sur le côté avec les genoux fléchis.

2. Préparation du matériel :

- Vérifier la disponibilité de tous les matériels nécessaires, y compris le microscope, les lames de verre, les aiguilles, les seringues, la solution anticoagulante, les tubes de prélèvement, les compresses stériles, etc.
- S'assurer que le microscope est correctement réglé et en bon état de fonctionnement.

3. Désinfection du site de ponction :

- Nettoyer soigneusement la peau du site de ponction à l'aide d'une solution désinfectante.
- Laisser la peau sécher ou tamponner doucement avec une compresse stérile.

4. Anesthésie locale (si nécessaire) :

- Si une anesthésie locale est prévue, administrer l'anesthésique local conformément aux protocoles et aux recommandations.

5. Ponction de la moelle osseuse :

- Utiliser une aiguille stérile et une seringue pour prélever l'échantillon de moelle osseuse. La ponction est généralement réalisée au niveau de l'os iliaque postérieur, mais d'autres sites peuvent être utilisés selon les besoins.
- Aspirer doucement la moelle osseuse dans la seringue, en évitant toute aspiration de sang périphérique.

6. Préparation des échantillons :

- Injecter l'échantillon de moelle osseuse prélevé dans un tube de prélèvement contenant une solution anticoagulante appropriée.
- Mélanger doucement le contenu du tube pour assurer une bonne homogénéisation.

7. Préparation des frottis :

- Placer une goutte de moelle osseuse sur une lame de verre propre et non endommagée.
- Étendre la goutte de moelle osseuse en réalisant un frottis uniforme en utilisant une autre lame de verre ou en effectuant une apposition cytologique à l'aide de la centrifugation.

8. Fixation et coloration des échantillons :

- Fixer les frottis de moelle osseuse dans un fixateur approprié. Cela peut être fait en plaçant les lames dans un contenant rempli de fixateur ou en appliquant directement le fixateur sur les lames.
- Respecter le temps de fixation recommandé pour assurer une fixation adéquate des cellules.
- Procéder à la coloration des lames avec un colorant approprié, tel que le May-Grünwald-Giemsa, pour visualiser les cellules de la moelle osseuse. (44)

9. Observation microscopique :

- Examiner les lames colorées au microscope optique avec un objectif à immersion d'huile.
- Observer les cellules présentes dans la moelle osseuse, en se concentrant sur leur morphologie, leur taille, leur couleur et leur.

5 – Résultats :

Le myélogramme ne donne pas de chiffres absolus, mais seulement des pourcentages de cellules médullaires. Il est donc important de préciser, outre la qualité du frottis, la présence d'anomalies qualitatives, sa richesse en cellules, appréciée au faible grossissement et généralement cotée en + (de + moelle pauvre à ++++ moelle particulièrement riche).

Le taux respectif des grandes lignées cellulaires tourne autour de 25 % pour la lignée rouge, de 60 % pour la lignée granuleuse (le rapport entre les deux lignées étant de 1/4 à 1/3), et de 20 % pour les éléments non myéloïdes.

• **Valeurs usuelles :**

La formule normale est proche de la suivante (en pourcentages) :

Paramètre	Enfant < 2 ans	Adulte
Hémoblastes (cellules indifférenciées)	2 à 4	1 à 2
Lignée granulocytaire		50 à 70
– Myéloblastes	0,5 à 1	0,5 à 2
– Promyélocytes	1 à 2	2 à 6
– Myélocytes neutrophiles	5 à 10	5 à 12
– Métamyélocytes	5 à 15	10 à 20
– Polynucléaires neutrophiles	15 à 20	15 à 30
Lignées basophile et éosinophile	1 à 4	1 à 4
Lignée rouge		15 à 30
– Proérythroblastes	0,5 à 2	0,5 à 2
– Érythroblastes basophiles	1 à 4	2 à 5
– Érythroblastes polychromatophiles	5 à 10	5 à 12
– Normoblastes	5 à 15	10 à 15
Lymphocytes, plasmocytes	30 à 50	5 à 15
Lignée monocyttaire	0,5 à 2	2 à 3

Fig 16: Valeurs normales du myélogramme

La lignée plaquettaire n'est pas comptée car les mégacaryocytes sont inégalement répartis selon les zones du frottis et rares. Ils sont recherchés dans les franges du frottis et leur présence est simplement signalée.(45)

Une étude récente de réévaluation de ces valeurs a été faite dont les résultats sont présentées ci-dessous :

Lineage and maturation	This study			
	Range (%)	Reference range (%)	Median (%)	Mean (%)
Erythroblasts (total)	8.5–56.5	15.8–46.2	32.0	31.7
Male	11.0–54.5	16.2–46.6	33.0	32.4
Female	8.5–56.5	15.6–45.0	29.5	30.1
Proerythroblast	0–5.0	0–3.0	0.5	0.6
Basophilic	0–21.0	0.5–13.5	3.5	4.5
Polychromatophilic	3.0–47.0	7.8–34.5	20.0	20.2
Orthochromatic	0–21.0	0.5–16.5	5.5	6.3
Granulocytes (total)	24.5–72.5	34.8–66.3	49.5	49.9
Male	26.0–70.5	35.5–64.5	49.5	49.7
Female	24.5–72.5	34.1–67.4	50.0	50.5
Neutrophils (total)				
Myeloblast	0–8.5	0–5.0	1.5	1.6
Promyelocyte	0–8.5	0–5.5	1.0	1.3
Myelocyte	1.0–31.7	5.8–24.0	13.5	13.7
Metamyelocyte	0.5–18.0	1.0–12.0	4.5	5.0
Band	2.0–34.0	6.5–26.2	14.5	15.2
Segmented	1.0–27.5	2.5–19.7	9.5	9.8
Eosinophils (total)	0–18.0	0.5–7.0	2.5	3.0
Basophils (and mast cells)	0–3.0	0–1.5	0	0.3
GE-ratio	0.5–5.9	0.8–4.1	1.6	1.7
Monocytes	0–8.5	0–6.0	2.0	2.2
ME ratio	0.6–6.2	0.8–4.1	1.6	1.8
Male	0.6–6.1	0.8–4.0	1.6	1.8
Female	0.6–6.2	0.8–4.2	1.7	2.0
Lymphocytes	1.0–38.5	5.5–23.2	13.2	13.6
Plasma cells	0–17.5	0–7.0	2.3	2.6

fig 17 : Résultats de réévaluation des valeurs normales du myélogramme(46)

VI. Diagnostic des hémopathies malignes (moelle ou sang) :

1 – Généralités :

Les hémopathies malignes sont des cancers qui se développent à partir des cellules sanguines, elles regroupent des pathologies très hétérogènes parfois difficiles à classer.

Une classification, basée sur le tissu d'origine de la prolifération, myéloïde ou lymphoïde, a été adoptée en 2000 sous l'égide de l'Organisation mondiale de la santé puis traduite dans la 3^e édition de la Classification internationale des maladies pour l'oncologie.(47)

2 – Indications :

- Des symptômes tels qu'une fatigue persistante, des douleurs osseuses, des sueurs nocturnes, des ecchymoses ou saignements inhabituels, une perte de poids inexplicquée, une fièvre prolongée, etc.
- Des anomalies détectées lors d'examens sanguins, tels qu'une anémie, une augmentation ou une diminution inexplicquée des globules blancs ou des plaquettes, etc.
- Des antécédents familiaux d'hémopathies malignes.
- Des antécédents de traitements antérieurs (chimiothérapie, radiothérapie) augmentant le risque de développer une hémopathie maligne.
- Des facteurs de risque tels que l'exposition à des produits toxiques ou à des radiations, une infection virale chronique (par exemple, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou le virus de l'hépatite C (VHC)), etc.

3 – Matériels :

1 – Des tubes spécifiques contenant des anticoagulants ou des agents de stabilisation sont utilisés pour recueillir les échantillons de Sang, moelle osseuse, ganglions, tumeurs, épanchements.(48)

Les types de tubes varient en fonction des analyses spécifiques qui seront effectuées sur les échantillons.

2 – Aiguilles et seringues : Des aiguilles stériles et des seringues sont utilisées pour prélever des échantillons de sang veineux, de moelle osseuse ou de tissus. Différentes tailles d'aiguilles peuvent être nécessaires en fonction des prélèvements.

3 – Lancettes : Des lancettes stériles sont utilisées pour prélever des échantillons de sang capillaire, généralement à partir du bout du doigt, pour des tests spécifiques tels que la numération des cellules sanguines.

4 – Contenants d'échantillons : Des contenants d'échantillons stériles et étiquetés sont nécessaires pour stocker les échantillons prélevés, qu'il s'agisse de tubes à essai, de flacons ou de récipients spécifiques recommandés pour chaque type d'échantillon.

5 – Réactifs de laboratoire : Différents réactifs de laboratoire sont utilisés pour effectuer des tests spécifiques dans le cadre du diagnostic des hémopathies malignes. Ces réactifs peuvent inclure des colorants, des anticorps, des enzymes et d'autres produits chimiques nécessaires à l'identification des anomalies cellulaires.

6 – Microscope : Un microscope optique est utilisé pour examiner les échantillons de sang, de moelle osseuse ou de tissus. Le microscope doit être équipé d'objectifs de différents grossissements, de sources de lumière appropriées et éventuellement d'un système de caméra pour l'imagerie.

7 – Équipement d'analyse automatisé : Dans certains laboratoires, des équipements d'analyse automatisés sont utilisés pour effectuer des tests spécifiques tels que l'immunophénotypage par cytométrie en flux ou les analyses moléculaires.

8 – Documentation et systèmes informatiques : Des outils de documentation appropriés, tels que des cahiers de laboratoire et des systèmes informatiques de gestion des

4 –Recommandations pour la qualité du prélèvement :

Prélèvement sur tube EDTA, sans autre condition particulière.

Moelle osseuse : limiter au maximum l'hémodilution en ne prélevant que le volume minimal requis.

Pas d'anticoagulant pour les épanchements. Biopsies à l'état frais en anatomocytopathologie qui peut éventuellement réaliser des appositions et/ou demander une cytométrie en flux avant de réaliser la fixation et l'inclusion en paraffine pour examen de coupes tissulaires.

5 - Principe méthodologique :

Cytologie, immunophénotypage (49), cytogénétique, biologie moléculaire.

Selon la suspicion d'une hémopathie, il sera nécessaire de réaliser un ou plusieurs examens complémentaires pour établir un diagnostic précis. Pour les cas de leucémies aiguës, ces quatre examens sont obligatoires. En revanche, le diagnostic d'une leucémie lymphoïde chronique peut être établi avec un simple immunophénotypage sur le sang périphérique. D'autres examens ne seront nécessaires que si la maladie évolue et qu'un traitement doit être envisagé.

VII. Vitesse de sédimentation :

1 - Généralités

La vitesse de sédimentation (VS) (ou erythrocyte sedimentation rate, ESR) est un marqueur historique(50), mais non spécifique de l'inflammation. Sa valeur correspond à la hauteur de plasma surmontant les éléments figurés du sang après incubation pendant 1 heure dans un tube vertical calibré.(51)

2 - Indications :

- Établir un diagnostic : comme dans le cas de la pseudopolyarthrite rhizomélique ou l'artérite temporale (maladie de Horton)(52)(53)
- Surveillance de l'évolution d'une maladie ou de la réponse au traitement : l'artérite temporale, pseudopolyarthrite rhizomélique, la polyarthrite rhumatoïde et, éventuellement, la maladie de Hodgkin.(54)(55)

- Oncologie : Il a été constaté qu'une VS élevée était en corrélation avec un mauvais pronostic général pour divers types de cancer, notamment la maladie de Hodgkin, le carcinome gastrique, le carcinome à cellules rénales, la leucémie lymphocytaire chronique, le cancer du sein, le cancer colorectal et le cancer de la prostate.(56)(57)
- Distinguer la carence en fer de l'anémie due à une maladie chronique : La vitesse de sédimentation peut être utile pour différencier la carence en fer de l'anémie d'une maladie chronique chez les patients souffrant d'une maladie inflammatoire chronique telle que l'arthrite rhumatoïde.(58)(59)
- Dépistage d'une maladie systémique ou d'une néoplasie : Malheureusement, la VS n'est ni sensible ni spécifique lorsqu'il est utilisé comme test de dépistage général.(60)(61)(62)
- Dépistage des infections dans des contextes cliniques spécifiques : Des études ont évalué la VS en tant qu'un test de dépistage des infections dans des cas cliniques spécifiques tels que les infections associées aux prothèses orthopédiques, les infections bactériennes pédiatriques et les maladies inflammatoires gynécologiques.(63)(64)(65)
- Utile comme indice de maladie chez les personnes âgées : Certains auteurs ont proposé que l'ESR soit utilisé comme un "indice de maladie" peu coûteux chez les personnes âgées.(66)(67)

3 – Matériels :

1 – Tubes à sédimentation : Des tubes à sédimentation spéciaux, également appelés tubes de Westergren ou tubes de wintrobe, sont utilisés pour effectuer l'analyse de la vitesse de sédimentation. Ces tubes sont étroits et gradués, permettant de mesurer précisément la distance parcourue par les globules rouges pendant la sédimentation.

2 – Sang total : Un échantillon de sang total est nécessaire pour réaliser l'analyse de la vitesse de sédimentation. Le sang peut être prélevé à partir d'une veine, généralement au niveau du bras, en utilisant une aiguille stérile et une seringue.

3 – Anticoagulant : Pour éviter la coagulation du sang pendant l'analyse, un anticoagulant, tel que l'EDTA (éthylène diamine tétra-acétique), est ajouté à l'échantillon de sang dans le tube à

sédimentation. L'anticoagulant empêche la formation de caillots sanguins et permet aux globules rouges de sédimenter librement.

4 – Support vertical : Un support vertical, tel qu'un support de tube à sédimentation ou un porte-tubes, est utilisé pour maintenir les tubes de Westergren ou de wintrobe en position verticale pendant la procédure. Cela permet aux globules rouges de se déposer au fond du tube sans être perturbés.

5 – Minuterie : Une minuterie ou un chronomètre est utilisé pour mesurer la durée exacte de la sédimentation. La durée typique pour l'analyse de la vitesse de sédimentation est d'une heure, bien que des variations de temps puissent être utilisées en fonction du protocole spécifique.

6 – Règle millimétrée : Une règle millimétrée est utilisée pour mesurer la distance de sédimentation. La règle est placée à côté du tube à sédimentation et permet de mesurer la distance parcourue par la colonne de globules rouges après un certain laps de temps.

7 – Conditions de température contrôlée : Pour obtenir des résultats précis, il est important de réaliser l'analyse de vitesse de sédimentation à une température contrôlée, généralement à 20–25 °C. Un thermomètre peut être utilisé pour vérifier et maintenir la température ambiante appropriée.

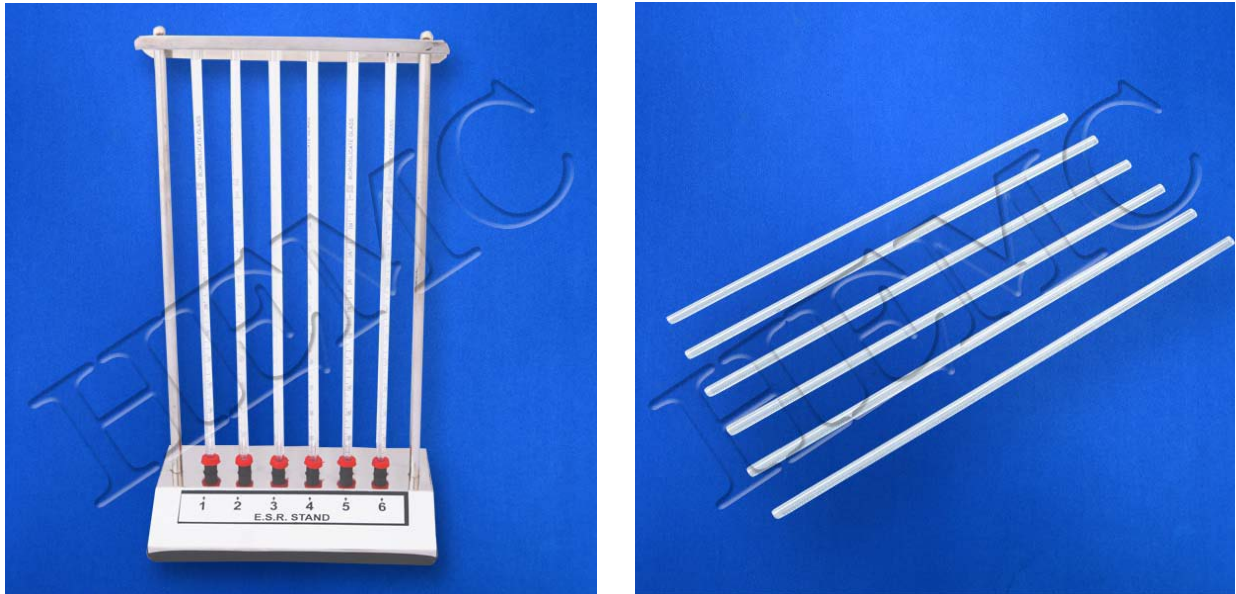


Fig 18 : Support et tubes de Westergren (68)

4 - Mode opératoire :

Diverses méthodes de détermination de la VS ont été mises au point. Actuellement, la méthode Westergren est recommandée par le Comité international de normalisation en hématologie.

• Méthode Westergren :

La méthode standard de Westergren utilise la procédure suivante :

1. Diluer le sang veineux dans une proportion de 4:1 avec du citrate de sodium anticoagulant.
2. Introduire dans un tube de verre de 200 mm de long et de 2,5 mm de diamètre interne (tube de Westergren).
3. Laisser reposer en position verticale pendant 1 heure.
4. Au bout d'une heure, la distance entre le ménisque et le sommet de la colonne d'érythrocytes est enregistrée comme étant la VS, et exprimée en mm/heure

• La méthode de Westergren modifiée :

Utilise l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) plutôt que le citrate de sodium comme anticoagulant et est plus pratique car le même tube de sang peut être utilisé pour d'autres

études hématologiques. La méthode standard et la méthode modifiée donnent des résultats identiques.(69)(70)

• **Méthode Wintrobe :**

La deuxième méthode la plus utilisée est la méthode de Wintrobe. Cette méthode est réalisée avec un tube de 100 mm (tube de Wintrobe) contenant de l'oxalate comme anticoagulant. Elle est plus sensible que la méthode de Westergren pour les valeurs "normales" à "légèrement élevées" ; cependant, pour des valeurs plus élevées, le tube court conduit à des lectures relativement insensibles en raison de l'entassement des cellules.(71)

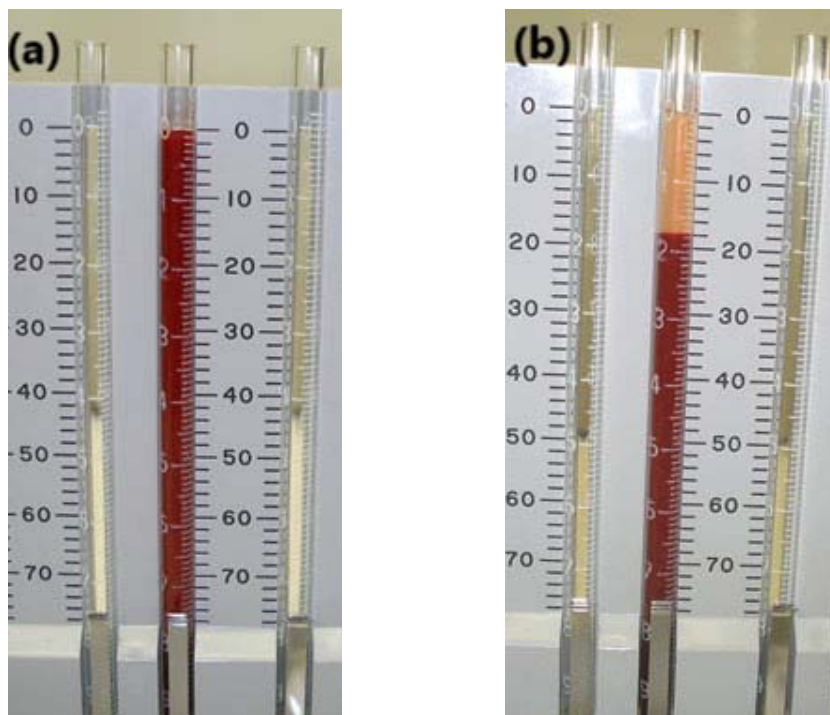


Fig 19: (a) L'image montre un portoir contenant des tubes Wintrobe, dans lesquels du sang total anticoagulé vient d'être ajouté, (Temps : 0)

(b) Les globules rouges se sont déposés, laissant le plasma en haut du tube. Lecture : 18 mm/heure (Temps : une heure) (72)

5 - Résultats :

5 – 1 Résultats normaux :

• Les valeurs normales de la vitesse de sédimentation des érythrocytes (VS), obtenues par la méthode de Westergren, sont les suivantes :(73)(74)

Homme <50 ans \leq 15 mm/hr

Femme <50 ans \leq 20 mm/hr

Homme >50 ans \leq 20 mm/hr

Femme >50 ans \leq 30 mm/hr

Enfant \leq 10 mm/hr(75)

• La VS est généralement plus élevée chez les femmes que chez les hommes et augmente progressivement avec l'âge.(76)

5 – 2 Interpretation : Résultats anormaux

• Vitesse de sédimentation augmentée :

- Intoxication et inflammation dû aux métaux lourds(77)
- Toutes les maladies du collagène(78)
- Carcinome(79)
- Destruction de cellules ou de tissus
- Arthrite goutteuse(80)
- Infections(81)
- Maladies inflammatoires(82)
- Leucémie(83)
- Myélome multiple(84)
- Infarctus du myocarde(85)
- Pneumonie(86)
- Polyarthrite rhumatoïde(87)
- Syphilis(88)
- Toxémie

• Vitesse de sédimentation diminuée :

- Insuffisance cardiaque congestive (taux de la VS est corrélé avec la sévérité de la maladie)(89)
- Polycythémie
- Drépanocytose en dehors de crise vaso-occlusives.(90)(91)(92)



*CYTOMETRIE
EN FLUX*

A – Phénotypage des cellules anormales (moelle ou sang) :

1 – Généralités :

L'immunophénotypage par cytométrie en flux reste un outil indispensable pour le diagnostic, la classification, la stadification et le suivi des néoplasmes hématologiques. Au cours des dix dernières années, l'instrumentation de cytométrie en flux a progressé et une gamme élargie d'anticorps et de fluorochromes a été mise à disposition, ce qui a amélioré notre capacité à identifier différentes populations de cellules normales et à reconnaître les aberrations phénotypiques, même lorsqu'elles sont présentes dans une petite proportion des cellules analysées. Des populations phénotypiquement anormales ont été documentées dans de nombreux néoplasmes hématologiques, notamment les lymphomes, les leucémies lymphoïdes chroniques, les néoplasmes plasmocytaires, les leucémies aiguës, l'hémoglobinurie paroxystique nocturne, Syndrome d'activation des mastocytes, les syndromes myélodysplasiques et les troubles myéloprolifératifs.(93)

2 – Indications :

L'immunophénotypage par cytométrie en flux permet de préciser l'origine cellulaire d'une prolifération cellulaire (myéloïde ou lymphoïde) ainsi que son degré de différenciation (cellules immatures ou différenciées), réalisant une évaluation rapide et fiable des sous-populations cellulaires sur des prélèvements sanguins, médullaires ou dans des liquides de ponction, il constitue aujourd'hui une étape essentielle dans le diagnostic et le suivi de la majorité des hémopathies malignes, des leucémies aiguës (myéloïde,lymphoblastique), des syndromes lymphoprolifératifs chroniques, maladie résiduelle minimale et des déficits immunitaires héréditaires et acquis.(94)

3 – Matériels :

1 – Cytomètre en flux : Un cytomètre en flux est l'instrument principal utilisé pour effectuer l'analyse du phénotype des cellules anormales. Le cytomètre en flux dont les composants essentiels sont: l'optique (excitation et collecte), la fluidique, le réseau électronique (détecteurs) et l'ordinateur(95) utilise des lasers pour exciter les fluorochromes présents sur les cellules, permettant ainsi de mesurer et d'analyser différentes caractéristiques cellulaires.

2 – Anticorps fluorescents : Des anticorps fluorescents spécifiques sont utilisés pour marquer et identifier différentes populations cellulaires dans l'échantillon. Les anticorps sont conjugués à des fluorochromes spécifiques qui émettent une fluorescence lorsqu'ils sont excités par les lasers du cytomètre en flux. Différents anticorps peuvent être utilisés pour cibler des marqueurs spécifiques présents sur les cellules anormales.

3 – Tubes de prélèvement : Des tubes stériles sont utilisés pour collecter l'échantillon de moelle osseuse ou de sang à analyser. Ces tubes doivent être adaptés au cytomètre en flux et doivent être compatibles avec les anticorps fluorescents utilisés.

4 – Tampon de coloration : Un tampon de coloration, également appelé tampon de lyse, est utilisé pour éliminer les globules rouges non pertinents de l'échantillon et pour préparer les cellules pour l'analyse. Le tampon de coloration contient des agents de lyse qui dissolvent les globules rouges tout en préservant les autres cellules.

5 – Réactifs de lavage : Des réactifs de lavage, tels que des tampons de phosphate saliné (PBS), sont utilisés pour effectuer des lavages cellulaires afin d'éliminer les résidus de tampon de coloration et de réduire les interférences lors de l'analyse.

6 – Échantillon de contrôle positif : Un échantillon de contrôle positif contenant des cellules exprimant les marqueurs attendus est utilisé pour calibrer et vérifier les performances du cytomètre en flux.

7 – Filtres optiques : Des filtres optiques spécifiques sont utilisés dans le cytomètre en flux pour séparer les différentes longueurs d'onde de fluorescence émises par les fluorochromes utilisés. Ces filtres permettent de détecter et de mesurer les signaux fluore



fig 20: Tampon phosphate salin (96)

4 – Mode opératoire :

La fluidique est chargée de diriger les particules contenant du liquide vers la source lumineuse focalisée.

L'optique d'excitation focalise la source lumineuse sur les cellules/particules tandis que l'optique de collecte transmet la diffusion de la lumière ou la lumière fluorescente de la particule à un réseau électronique.

Le réseau électronique détecte le signal et le convertit en données numériques proportionnelles à l'intensité de la lumière.

L'ordinateur est également nécessaire pour analyser les données.

Des discussions plus complexes sur les aspects techniques des cytomètres de flux ont fait l'objet de diverses publications.(97)(98)(99)(100)

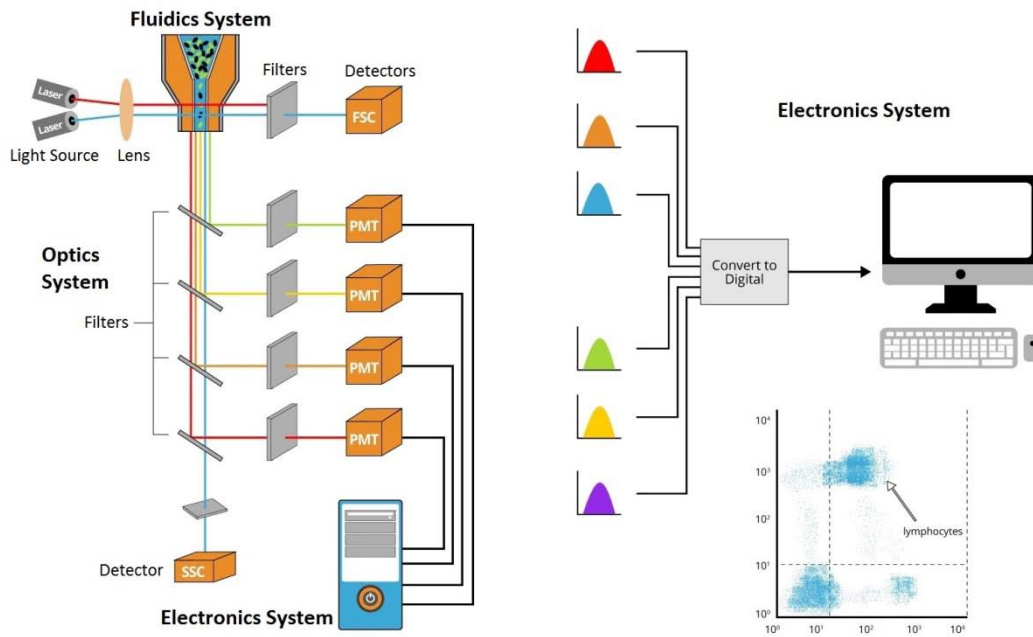


Fig 21 : Principe de cytométrie en flux

⇒ Les étapes :

1. Préparation des réactifs :

- Vérifier la qualité et la validité des réactifs d'anticorps utilisés, en vous assurant qu'ils sont spécifiques aux marqueurs cellulaires d'intérêt.
- Préparer les réactifs en suivant les instructions du fabricant, tels que la dilution appropriée dans le milieu de suspension cellulaire.

2. Préparation de l'échantillon :

- Prélever l'échantillon contenant les cellules anormales, en respectant les bonnes pratiques de prélèvement.
- Traiter l'échantillon selon les procédures appropriées pour la préparation des cellules, telles que l'extraction des cellules du tissu ou la lyse des globules rouges dans le cas du sang.

3. Marquage des cellules :

- Ajouter les réactifs d'anticorps spécifiques aux cellules anormales préparées, en respectant les conditions de température et de durée d'incubation appropriées.

- Mélanger doucement les cellules avec les réactifs d'anticorps pour assurer un marquage uniforme.

4. Lavage des cellules :

- Rincer les cellules marquées à l'aide du milieu de suspension cellulaire pour éliminer l'excès de réactifs d'anticorps non liés.

- Centrifuger les cellules à une vitesse et une durée appropriées pour former un culot cellulaire compact.

5. Analyse par cytométrie de flux :

- Charger le culot cellulaire dans le cytomètre en flux, en veillant à ajuster les paramètres de débit et de concentration de cellules conformément aux recommandations du fabricant.

- Acquérir les données de fluorescence pour chaque marqueur cellulaire en utilisant le laser et les détecteurs appropriés.

- Analyser les données de cytométrie de flux à l'aide d'un logiciel d'analyse approprié, en identifiant les populations cellulaires d'intérêt et en évaluant l'expression des marqueurs spécifiques.

6. Interprétation des résultats :

- Comparer les profils d'expression des marqueurs cellulaires des cellules anormales avec les populations cellulaires de référence pour évaluer les différences et les caractéristiques spécifiques.

- Interpréter les résultats en tenant compte du contexte clinique et des connaissances pertinentes sur les maladies ou les conditions associées.

7. Nettoyage et entretien :

- Nettoyer soigneusement le cytomètre en flux après utilisation, en suivant les procédures de nettoyage recommandées par le fabricant.

- Entretien régulièrement l'instrument conformément aux recommand

5 – Résultats :

• **Syndromes lymphoprolifératifs B :**

Dans l'analyse des cellules B, la clonalité peut être déterminée en évaluant le ratio d'expression des chaînes légères d'immunoglobulines kappa et lambda. Normalement, ce ratio est de 2/3 kappa pour 1/3 lambda. Un déséquilibre significatif de ce ratio peut indiquer une clonalité des cellules B.

Certains marqueurs spécifiques peuvent orienter le diagnostic de différents types de lymphomes ou de leucémies lymphoïdes. Par exemple, l'expression de CD10 est souvent associée aux lymphomes folliculaires, tandis que CD5 est observé dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et le lymphome du manteau. Une triple expression de CD103, CD11c et CD25 peut être caractéristique de la leucémie à tricholeucocytes.

Pour le diagnostic précis de la LLC, des scores spécifiques peuvent être utilisés. Le score de Matutes ou de Moreau est calculé en évaluant différents critères cytologiques et immunophénotypiques pour déterminer la probabilité de la présence de la LLC :

1 point	0 point
Chaîne légère faible ou négative en surface	Chaîne légère d'intensité normale
CD5+	CD5-
CD23+	CD23-
FCM7-	FMC7+
CD79a (Moreau) ou CD22 (Matutes) : - ou faible	CD79a+ ou CD22+

fig 22 : Score de Matutes

Un score élevé (4/5 ou 5/5) correspond à une LLC, les autres syndromes lymphoprolifératifs ayant un score inférieur ou égal à 3/5. (105)

• **Syndromes lymphoprolifératifs T et NK :**

- Le diagnostic de ces pathologies est plus complexe et nécessairement multi-disciplinaire.
- La clonalité des cellules T peut être appréhendée en CMF par l'étude du répertoire V-beta du TCR, à la recherche de l'utilisation sélective d'une sous-famille. La perte d'expression d'un antigène pan-T ou « trou phénotypique » est également un argument en faveur de la malignité.

• **Leucémies aiguës :**

La CMF permet de confirmer la nature blastique des cellules par l'expression de marqueurs d'immaturité, et de déterminer leur lignée : lymphoïde B, T, ou myéloïde, dont va dépendre la prise en charge thérapeutique. C'est également une technique cruciale pour le diagnostic de certaines entités rares (leucémie à cellules dendritiques, biphénotypique, peu différenciée...).(101)

	Marqueurs principaux
Lignée lymphoïde B	CD19, CD20, CD22, chaînes d'immunoglobulines lourdes et légères
Lignée lymphoïdes T (et NK)	CD3, CD5, CD2, CD7, CD4/CD8, TCR (CD16, CD56)
Lignées myéloïdes	MPO, CD13, CD33, CD117
Marqueurs d'immaturité	CD34, CD45 faible, CD38, HLA-DR

Fig 23: Marqueurs principaux de la lignée lymphoïde B, T, myéloïdes et marqueurs d'immaturité

(105)

B – Quantification des cellules CD34+:

1 – Généralités :

CD34 est une molécule de surface exprimée sur une faible proportion des cellules hématopoïétiques de morphologie indifférenciée, en particulier d'origine médullaire. Les cellules

morphologiquement reconnaissables, précurseurs des lignées myéloïdes et érythroïdes, en particulier, n'expriment pas cette molécule. Les différentes populations de progéniteurs hématopoïétiques, identifiables dans des tests fonctionnels, sont au contraire majoritairement ou exclusivement présentes au sein de la population CD34+.(102)

Alors elle permet d'évaluer la capacité de reconstitution hématopoïétique de l'échantillon cellulaire testé.

2 – Indications :

- effectuer une cytophérèse de cellules souches périphériques(103). La quantification des cellules CD34 est effectuée avant de réaliser une autogreffe de cellules souches périphériques ou chez un donneur sain avant allogreffe de CSP.
- Déterminer la qualité hématopoïétique d'un greffon prélevé (104);
- Déterminer la valeur pronostique du nombre de cellules CD34+ dans le sang d'un patient atteint de myélofibrose primitive, où Le nombre de cellules CD34+ circulantes est considérablement élevées.(105)

3 – Matériels :

1 – Cytomètre de flux(106): Un cytomètre en flux est l'instrument principal utilisé pour effectuer l'analyse de quantification des cellules CD34+. Le cytomètre en flux utilise des lasers pour exciter

les fluorochromes spécifiques présents sur les cellules CD34+ et permet de mesurer et d'analyser leur présence et leur quantité.

2 – Anticorps fluorescents CD34 : Des anticorps fluorescents spécifiques ciblant le marqueur de surface CD34 sont utilisés pour marquer et identifier les cellules CD34+ dans l'échantillon. Les anticorps sont conjugués à des fluorochromes qui émettent une fluorescence lorsqu'ils sont excités par les lasers du cytomètre en flux.

3 – Tubes de prélèvement : Des tubes stériles sont utilisés pour collecter l'échantillon de cellules à analyser : Sang sur EDTA, greffon hématopoïétique (moelle osseuse)(107) .Ces tubes doivent être adaptés au cytomètre en flux et doivent être compatibles avec les anticorps fluorescents utilisés.

4 – Tampon de lavage : Un tampon de lavage, tel qu'un tampon phosphate saliné (PBS), est utilisé pour effectuer des lavages cellulaires afin d'éliminer les résidus et les interférences lors de l'analyse. Le tampon de lavage aide également à maintenir la viabilité des cellules pendant la procédure.

5 – Réactif de lyse des globules rouges : Si l'échantillon contient des globules rouges, un réactif de lyse des globules rouges peut être utilisé pour éliminer les globules rouges non pertinents et préparer les cellules pour l'analyse des cellules CD34+.

6 – Échantillon de contrôle positif : Un échantillon de contrôle positif contenant des cellules CD34+ connues est utilisé pour calibrer et vérifier les performances du cytomètre en flux, ainsi que pour établir les seuils de détection des cellules CD34+.

7 – Filtres optiques : Des filtres optiques spécifiques sont utilisés dans le cytomètre en flux pour séparer les différentes longueurs d'onde de fluorescence émises par les fluorochromes utilisés. Ces filtres permettent de détecter et de mesurer les signaux fluorescents provenant des anticorps CD34.

8 – Logiciel d'analyse : Un logiciel d'analyse dédié est utilisé pour trait



Fig 24 : Kit de Quantification des cellules CD34+ (108)

4 – Mode opératoire :

Cytométrie en flux : Cette méthode utilise des anticorps (par exemple : 8G12 monoclonal antibodies) marqués par un fluorescent (par exemple : fluorescein isothiocyanate and phycoerythrin) qui se lient aux cellules CD34+.

Les cellules sont ensuite analysées en flux par un appareil qui mesure la fluorescence et la dispersion de la lumière pour quantifier les cellules CD34+.

Cette méthode est rapide, précise et permet de quantifier les cellules en fonction de leur niveau d'expression de CD34.(109)

⇒ Les étapes :

1. Préparation de l'échantillon :

- Prélever l'échantillon de cellules à analyser, par exemple, Sang sur EDTA, greffon hématopoïétique (pour les cytophèreses ou la greffe de cellules hématopoïétiques Médullaires)
- Ajouter un anticoagulant approprié pour empêcher la coagulation de l'échantillon.

2. Marquage des cellules :

- Préparer un mélange d'anticorps monoclonal spécifique (par exemple, 8G12) marqués par un fluorescent (comme le fluorescein isothiocyanate ou le phycoérythrine) qui se lient spécifiquement aux cellules CD34+.
- Ajouter les anticorps marqués à l'échantillon et incuber pendant une période déterminée.

3. Lavage des cellules :

- Ajouter un tampon de lavage approprié pour éliminer l'excès d'anticorps non lié et les contaminants.
- Effectuer une centrifugation pour précipiter les cellules et éliminer le tampon de lavage.

4. Acquisition des données :

- Charger l'échantillon marqué dans le cytomètre de flux.

- Calibrer l'instrument en utilisant des sphères de calibration de taille connue.
- Définir les paramètres d'acquisition appropriés, tels que la vitesse d'écoulement, la puissance du laser et les filtres de détection.
- Acquérir les données en collectant les événements uniques de cellules marquées avec les anticorps CD34+.

5. Analyse des données :

- Utiliser un logiciel d'analyse de cytométrie de flux pour traiter les données acquises.
- Définir des seuils de positivité en fonction des populations de contrôle appropriées.
- Analyser les données pour quantifier les cellules CD34+ présentes dans l'échantillon.

5 – Résultats :

- Le marqueur CD34 peut prédire la capacité de régénération à partir des cellules souches hématopoïétiques. On sait actuellement qu'un « bon » greffon de moelle contient 3 à 5 x 10⁶ cellules CD34+ par kg de receveur.(110)
- Pour évaluer la qualité de la mobilisation des cellules souches dans le sang périphérique du donneur avant collecte par cytophérèse. Un minimum de 10 cellules CD34+/mm³ de sang est requis pour débiter la collecte.

C – Hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) :

1 – Généralités :

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN), ou maladie de Marchiafava et Micheli, est une maladie rare de la cellule souche hématopoïétique, due à une mutation somatique acquise du gène *PIG-A*.

La triade clinique classique associe une hémolyse intravasculaire, une hypoplasie médullaire de degré variable et des thromboses. Les progrès réalisés ces dernières années par la cytométrie en flux en font l'outil diagnostique de référence, par une mise en évidence du déficit des molécules GPI liées. (111)

2 – Indications :

- Hémolyse intravasculaire mise en évidence par une hémoglobinurie ou une élévation de l'hémoglobine plasmatique.
- Preuve d'hémolyse inexpliquée avec :
 - carence en fer, OU Douleur abdominale OU spasme œsophagien, OU Thrombose OU Granulocytopénie et/ou thrombocytopénie
- Autre anémie hémolytique acquise non schistocytaire non infectieuse à Coombs négatif
- Thrombose présentant des caractéristiques inhabituelles :

A) Sites inhabituels :

- Veines hépatiques (syndrome de Budd–Chiari)
- Autres veines intra–abdominales (portales, spléniques, , splanchnique)
- Sinus cérébraux
- Veines dermiques

B) Avec des signes d'anémie hémolytique

C) Avec cytopénie inexpliquée

- Preuve d'une insuffisance de la moelle osseuse :
 - Anémie aplasique ou hypoplasique suspectée ou prouvée
 - Cytopénie réfractaire avec dysplasie unilinéaire
 - Autres cytopénies d'étiologie inconnue après un bilan adéquat(112)

3 – Matériels :

1 – Cytomètre en flux : Un cytomètre en flux est l'instrument principal utilisé pour effectuer l'analyse de l'HPN. Le cytomètre en flux utilise des lasers pour exciter les

fluorochromes spécifiques présents sur les cellules et permet de mesurer et d'analyser leur présence et leur quantité.

2 – Anticorps fluorescents : Des anticorps fluorescents spécifiques sont utilisés pour marquer et identifier les différentes populations cellulaires dans l'échantillon. Pour l'analyse de l'HPN, des anticorps ciblant les marqueurs de surface tels que le CD55 (protectine) et le CD59 (glycophorine A) sont utilisés. Les anticorps sont conjugués à des fluorochromes qui émettent une fluorescence lorsqu'ils sont excités par les lasers du cytomètre en flux.

3 – Tubes de prélèvement : Des tubes stériles sont utilisés pour collecter l'échantillon de sang ou d'urine à analyser. Ces tubes doivent être adaptés au cytomètre en flux et doivent être compatibles avec les anticorps fluorescents utilisés.

4 – Tampon de lavage : Un tampon de lavage, tel qu'un tampon phosphate saliné (PBS), est utilisé pour effectuer des lavages cellulaires afin d'éliminer les résidus et les interférences lors de l'analyse. Le tampon de lavage aide également à maintenir la viabilité des cellules pendant la procédure.

5 – Réactif de lyse des globules rouges : Si l'échantillon contient des globules rouges, un réactif de lyse des globules rouges peut être utilisé pour éliminer les globules rouges non pertinents et préparer les cellules pour l'analyse de l'HPN.

6 – Échantillon de contrôle positif : Un échantillon de contrôle positif contenant des cellules HPN connues, qui présentent une absence ou une diminution des marqueurs CD55 et CD59, est utilisé pour calibrer et vérifier les performances du cytomètre en flux, ainsi que pour établir les seuils de détection.

7 – Filtres optiques : Des filtres optiques spécifiques sont utilisés dans le cytomètre en flux pour séparer les différentes longueurs d'onde de fluorescence émises par les fluorochromes utilisés. Ces filtres permettent de détecter

4 – Mode opératoire :

En CMF multiparamétrique, le clone est recherché en première intention sur les leucocytes avec des marqueurs de fenêtrage (CD45 Ag pan-leucocytaire, CD15 pour les polynucléaires [PN], CD33 ou CD64 pour les monocytes [MN]) associés à des marqueurs « GPI liés » tels que CD24 ou CD16 (à noter que les éosinophiles n'expriment pas CD16) pour les polynucléaires et CD14 pour les monocytes.

FLAER, toxine bactérienne, couplée à un fluorochrome, marque toutes les molécules « GPI liées » et est recommandée dans ces combinaisons.

CD157 est aussi informatif sur les polynucléaires et les monocytes. Dans un second temps, une recherche est effectuée sur les hématies avec CD235 (glycophorine A) pour le fenêtrage et CD55 + CD59.

Les lymphocytes ou les basophiles sont utilisés comme contrôles internes positifs.(113)

5 – Résultats :

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de cellules négatives (importance relative des clones dans la population étudiée).

La sensibilité de la cytométrie en flux (1 % est obtenue avec 2/3 marqueurs pour diagnostiquer l'HPN classique. La haute sensibilité (0,01 %), avec 5 marqueurs, nécessite l'analyse de plus de 200 000 cellules pour avoir un nuage de 20 cellules en cas de positivité)(114) dans le diagnostic d'un déficit des molécules GPI permet de détecter des clones dont l'importance n'excède pas quelques pour-cent. En pratique, pour la majorité des molécules étudiées, un déficit peut être considéré comme significatif lorsque le pourcentage de cellules négatives est supérieur à 5%.(115)

D – Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux :

1 – Généralités :

Une variété de méthodes cytométriques pour analyser la progression du cycle cellulaire ont été développées au cours des trois dernières décennies. Ces méthodes peuvent être regroupées en trois catégories :

Dans la première, on trouve les méthodes qui reposent sur une mesure cellulaire à un seul moment ("snapshot").

Cette analyse peut être soit univariée, généralement basée seulement sur la mesure du contenu en ADN cellulaire(116), soit multivariée (multiparamètre), lorsqu'en plus de la teneur en ADN, un autre attribut cellulaire est mesuré(117)(118)(119).

Le deuxième groupe comprend les méthodes qui reposent sur des mesures temporelles de populations cellulaires synchronisées dans le cycle ou dont la progression dans le cycle a été stoppée par l'agent qui les a arrêtées à un point spécifique du cycle. Ces méthodes révèlent la cinétique de la progression des cellules dans le cycle. Un exemple de ces méthodes est l'approche stathmocinétique, dans laquelle les cellules sont arrêtées en mitose, par exemple par la vinblastine ou le colcemide, et le taux d'entrée des cellules en mitose (taux de "naissance des cellules") est estimé à partir de la pente représentant une augmentation cumulative du pourcentage de cellules mitotiques en fonction de la durée de l'arrêt(120).

Les méthodes de la troisième catégorie sont basées sur la détection de l'incorporation de l'analogue de la thymidine 5'-bromo-2'-désoxyuridine, souvent associée à des mesures de la teneur en ADN. Il peut s'agir de mesures en un seul point dans le temps ou d'une stratégie de laps de temps.

La thymidine 5'-bromo-2'-désoxyuridine incorporée est détectée soit par cytochimie, grâce à l'utilisation de colorants d'ADN, tels que le Hoechst 33258, dont la fluorescence est inhibée par la 5'-bromo-2'-désoxyuridine(121), soit par immunocytochimie, à l'aide d'anticorps 5'-bromo-2'-désoxyuridine fluorescents(122). La mesure dans le temps de la cohorte de cellules marquées

au 5'-bromo-2'-désoxyuridine permet d'estimer leur taux de progression à différents stades du cycle cellulaire(123)(124).

2 – Indications :

- Pathologie tumorale : (ex. Leucémie aigue)
- Valeur diagnostic : apprécier la ploïdie (index ADN) et le taux de prolifération.
- Valeur pronostic : Dans de nombreux cas, les tumeurs diploïdes semblent offrir un pronostic plus favorable que les formes aneuploïdes.

- Autres indications :

L'estimation du contenu en ADN et l'analyse du cycle cellulaire ont largement contribué à améliorer les connaissances dans d'autres domaines, tels que l'étude des cellules testiculaires et des spermatozoïdes, ou les interactions cellule-virus. Elles se sont également révélées utiles dans l'analyse d'autres types de cellules, comme les bactéries et les levures.(125)

3 – Matériels :

1 – Cytomètre de flux(126): Un cytomètre en flux est l'instrument principal utilisé pour effectuer l'analyse du cycle cellulaire. Le cytomètre en flux utilise des lasers pour exciter les fluorochromes spécifiques présents sur les cellules, permettant ainsi de mesurer et d'analyser leur ADN et leur phase du cycle cellulaire.

2 – Colorants à ADN : Des colorants à ADN, tels que la bromodésoxyuridine (BrdU) ou le propidium iodide (PI), sont utilisés pour marquer l'ADN dans les cellules. Ces colorants permettent de quantifier la quantité d'ADN dans chaque cellule et d'identifier les différentes phases du cycle cellulaire.

3 – Tampon de fixation et de perméabilisation : Un tampon de fixation et de perméabilisation est utilisé pour préparer les cellules à l'analyse du cycle cellulaire. Ce tampon permet de fixer les

cellules, de les rendre perméables aux colorants à ADN et de préserver l'intégrité de l'ADN cellulaire.

4 – Tampon de lavage : Un tampon de lavage, tel qu'un tampon phosphate saliné (PBS), est utilisé pour effectuer des lavages cellulaires afin d'éliminer les résidus de colorants et de réduire les interférences lors de l'analyse.

5 – Tubes de prélèvement : Des tubes stériles sont utilisés pour collecter les cellules à analyser. Ces tubes doivent être adaptés au cytomètre en flux et compatibles avec les colorants à ADN utilisés.

6 – Échantillon de contrôle : Un échantillon de contrôle contenant des cellules avec un cycle cellulaire bien caractérisé est utilisé pour calibrer et vérifier les performances du cytomètre en flux, ainsi que pour établir les seuils de détection des différentes phases du cycle cellulaire.

7 – Filtres optiques : Des filtres optiques spécifiques sont utilisés dans le cytomètre en flux pour séparer les différentes longueurs d'onde de fluorescence émises par les colorants à ADN. Ces filtres permettent de détecter et de mesurer les signaux fluorescents provenant des colorants marquant l'ADN.

8 – Logiciel d'analyse : Un logiciel d'analyse dédié est utilisé pour traiter les données générées par le cytomètre en flux. Le logiciel permet de quantifier les différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1, S, G2/M) et de générer des résultats précis pour l'analyse du cycle cellulaire.

4 – Mode opératoire :

La méthode de cytométrie en flux implique d'incuber une petite quantité de sang ou de moelle osseuse (100 µL) avec une solution contenant un perméabilisant des membranes, de la RNase (afin d'éviter le marquage de l'ARN) et un intercalant fluorescent comme l'iodure de propidium.

Le perméabilisant détruit les globules rouges et permet à l'intercalant de pénétrer jusqu'au noyau des leucocytes, rendant ainsi l'ADN des cellules fluorescent avec une intensité

proportionnelle à sa quantité. Les cellules qui sont quiescentes ou en phase G1 (avec 2N d'ADN) émettent une fluorescence deux fois plus faible que les cellules en phase G2 (avec 4N d'ADN).

Pour mesurer la quantité d'ADN de manière plus précise, un étalon interne tel que les hématies de poussin haploïdes ou les lymphocytes sanguins humains diploïdes peut être utilisé. Les cellules en phase S émettent une fluorescence intermédiaire entre ces deux valeurs.

Des logiciels spécifiques sont utilisés pour établir les gaussiennes des pics G1 et G2 et extrapoler la courbe de la phase S, ce qui permet de quantifier chaque population. Pour isoler la population de blastes de manière précise, une étiquette préalable des antigènes de différenciation exprimés à la surface des sous-populations cellulaires est utilisée.

5 – Résultats :

Grâce à l'utilisation de logiciels d'intégration des signaux de fluorescence, il est possible d'obtenir une détermination précise du pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire ou qui sont aneuploïdes.(127)

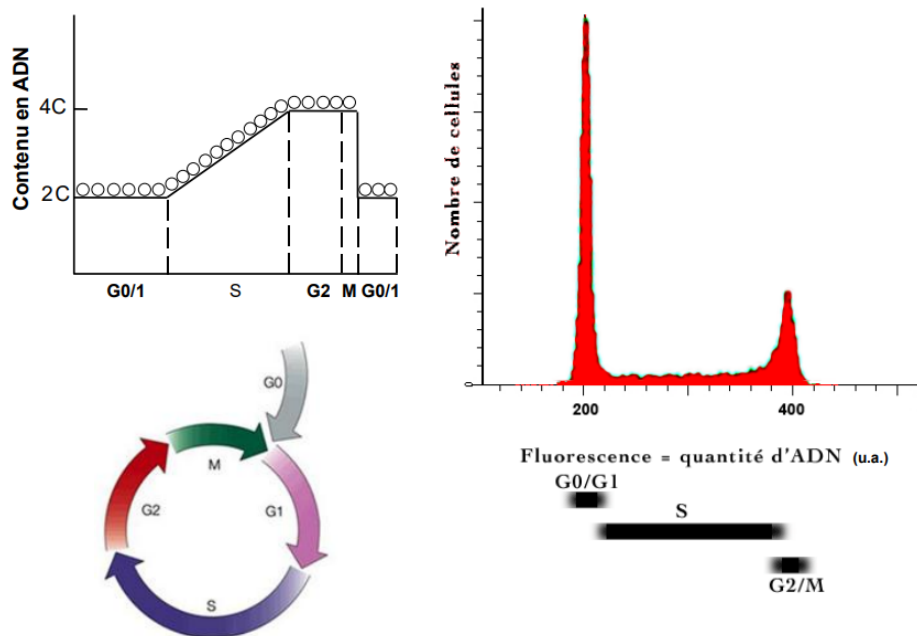


Fig 25 : Instantané (cliché) d'une population à un moment donné, Montrant la quantité d'ADN



*EXPLORATION DES
PATHOLOGIES
ERYTHROCYTAIRES*

A – Test de Kleihauer:

1 – Généralités :

Le test de Kleihauer est un examen de frottis sanguin qui utilise des techniques cytochimiques pour identifier et mesurer les globules rouges fœtaux dans le sang de la mère lorsqu'il y a un soupçon d'hémorragie fœtomaternelle pendant la grossesse ou l'accouchement.(128)

2 – Indications :

- déterminer la quantité de globules rouges fœtaux qui ont pénétré dans la circulation sanguine maternelle, en particulier en cas d'hémorragie fœto-maternelle lorsque la mère est Rhésus négatif.
- déterminer la dose appropriée d'immunoglobulines anti-Rhésus nécessaire pour empêcher la mère de développer une réponse immunitaire.
- en cas de traumatisme pendant la grossesse, de décollement du placenta ou après des procédures de diagnostic prénatal invasives pour évaluer le risque d'hémorragie fœto-maternelle.(129)

3 – Matériels :

- **Lame de microscope :** Une lame de microscope est utilisée pour préparer l'échantillon de sang à analyser. Assurez-vous que la lame est propre et compatible avec la coloration utilisée.
 - Échantillons requis : frottis sanguin à partir du sang veineux dans un tube EDTA.
 - solution de fixation : alcool éthylique à 80 %.
 - solution tampon : tampon acide citrique-phosphate.
 - incubateur à 37°C.
 - colorants utilisés pour la détection des globules rouges fœtaux : Coloration à l'érythrosine B (éosine B), 0,1 % et acide d'Ehrlich hématoxyline.(130)

- Microscope : Un microscope est utilisé pour visualiser les cellules colorées sur la lame. Le microscope doit être équipé d'objectifs d'immersion d'huile appropriés pour une visualisation claire des cellules et d'un système d'éclairage adapté.

4 – Mode opératoire :

- 1 – Préchauffer le tampon acide citrique-phosphate et placer 50 ml de la solution tampon dans un bocal de coplin et couvrir. Incuber à 37°C pendant 30 minutes.
- 2 – Préparation de frottis sanguins fins
- 3 – Laisser les frottis sanguins sécher à l'air libre pendant au moins 10 minutes.
- 4 – Fixer les frottis sanguins (patients et témoins) dans de l'alcool éthylique à 80% pendant 5 minutes.
- 5 – Rincer soigneusement les frottis à l'eau distillée et les laisser sécher à l'air.
- 6 – Placer les frottis secs dans la solution tampon acide citrique-phosphate préchauffée pendant 5 minutes. Après 1 et 3 minutes d'incubation, retirez avec précaution chaque lame de la solution tampon et replacez-la immédiatement.
- 7 – Après 5 minutes, retirer les lames de la solution tampon acide citrique-phosphate et les rincer soigneusement avec de l'eau distillée et sécher à l'air libre.
- 8 – Colorer les frottis secs à l'hématoxyline acide pendant 3 minutes. Rincer à l'eau distillée et éliminer le plus possible d'eau des frottis en tapotant doucement une extrémité de la lame sur un matériel absorbant.
- 9 – Contre-colorer les frottis avec de l'érythrosine B pendant 4 minutes. Rincer à l'eau distillée, laisser sécher à l'air et recouvrir d'une lamelle couvre-objet.
- 10 – Examiner les lames au microscope à l'aide d'objectifs 100 x à immersion d'huile.

$$\text{Fetal red blood cells \%} = \frac{\text{No. of fetal red cells counted}}{\text{Total number of red blood cells counted}} \times 100$$

(131)(132)(133)

5 - Résultats :

5.1 Résultats normaux :

Normalement, les cellules fœtales devraient être absentes du sang maternel. La fourchette normale est de 0 à 0,1 %, comme l'indiquent d'autres références de laboratoire. (134)

5.2 Résultats anormaux : Intérpretation

Le test de Kleihauer est considéré comme positif dès qu'il détecte 1 hémoglobine fœtale pour 10 000 hémoglobines adultes, et un seuil de 5 hémoglobines fœtales pour 10 000 hémoglobines adultes est fixé pour déterminer si un contrôle de l'examen est nécessaire. Lorsque le taux d'hémoglobine fœtale est inférieur à ce seuil, l'hémorragie fœtomaternelle n'a généralement pas d'impact clinique sur le fœtus, mais elle peut provoquer une allo-immunisation chez la mère, en particulier avec l'anti-RH1, en fonction de ses phénotypes érythrocytaires. (135)

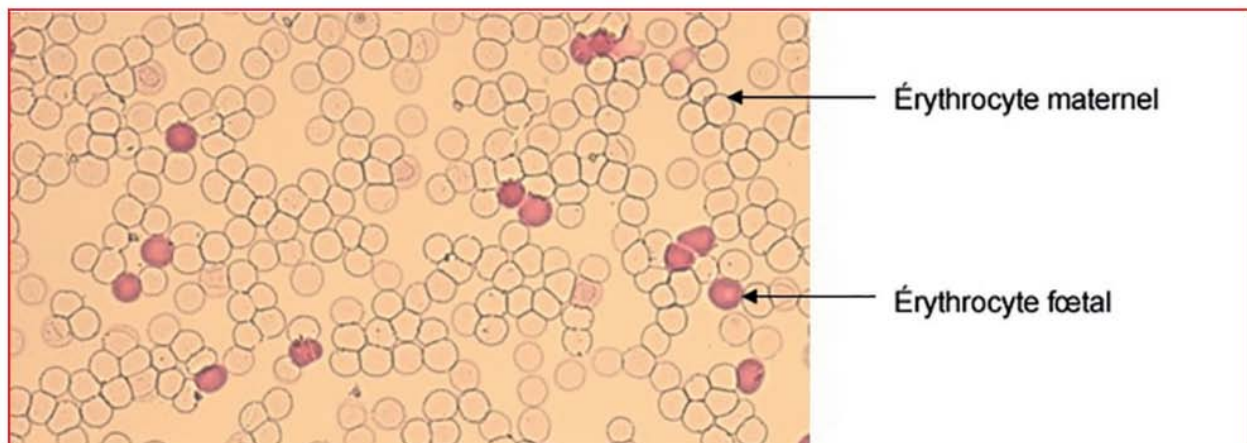


Fig 26 : Test de Kleihauer fortement positif (500 HF/10 000 HA), correspondant à une hémorragie fœtale de 250 mL de sang. Les érythrocytes fœtaux contiennent de l'hémoglobine F fixant la phloxine et sont rose vif et réfringents. (139)

B – Résistance globulaire osmotique:

1 – Généralités :

Le test de résistance osmotique est utilisé pour mesurer la résistance des érythrocytes à l'hémolyse lorsqu'ils sont exposés à différents niveaux de dilution d'une solution saline.(136)

2 – Indications :

- Historiquement, il a été utilisé pour le diagnostic de Thalassémie.
- Utile pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire, elliptocytose héréditaire.(137)

3 – Matériels :

1. Sang hépariné ou sang défibriné.
2. Spectrophotomètre : Un spectrophotomètre est l'instrument principal utilisé pour mesurer l'absorbance de la solution contenant les globules rouges après exposition à des solutions hypotoniques. Le spectrophotomètre doit être capable de mesurer l'absorbance à la longueur d'onde appropriée pour l'analyse des globules rouges.
3. Cuvettes ou microplaques : Des cuvettes en plastique ou des microplaques sont utilisées pour contenir les échantillons de solution contenant les globules rouges. Assurez-vous d'utiliser des cuvettes ou des microplaques compatibles avec le spectrophotomètre utilisé.
4. Échantillon de sang : Un échantillon de sang est prélevé sur le patient. Assurez-vous de suivre les procédures standard de prélèvement sanguin pour obtenir un échantillon de haute qualité. L'échantillon peut être prélevé dans un tube contenant un anticoagulant approprié, comme l'EDTA.
5. Solution de tampon : Une solution de tampon est utilisée pour préparer les solutions hypotoniques de différentes concentrations nécessaires pour le test. La solution de tampon doit

avoir une composition appropriée pour maintenir la stabilité des globules rouges lors de la dilution.

6. Solutions hypotoniques : Des solutions hypotoniques, de différentes concentrations, sont utilisées pour exposer les globules rouges à des conditions osmotiques variables. Ces solutions hypotoniques peuvent être préparées en diluant la solution de tampon avec de l'eau distillée ou une solution saline appropriée.
7. Solution isotonique : Une solution isotonique est utilisée comme témoin pour évaluer la résistance globulaire osmotique. Cette solution isotonique peut être une solution saline équilibrée à une concentration physiologique.
8. Pipettes : Des pipettes sont utilisées pour mesurer précisément les volumes nécessaires des solutions hypotoniques, de la solution isotonique et des échantillons de sang.

4 – Mode opératoire :

Le sang veineux hépariné ou défibriné peut être utilisé.

Le test doit être effectué dans les 2 heures suivant le prélèvement, si le sang est conservé à température ambiante, ou dans les 6 heures si le sang a été conservé à 4 °C.

1. Introduire 5,0 ml de chacune des 11 solutions salines dans des tubes à essai de 12 × 75 mm, ajouter 5,0 ml d'eau dans le 12e tube.
2. Ajouter à chaque tube 50 µl de sang et mélanger immédiatement en retournant les tubes plusieurs fois, en évitant la mousse.
3. Laisser les suspensions pendant 30 min à température ambiante, mélanger à nouveau puis centrifuger pendant 5 min à 1200 g.
4. Prélever les surnageants et estimer la quantité de lyse dans chacun d'eux à l'aide d'un spectromètre réglé sur une longueur d'onde de 540 nm ou d'un colorimètre photoélectrique muni d'un filtre jaune-vert (par exemple Ilford 625). Utiliser comme blanc le surnageant du tube 1 (osmotiquement équivalent à 9 g/l de NaCl).
5. Attribuer une valeur de 100% de lyse à la lecture du surnageant du tube 12 (eau) et exprimer les

lectures des autres tubes en pourcentage de la valeur du tube 12, tracer les résultats en fonction de la concentration de NaCl.(138)

5 - Résultats :

La résistance globulaire est diminuée dans la maladie de Minkowski-Chauffard (sphérocytose héréditaire)(139), l'elliptocytose héréditaire, les anémies hémolytiques auto-immunes (AHA).

La résistance est augmentée dans les syndromes thalassémiques, la drépanocytose, la xérocytose héréditaire (stomatocytose déshydratée).

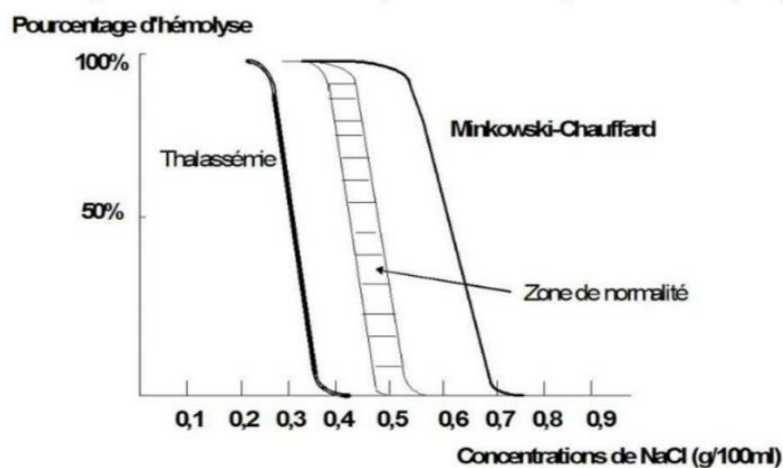


Fig 27: Exemple de test de fragilité aux solutions hypotoniques, tirée du site hematocell, ce schéma montre deux cas avec une hémolyse plus rapide en solution hypotonique avec une thalassémie et plus longue avec une Sphérocytose Héréditaire.(140)

C- Recherche des pathologies constitutionnelles de la membrane du globule rouge en ektacytométrie :

1 - Généralités :

L'ektacytométrie est une technique utilisée pour mesurer la déformabilité des globules rouges en exposant un échantillon très dilué de sang à des contraintes de cisaillement et en mesurant l'élongation résultante des globules par l'analyse de la figure de diffraction laser.(141)

2 – Indications :

Diagnostic de :

- Sphérocytose héréditaire
- l'elliptocytose héréditaire non sévère et sévère (pyropoïkilocytose)
- Stomatocytose deshydratées (xérocytose) ou hyperhydratées
- Ovalocytose de l'Asie du Sud Est(142)

3 – Matériels :

1. Analyseur d'éktacytométrie : Un analyseur d'éktacytométrie, également appelé éktacytomètre, est l'instrument principal utilisé pour mesurer les propriétés et la forme des globules rouges. Il utilise des techniques d'imagerie et de microscopie pour analyser les cellules sanguines. Assurez-vous d'avoir accès à un éktacytomètre approprié et de suivre les instructions du fabricant pour son utilisation.
2. Échantillon de sang : Un échantillon de sang est prélevé sur le patient. Il est important de suivre les procédures standard de prélèvement sanguin pour garantir un échantillon de haute qualité. L'échantillon peut être prélevé dans un tube contenant un anticoagulant approprié, comme l'EDTA.
3. Solution de dilution : Une solution de dilution est utilisée pour préparer l'échantillon de sang à une concentration appropriée pour l'analyse en éktacytométrie. La solution de dilution doit avoir une composition compatible avec les globules rouges et permettre une observation claire des cellules comme une solution visqueuse de polyvinylpyrrolidone (PVP)
4. Cuvettes d'éktacytométrie : Des cuvettes spéciales d'éktacytométrie sont utilisées pour contenir les échantillons de sang dilué pendant l'analyse. Ces cuvettes doivent être compatibles avec l'éktacytomètre utilisé et permettre une visualisation précise des globules rouges.

5. Solution de fixation : Une solution de fixation est utilisée pour fixer les globules rouges sur les cuvettes d'éktacytométrie afin de prévenir leur mouvement ou déformation lors de l'analyse. La solution de fixation doit être adaptée à l'analyse et permettre une fixation optimale des globules rouges comme une solution de tampon phosphate (PBS)
6. Logiciel d'analyse d'image : Un logiciel d'analyse d'image est utilisé pour traiter et analyser les images des globules rouges capturées par l'éktacytomètre. Le logiciel permet de quantifier les paramètres et les caractéristiques des globules rouges, ainsi que d'identifier les anomalies de la membrane du globule rouge.

4 - Mode opératoire :

⇒ Principe :

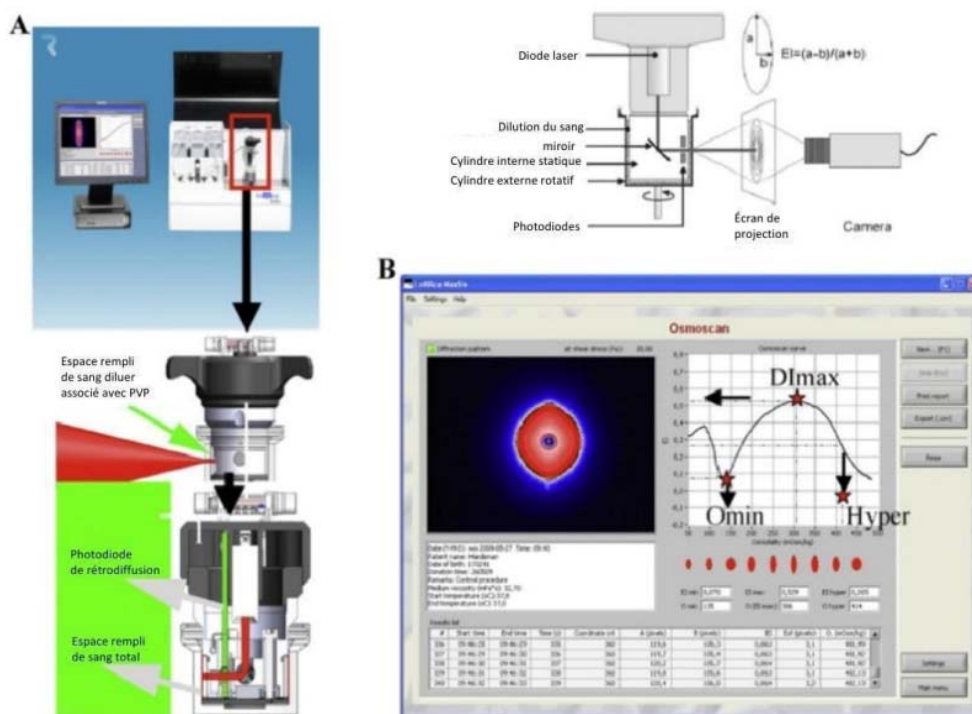


Fig 28 : principe de l'éktacytométrie. Un faisceau laser est diffusé par une suspension de globules rouges tendue entre un cylindre interne statique et un cylindre externe rotatif. La forme de la mesure de diffraction, projetée sur un petit écran est une mesure de déformabilité moyenne des GR et passe de circulaire au repos à elliptique à une forte contrainte de

cisaillement. Les axes majeurs et mineurs de l'ellipse servent à calculer l'indice d'élongation

$$EI = \frac{(a-b)}{(a+b)} \quad (143)$$

⇒ Les étapes :

1. Préparation de l'échantillon :

- Prélever un échantillon de sang veineux du patient en utilisant des techniques de prélèvement sanguin standard.
- Transférer l'échantillon de sang dans un tube contenant un anticoagulant approprié, tel que l'EDTA, pour empêcher la coagulation.

2. Dilution de l'échantillon :

- Préparer une solution de dilution en utilisant une solution appropriée, comme une solution saline physiologique ou un tampon phosphate salin (PBS).
- Diluer l'échantillon de sang avec la solution de dilution selon un rapport spécifié, généralement 1:100 ou 1:200, pour obtenir une concentration appropriée de globules rouges dans la solution.

3. Fixation des globules rouges :

- Ajouter une solution de fixation appropriée, telle que le formol tamponné ou le glutaraldéhyde, aux globules rouges dilués. Suivre les instructions spécifiques du protocole pour la concentration et le temps de fixation recommandés.
- Mélanger doucement l'échantillon pour assurer une fixation homogène des globules rouges.

4. Préparation de l'échantillon pour l'éktacytométrie :

- Transférer une petite quantité de l'échantillon fixé dans des cuvettes d'éktacytométrie spéciales, en prenant soin de ne pas introduire de bulles d'air.
- Placer les cuvettes sur le plateau de l'éktacytomètre selon les recommandations du fabricant.

5. Acquisition des données :

- Utiliser l'éktacytomètre pour capturer des images des globules rouges fixés et effectuer des mesures et des analyses automatisées.
 - Suivre les paramètres spécifiques définis dans le protocole, tels que la forme des cellules, la densité de l'hémoglobine, les indices de distribution, etc.
6. Analyse des résultats :
- Utiliser un logiciel d'analyse d'image pour traiter et analyser les données d'éktacytométrie.
 - Identifier les anomalies de la membrane du globule rouge, telles que les sphérocytes, les échinocytes, les acanthocytes, les elliptocytes, etc.
 - Comparer les résultats obtenus avec des valeurs de référence pour déterminer la présence de pathologies constitutionnelles de la membrane du globule rouge.

Plusieurs paramètres sont définis dans la courbe osmoscan :

- (i) Elmin : indice d'élongation minimal
- (ii) Omin : osmolalité à Elmin, en corrélation directe avec l'osmolalité du point de lyse à 50 % dans le test de fragilité osmotique et représente le rapport surface/volume
- (iii) Elmax : déformabilité maximale des GR
- (iv) Omax : osmolalité à Elmax, représente la fonction du canal ionique
- (v) Ohyper : osmolalité à 50% de Elmax dans la région hypertonique, reflète l'état d'hydratation
- (vi) Elhyper (varie en fonction de Elmax) : indice d'élongation à Ohyper
- (vii) AUC : l'aire sous la courbe est directement calculée par le logiciel de Omin à 450 mOsm/kg.(144)

Par exemple le module osmoscan de LoRRca MaxSis est réalisé en ajoutant 250 uL de sang total à 5 mL de polyvinylpyrrolidone isosmolaire (isoPVP). La suspension de GR diluée est soumise à un gradient osmotique croissant (de 80 mOsm/L à 500 mOsm/L) sous une contrainte de cisaillement constante de 30 mPa.

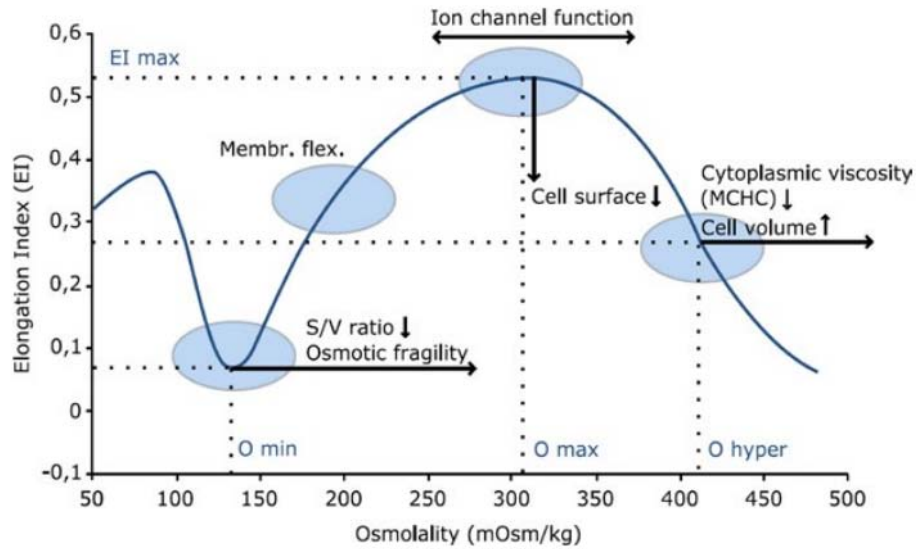


fig 29: Paramètres pertinents de la courbe Osmoscan : Omin, Elmin, Omax, Elmax, Ohyper et Elhyper.

5 – Résultats :

Exemple 1 :

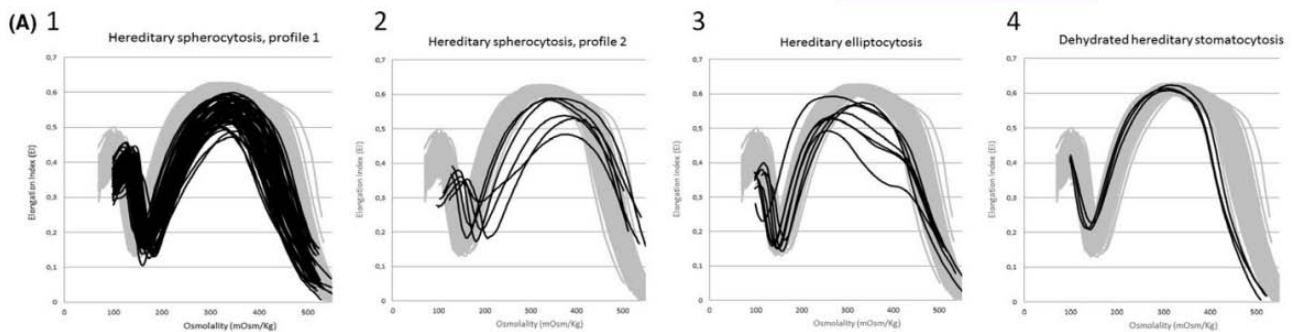


fig 30 :: Profils et paramètres osmoscan LoRRca MaxSis pour les témoins et les troubles de la membrane des GR. A) Profils osmoscan SH, EH et DHS (témoins colorés en gris) : A1. Profils osmoscan pour le profil HS 1, A2. Profils osmoscan pour le profil HS 2, A3. Profils osmoscan pour HE ; A4. Profils osmoscan pour dHSt.(145)

Exemple 2 :

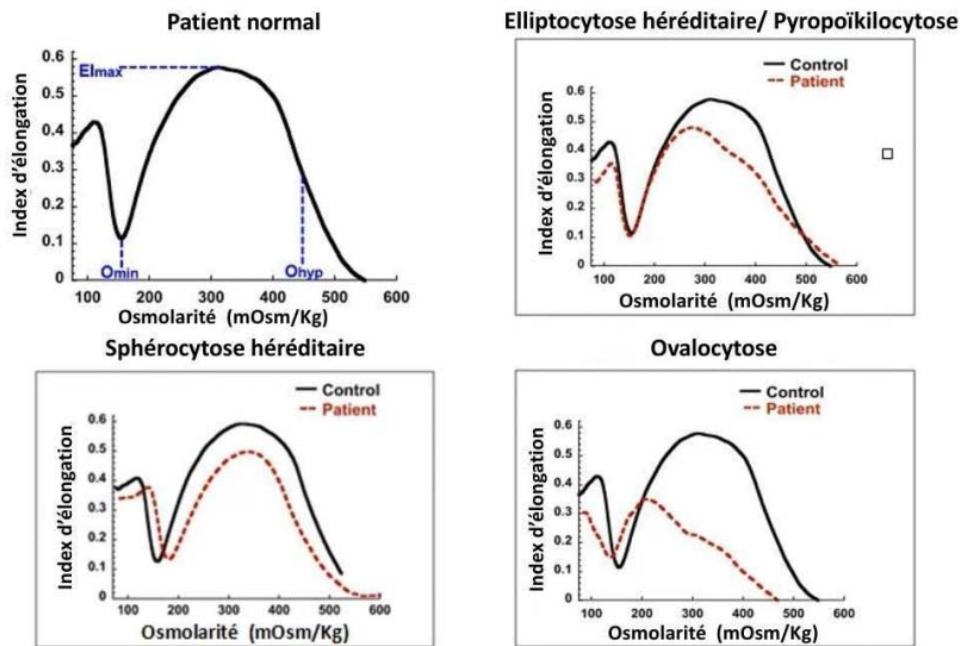


Fig 31 : Exemple de patient normal et d'un patient avec des troubles de la membrane érythrocytaire détectés par ektacytométrie (146)

D- Facteur de croissance : dosage de l'érythropoïétine sérique ou plasmatique :

1. Généralités :

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone glycoprotéique qui régule la production de globules rouges (érythropoïèse) en se liant à un récepteur situé à la surface des cellules progénitrices érythroïdes.

Le principal site de synthèse de l'EPO est constitué par les fibroblastes péri-tubulaires des cellules du cortex rénal chez l'homme adulte et par les hépatocytes chez le fœtus. Une petite quantité d'EPO extra-rénale est produite dans le foie adulte et il existe des preuves que l'EPO est

également synthétisée par au moins deux autres sites : l'utérus et le cerveau. Le principal stimulus de l'augmentation de la production d'EPO est l'hypoxie tissulaire.(147)(148)

2 . indications :

- Évaluer les capacités de production d'EPO chez les sujets atteints d'insuffisance rénale chronique.
- Suspecter une carence en EPO, ou du moins une réponse inappropriée de la production d'EPO pour corriger une anémie.
- Le diagnostic différentiel des polyglobulies.(149)

3. Matériels :

i) Sang sur tube sec ou EDTA.

ii) LA TROUSSE DE DOSAGE :

*Réactif 1 : Anticorps anti-EPO biotinylé [anticorps monoclonal de souris anti-EPO humaine] contenant du ProCLin 300 et un conservateur.

*Réactif 2 : Anticorps anti-EPO marqué à l'enzyme peroxydase [monoclonal de souris anti-EPO humaine].

*Réactif A ELISA : Solution concentrée de lavage ELISA [saline avec surfactant] contenant la ciprofloxacine comme conservateur.

*Réactif B ELISA : Substrat TMB [tétraméthylbenzidine]

*SOLN = Solution bloquante : Solution bloquante ELISA (acide sulfurique 1N)

*PLA = Microplaque : Un support avec des bandelettes recouvertes de streptavidine

*CAL = Étalons : EPO humaine synthétique lyophilisée.

*CTRL = Contrôles 1 et 2 : EPO humaine synthétique dans une solution-tampon protéinée,

Chaque contrôle contient la ciprofloxacine comme conservateur.

iii) MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS :

- Lecteur de microplaques capable de lire à 450 nm et 405 nm.
- Laveur de microplaques [sinon, un lavage manuel est acceptable].
- Pipettes de précision pour 25, 200, 100 et 150 µl.
- (Facultatif) : Distributeur multi-canaux ou à répétition pour 25, 100 et 150 µl.
- Minuterie avec une précision de ± 2 minutes.
- Eau distillée ou déminéralisée.
- Agitateurs pour microplaques.

4. Mode opératoire :

Dosage immunoenzymatique (ELISA Quantikine IVD EPO, R & D Systems) :
Ce test est basé sur la méthode « sandwich » à double anticorps. Le premier anticorps est un anticorps monoclonal de souris anti EPO immobilisé sur les parois des puits de la microplaque et le deuxième anticorps est conjugué à une peroxydase. L'adjonction d'un chromogène et son oxydation la peroxydase donne une coloration lue au spectrophotomètre à 450 nm.

L'absorbance du chromogène mesurée permet d'obtenir une réponse linéaire de 0 à 200 mU/ml.

Les dosages sont effectués en double et la limite de détection, pour ce dosage, est de 0,6 mU/ml.(150)

Pour schématiser en étapes :

1.Préparation des échantillons :

- Prélever un échantillon de sang veineux du patient en utilisant des techniques de prélèvement sanguin standard.
- Transférer l'échantillon de sang dans un tube stérile approprié, tel qu'un tube hépariné ou un tube EDTA, pour empêcher la coagulation.

2. Séparation du plasma ou du sérum :

- Centrifuger l'échantillon de sang à une vitesse et pendant une durée spécifiées pour séparer le plasma ou le sérum.
- Transférer le plasma ou le sérum clair dans un nouveau tube propre à l'aide d'une pipette Pasteur ou d'une pipette appropriée. Éviter toute contamination avec des globules rouges ou des caillots.

3. Dosage de l'érythropoïétine :

- Utiliser un kit de dosage spécifique pour l'érythropoïétine, tel qu'un dosage immuno-enzymatique (ELISA) ou un dosage immunochimique automatisé.
- Suivre les instructions fournies avec le kit pour préparer les réactifs, calibrer l'appareil et effectuer le dosage.

4. Réalisation du dosage :

- Ajouter les échantillons de plasma ou de sérum dans les puits ou les cuvettes appropriés du kit de dosage.
- Ajouter les réactifs du kit selon les instructions spécifiques, en respectant les temps d'incubation et les températures recommandés.
- Effectuer les étapes de lavage ou de filtration nécessaires pour éliminer les interférences non spécifiques.

5. Lecture des résultats :

- Utiliser l'instrument de mesure approprié, tel qu'un spectrophotomètre ou un lecteur de plaques, pour lire l'absorbance ou la fluorescence des échantillons.
- Comparer les valeurs d'absorbance ou de fluorescence des échantillons avec les courbes d'étalonnage fournies avec le kit pour déterminer les concentrations d'érythropoïétine dans les échantillons.

5. Résultats :


Des taux élevés d'érythropoïétine sont associés aux situations suivantes :

- Anémie ferriprive.


- Anémie due à la thalassémie.
- Anémie hémolytique
- Anémie due à la suppression de la moelle osseuse
- Polycythémie secondaire (appropriée par exemple haute altitude, maladie pulmonaire ou associée à des tumeurs sécrétant de l'érythropoïétine)
- Grossesse
- Thérapie à la testostérone

Des taux d'érythropoïétine abaissés sont associés aux situations suivantes :

- Anémie due à une maladie rénale chronique ou à d'autres maladies chroniques (par exemple, polyarthrite rhumatoïde, infection par le VIH)
- La polyglobulie de Vaquez
- Après une transfusion
- Thérapie œstrogénique(151)



*EXPLORATION DES
ANOMALIES DU
MÉTABOLISME DU FER
ET HÉMOLYSE*



A- Ferritine :

1. Généralités :

La ferritine est la protéine cellulaire de stockage du fer.

Elle est présente en petites concentrations dans le sang et la concentration sérique de ferritine est normalement en bonne corrélation avec les réserves totales de fer du corps, ce qui rend sa mesure importante dans le diagnostic des troubles du métabolisme du fer.(152)

2. Indications :

- Les états de carence(153) ou surcharge en fer(154) (Hémochromatoses héréditaires,(155) Surcharge en fer transfusionnelle(156)...)
- Maladie de Still(157)
- Syndrome d'activation macrophagique.(158)
- Anémie sidéroblastique(159)
- Certains troubles neurologiques : maladie de parkinson(160), neuroferritinopathie (161)...
- Nouvelles indications encore sous études comme les coronaropathies.(162)

3. Matériels :

Plaques de microtitration : Utilisez des plaques à puits pour réaliser le dosage. Les plaques peuvent être revêtues d'anticorps anti-ferritine pour capturer la ferritine présente dans l'échantillon.

Réactifs du kit ELISA :

- 1^{er} anticorps polyclonal mouton (tubes revêtus)
- 2^{ème} anticorps polyclonal mouton
- Marqueur : Peroxydase

- Etalon de nature hépatique
- Révélation par : acide azino 2,2' diéthyl 3 benzothiazoline sulfonique 6

Échantillons de sérum ou de plasma à partir du sang prélevé sur tube sec ou héparinate de lithium.

- Pipettes et pointes : Utilisez des pipettes et des pointes appropriées pour transférer avec précision les réactifs, les échantillons et les standards dans les puits des plaques de microtitration.
 - Lavage de plaques : Un laveur de plaques ou une solution de lavage appropriée pour éliminer les substances non liées dans les puits de la plaque de microtitration.
- Lecteur de plaques : Utilisez un lecteur de plaques capable de mesurer l'absorbance à une longueur d'onde spécifique. Cela permettra de quantifier la quantité de ferritine présente dans les échantillons.
- Calculatrice ou logiciel d'analyse : Utilisez une calculatrice ou un logiciel d'analyse dédié pour interpréter les résultats, établir la courbe d'étalonnage et calculer la concentration de ferritine dans les échantillons comme Appareillage : dosage automatisé sur ES 600 (boehringer)(163)

4. Mode opératoire :

Plusieurs kits de dosage de la ferritine sont disponibles, qui reposent sur une détection immunologique à l'aide d'anticorps spécifiques. La technique de révélation peut être réalisée par néphélométrie, turbidimétrie, méthode optique dans un ELISA sandwich ou par compétition. Les méthodes isotopiques, qui ont été développées à l'origine, ne sont plus couramment utilisées. La spectrométrie de masse peut également être utilisée.(164)

Pour schématiser :

1. Préparation des échantillons et des réactifs :
 - Préparez les échantillons de sérum ou de plasma en respectant les bonnes pratiques de manipulation des échantillons biologiques.

- Vérifiez les conditions de stockage et d'utilisation des réactifs du kit ELISA pour la ferritine.
 - Préparez les réactifs de dilution selon les instructions fournies avec le kit.
2. Préparation des plaques de microtitration :
- Prenez une plaque de microtitration à puits avec une capacité suffisante pour les échantillons, les standards et les contrôles.
 - Ajoutez les anticorps anti-ferritine dans les puits de la plaque et incubez selon les recommandations du fabricant pour permettre la fixation des anticorps sur les parois des puits.
3. Incubation des échantillons et des réactifs :
- Ajoutez les échantillons de sérum ou de plasma, ainsi que les standards et les contrôles de ferritine, dans les puits appropriés de la plaque.
 - Incubez la plaque à une température et une durée spécifiées par le protocole du kit ELISA.
4. Lavage des plaques :
- Après l'incubation, lavez les plaques de microtitration pour éliminer les substances non liées.
 - Utilisez une solution de lavage appropriée et effectuez plusieurs cycles de lavage en suivant les recommandations du fabricant.
5. Révélation optique :
- Ajoutez , acide azino 2,2' diéthyl 3 benzothiazoline sulfonique 6 qui réagit avec l'enzyme marquée à la peroxydase présente dans les anticorps de détection.
 - Incubez la plaque pour permettre la réaction chimique et la génération d'un signal optique détectable.
 - Mesurez l'absorbance ou la fluorescence dans chaque puits à l'aide d'un lecteur de plaques compatible avec la méthode de révélation optique spécifiée.
6. Analyse des données :
- Utilisez le logiciel fourni avec le lecteur de plaques ou un logiciel d'analyse approprié pour interpréter les données.

- Établissez une courbe d'étalonnage à partir des valeurs des standards de ferritine et utilisez-la pour quantifier la concentration de ferritine dans les échantillons.
- Rapportez les résultats en fonction de l'unité de mesure spécifiée et conformément aux références cliniques appropriées.

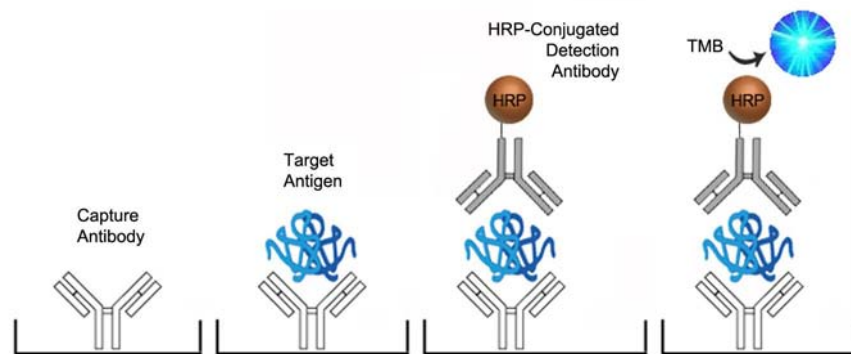


Fig 32 : Dosage de ferritine par la technique Elisa Sandwich

5. Résultats :

5.1 valeurs normales :

Homme : 12–300 ng/mL

Femme : 10–150 ng/mL

Enfants :

Nouveau-né : 25–200 ng/mL

≤1 mois : 200–600 ng/mL

2–5 mois : 50–200 ng/mL

6 mois–15 ans : 7–142 ng/mL(165)

5. 2 Interpretation : valeurs anormales :

- ◆ Les taux de ferritine augmentent dans les cas suivants :
- Maladie hépatique aiguë et chronique

- Infection
- Inflammation
- Alcoolisme
- tumeurs malignes
- Hyperthyroïdie
- Maladie de Gaucher
- Infection du myocarde
- Surcharge en fer (hémochromatose)
- Maladie rénale terminale
- Cancer des cellules rénales
- Anémie autre que la carence en fer.(166)
- ◆ Le taux de ferritine diminue dans les cas suivants :
 - Carence en fer
 - Hémodialyse.

B – Fer sérique et coefficient de saturation de la transferrine :

1 – Généralités :

En mesurant à la fois les taux de fer sérique et de transferrine, on peut calculer le coefficient de saturation de la transferrine (CSTf). Le dosage du fer sérique seul, sans la mesure de la transferrine et du CSTf, n'est pas utile en pratique.(167)

2 – Indications du dosage de CSTf :

– Identification d'une carence martiale : La ferritine a une utilité limitée dans certaines conditions. Il s'agit d'une protéine de réaction de phase aiguë qui augmente en réponse à

l'inflammation(168) et les sujets peuvent avoir des valeurs considérablement élevées sans être déficients en fer, d'où vient l'intérêt du dosage de CSTf dans les anémies inflammatoires.

– L'identification des surcharges martiales : notamment dans les hémochromatoses héréditaires.(169)

3 – Matériels :

1. Sang sur tube sec ou héparinate de lithium.
2. Tubes de microcentrifugation en polypropylène de 1,5 ml avec couvercle : Ces tubes seront utilisés pour préparer les échantillons de sérum, d'étalon de fer et d'eau sans fer.
3. Agitateur vortex : Cet équipement sera utilisé pour mélanger les échantillons avec les agents réducteurs et pour assurer un mélange homogène.
4. Microfugeuse : Une microfugeuse est nécessaire pour centrifuger les tubes contenant les échantillons de sérum et obtenir un surnageant clair.
5. Spectrophotomètre : Un spectrophotomètre est utilisé pour mesurer l'absorbance des échantillons à une longueur d'onde spécifique (562 nm) afin de quantifier la ferritine.
6. Solution de chromogène (ferrozine) : Cette solution est utilisée pour révéler la réaction entre la ferritine et les réactifs du dosage. Elle permet de générer une couleur qui peut être mesurée par spectrophotométrie.
7. Étalon de fer (80 $\mu\text{mol/l}$) : Il s'agit d'une solution étalon contenant une concentration connue de fer. Elle est utilisée comme référence pour calibrer le dosage et permettre la quantification de la ferritine dans les échantillons.
8. Agents réducteurs : Dans ce cas, les agents réducteurs mentionnés sont l'acide trichloracétique (100 g/l), l'acide ascorbique (22,7 mmol/l) et l'acide chlorhydrique (0,9 mol/l). Ils sont utilisés pour réduire la ferritine présente dans les échantillons, permettant ainsi la détection par la réaction de couleur.
9. Eau sans fer : L'eau sans fer est utilisée comme blanc, c'est-à-dire comme référence pour l'absence de fer dans la réaction de dosage.(170)

4 – Mode opératoire :

1 – Préparation des échantillons : Préparez trois tubes de microcentrifugation en polypropylène de 1,5 ml. Placez 0,5 ml de sérum (exempt d'hémolyse) dans le premier tube, 0,5 ml d'étalon de fer dans le deuxième tube et 0,5 ml d'eau sans fer dans le troisième tube (blanc).

2 – Ajout de l'agent réducteur : Ajoutez 0,5 ml de précipitant protéique (agents réducteurs) dans chacun des tubes contenant les échantillons. Refermez les tubes avec leur couvercle et mélangez bien le contenu, par exemple en utilisant un agitateur vortex. Laissez reposer pendant 5 minutes.

3 – Centrifugation : Centrifugez le tube contenant le sérum à 13 000 g pendant 4 minutes dans une microfugeuse. Cette étape permet d'obtenir un surnageant optiquement clair.

4 – Réaction de dosage : À partir du surnageant clair obtenu du tube contenant le sérum, prélevez 0,5 ml et ajoutez 0,5 ml de solution de chromogène. Faites de même avec les autres mélanges (étalon de fer et blanc). Mélangez soigneusement chaque tube après l'ajout de la solution de chromogène. Laissez reposer pendant 10 minutes.

5 – Mesure de l'absorbance : Utilisez un spectrophotomètre pour mesurer l'absorbance de chaque tube à une longueur d'onde de 562 nm. La mesure de l'absorbance se fait par rapport à l'eau utilisée comme blanc.(171)

La capacité totale de fixation du fer par la transferrine (CTF) est calculée par la formule « transferrine (g/L) × 25 » et le coefficient de saturation de la transferrine par la formule « Fer sérique (µmol/L)/CTF (µmol/L) ».

5 – Résultats :

5.1 – Valeurs normales :

Les valeurs de référence peuvent être variables selon les trousse de dosage et les laboratoires.

À titre indicatif :

– le taux de fer sérique se situe entre 10 et 40 µmol/L (facteur de conversion : µmol/L = µg/L ×

0,018)

- les valeurs de référence de la transferrine entre 1,6 et 4 g/L.
- Les valeurs normales du CSTf sont entre 20% et 40%.(172)

5.2 Interpretation : Valeurs anormales :

a) le coefficient de saturation de la transferrine :

- Les valeurs élevées de coefficient de saturation de la transferrine sont observées dans :
les états de surcharge en fer, l'anémie mégaloblastique et l'anémie sidéroblastique.
- Les valeurs de saturation de la transferrine diminuent en cas de carence chronique en fer, d'infection chronique, de tumeur maligne étendue, d'inflammation des tissus, d'urémie et de syndrome néphrotique.(173)

b) le fer sérique :

- L'augmentation du taux de fer sérique est associée à :

- * Hémochromatose idiopathique
- * Nécrose du foie (hépatite virale)
- * Hémosidérose causée par un apport excessif en fer (par exemple, transfusions multiples, administration excessive de fer)
- * Intoxication aiguë au fer (enfants)
- * Anémie hémolytique
- * Anémie pernicieuse
- * Anémie aplasique ou hypoplasique
- * Intoxication au plomb
- * Thalassémie
- * Carence en vitamine B6
- * Œstrogènes

- * Éthanol
- * Contraceptifs oraux

– Les diminutions du taux de fer sérique sont associées à :

- * L'anémie ferriprive
- * Syndrome néphrotique (perte de protéines liant le fer)
- * Carence en fer
- * Insuffisance rénale chronique
- * Nombreuses infections
- * Hématopoïèse active
- * Rémission de l'anémie pernicieuse
- * Hypothyroïdie
- * Malignité (carcinome)
- * État postopératoire
- * Kwashiorkor. (174)(175)(176)

C – Haptoglobine :

1 – Généralités :

L'haptoglobine est une protéine abondante qui se lie à l'hémoglobine et qui est présente dans le plasma. La fonction de l'haptoglobine est de déterminer le sort de l'hémoglobine libérée des globules rouges après une hémolyse intravasculaire ou extravasculaire.(177)

2 – Indications :

- Évaluer l'hémolyse chez les patients récemment transfusés.(178)
- En association avec le dosage du LDH et la bilirubine non conjuguée elle est utilisée comme marqueur d'hémolyse dans le cadre d'anémie hémolytique.(179)

3 – Matériels :

- Sérum frais (de préférence non-hémolysé) ou plasma frais (hépariné ou EDTA)
- Antisérum de chèvre anti-haptoglobine humaine (titre \pm 2 mg/ml)
- Réactif R1 : tampon, polymère, sel inorganique et conservateur
- Réactif R2 : tampon, sel inorganique et conservateur
- Microplaques de dosage spécifiques à la méthode immunoturbidimétrique
- Pipettes de précision pour les volumes nécessaires (par exemple, pipettes de 1 ml, 200 μ l et 20 μ l)
- Pipettes à usage unique (pour éviter toute contamination croisée)
- Solution tampon de lavage (pour les étapes de lavage des microplaques)
- Solution standard d'haptoglobine (pour créer une courbe d'étalonnage)
- Solution de dilution (si nécessaire pour ajuster la concentration de l'échantillon)
- Système analytique équipé d'un détecteur de turbidité
- Logiciel d'analyse des données (pour le traitement et l'interprétation des résultats)
- Consommables de laboratoire supplémentaires (tubes à essai, récipients de stockage, supports de pipettes, etc.)

4 – Mode opératoire :

L'haptoglobine est dosée par des tests immunologiques, immunonéphélométrie ou immunoturbidimétrie, à l'aide d'anticorps spécifiques.

⇒ Etapes de la méthode immunoturbidimétrique :

1. Préparation des échantillons :

- Préparez les échantillons de sérum frais ou de plasma frais (hépariné ou EDTA).
- Si nécessaire, diluez les échantillons avec une solution de dilution appropriée pour obtenir des concentrations dans la plage de mesure de l'analyse.
- Assurez-vous que les échantillons sont exempts de particules ou de turbidité excessives.

2. Préparation des réactifs :
 - Préparez les réactifs R1 et R2 conformément aux instructions fournies avec le kit de dosage.
 - Vérifiez la stabilité des réactifs et respectez les conditions de stockage recommandées.
3. Préparation des microplaques :
 - Ajoutez les volumes appropriés de réactif R1 et R2 dans les puits de la microplaque selon le protocole spécifique du kit.
 - Mélangez délicatement les réactifs en agitant légèrement la microplaque.
4. Ajout des échantillons et des standards :
 - Ajoutez les échantillons de sérum ou de plasma dans les puits appropriés de la microplaque.
 - Ajoutez les standards d'haptoglobine dans les puits dédiés pour créer une courbe d'étalonnage.
5. Réaction spécifique et incubation :
 - L'antisérum anti-haptoglobine réagit spécifiquement avec l'haptoglobine présente dans l'échantillon, formant un complexe antigène-anticorps.
 - Incubez la microplaque à une température spécifiée dans les instructions du kit pendant une durée déterminée pour permettre la réaction entre l'haptoglobine et l'antisérum.
6. Mesure de la turbidité :
 - Mesurez la turbidité de chaque puits de la microplaque à deux longueurs d'onde : 340 nm et 700 nm.
 - La turbidité mesurée à ces longueurs d'onde est proportionnelle à la concentration en haptoglobine dans l'échantillon.
 - Enregistrez les valeurs d'absorbance ou de turbidité obtenues pour chaque échantillon et standard.
7. Analyse des données :

- Utilisez un logiciel d'analyse des données fourni avec le système analytique pour traiter les résultats.
- Construisez une courbe d'étalonnage à partir des valeurs des standards et déterminez les concentrations d'haptoglobine dans les échantillons en utilisant cette courbe.

5 – Résultats :

5.1 Valeurs normales :

Adulte: 50–220 mg/dL or 0.5–2.2 g/L

Nouveau-né : 0–10 mg/dL or 0–0.1 g/L(180)

5.2 Interprétation : valeurs anormales :

– Une augmentation du taux d'haptoglobine est observée dans les cas suivants :

- Maladies associées à une élévation de la vitesse de sédimentation des érythrocytes, telles que l'infection, le traumatisme, l'inflammation, l'hépatite, l'amylose, les maladies du collagène, le lymphome et la leucémie.
- Maladies obstructives ou biliaires
- Utilisation de stéroïdes
- Anémie aplastique
- Diabète sucré
- Tabagisme
- Syndrome néphrotique
- Augmentation du taux d'œstrogènes

– Une diminution ou une absence de taux d'haptoglobine est observée dans les cas suivants :

- Hémolyse intravasculaire (sphérocytose héréditaire, déficit en pyruvate kinase, anémie hémolytique auto-immune, réactions transfusionnelles)
- Hémolyse extravasculaire (hémorragie intrapéritonéale)

- Hémyolyse intramédullaire (thalassémies, anémies sidéroblastiques, anémies mégaloblastiques)
- Génétique (l'haptoglobine est absente chez 1 % des Blancs et 4 à 10 % des Noirs)
- Cirrhose
- L'enfance
- Grossesse
- Brûlures.(181)(182)



*EXPLORATION DES
ANOMALIES DE
L'HÉMOGLOBINE*



A – Électrophorèse de l'hémoglobine :

1 – Généralités :

L'électrophorèse de l'hémoglobine est utilisée comme test de dépistage pour identifier les hémoglobines normales et anormales et évaluer leur quantité. Les types d'hémoglobine comprennent l'hémoglobine A1 (HbA1), l'hémoglobine A2 (HbA2), l'hémoglobine F (HbF ; hémoglobine fœtale), l'hémoglobine C (HbC) et l'hémoglobine S (HbS).

2 – Indications :

- diagnostic d'une thalassémie.(183)
- Suivis pré- et post-transfusionnels des patients porteurs d'une hémoglobinopathie (syndrome drépanocytaire majeur).(184)
- Dépistage d'une hémoglobinopathie devant des signes cliniques et/ou biologiques évocateurs : anémie microcytose, polyglobulie, érythroblastose, anomalie morphologique des globules rouges.

3 – Matériels : (Pour électrophorèse sur acétate de cellulose)

- Échantillons de sang : sang total prélevés chez les patients sur tube EDTA.(185)
- Matériel électrophorétique :
 - Cuve d'électrophorèse avec des compartiments pour les échantillons et les électrodes.
 - Bloc d'alimentation électrique capable de fournir 350 V à 50 mA pour les gels d'acétate de cellulose et d'agarose acide.
 - Gel d'acétate de cellulose préparé avec les dimensions appropriées pour le système d'électrophorèse utilisé.
 - Papier-filtre absorbant.
- Solutions et tampons :
 - Tampon de migration : une solution tampon spécifique adaptée à la méthode utilisée, généralement composée de Tris-HCl et d'acide borique.

- Tampon de coloration : une solution contenant un colorant approprié pour visualiser l'hémoglobine, comme le Bleu de Bromophénol ou le Ponceau S.
- Solutions de lavage : des solutions tamponnées pour rincer le gel et éliminer les interférences.
- Échantillons de sang :
 - Échantillons de sang total prélevés chez les patients, contenant l'hémoglobine à analyser.
 - Les échantillons doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire et aux protocoles de sécurité.
- Système de détection et d'analyse :
 - Scanner ou densitomètre pour numériser et quantifier les bandes d'hémoglobine après électrophorèse.
 - Logiciel d'analyse pour interpréter les résultats et comparer les bandes d'hémoglobine avec des standards de référence.
- Standards de référence :
 - Échantillons d'hémoglobine normale ou standards commerciaux d'hémoglobine variantes pour la comparaison et l'identification des bandes d'hémoglobine.

4 – Mode opératoire : (électrophorèse acétate de cellulose à ph alcalin)

1. Centrifuger les échantillons à 1200 g pendant 5 minutes. Diluer 20 µl des globules rouges avec 150 µl du réactif hémolysant.

Mélanger doucement et laisser reposer pendant au moins 5 minutes.

2. L'alimentation électrique étant déconnectée, préparer la cuve d'électrophorèse en plaçant des quantités égales de tampon TEB dans chacun des compartiments de tampon extérieurs. Mouiller deux mèches de chambre le tampon et en placer une le long de chaque support de séparateur/pont en veillant à ce qu'elles soient en contact avec le tampon.

3. Imprégner l'acétate de cellulose en le faisant descendre lentement dans un réservoir de tampon . Laisser tremper l'acétate de cellulose pendant au moins 5 minutes avant de l'utiliser.

4. Remplir la plaque à puits d'échantillons avec 5 µl de chaque échantillon dilué ou de control et couvrir avec une lamelle couvre-objet de 50 mm ou une lame de verre " courte " pour éviter l'évaporation. Chargez une deuxième plaque à puits d'échantillons avec la solution d'agent mouillant.
5. Nettoyer les embouts des applicateurs immédiatement avant l'utilisation en les chargeant avec la solution d'agent mouillant et en les appliquant sur un buvard.
6. Retirer la bande d'acétate de cellulose du tampon et l'éponger deux fois entre deux couches de papier buvard propre. Ne pas laisser sécher l'acétate de cellulose.
7. Charger l'applicateur en enfonçant deux fois les pointes dans les puits d'échantillons et appliquer ce premier échantillon sur du papier buvard propre. Recharger l'applicateur et appliquer les échantillons sur l'acétate de cellulose.
8. Placer les plaques d'acétate de cellulose en travers des ponts, la face plastique en haut. Placer deux lames de verre sur la bande pour maintenir un bon contact.
Effectuer une électrophorèse à 350 V pendant 25 minutes.
9. Après 25 min d'électrophorèse, transférer immédiatement l'acétate de cellulose dans du Ponceau S et fixer et colorer pendant 5 min.
10. Éliminer l'excès de colorant en lavant pendant 5 minutes dans le premier réservoir d'acide acétique et pendant 10 minutes dans chacun des deux autres. Éponger une fois en utilisant du papier buvard propre et laisser sécher.
11. Etiqueter les membranes et les conserver dans une enveloppe plastique.(186)

5 – Résultats :

5-1 Valeurs normales :

Adulte/personne âgée : Pourcentage de l'Hb totale :

HbA 1 : 95-98%

HbA 2 : 2 à 3

HbF : 0.8-2%

HbS : 0%

HbC : 0 %

HbE : 0 %

Enfants : HbF :

Nouveau-né : 50-80%

< 6 mois : < 8%

>6 mois : 1-2% (162)

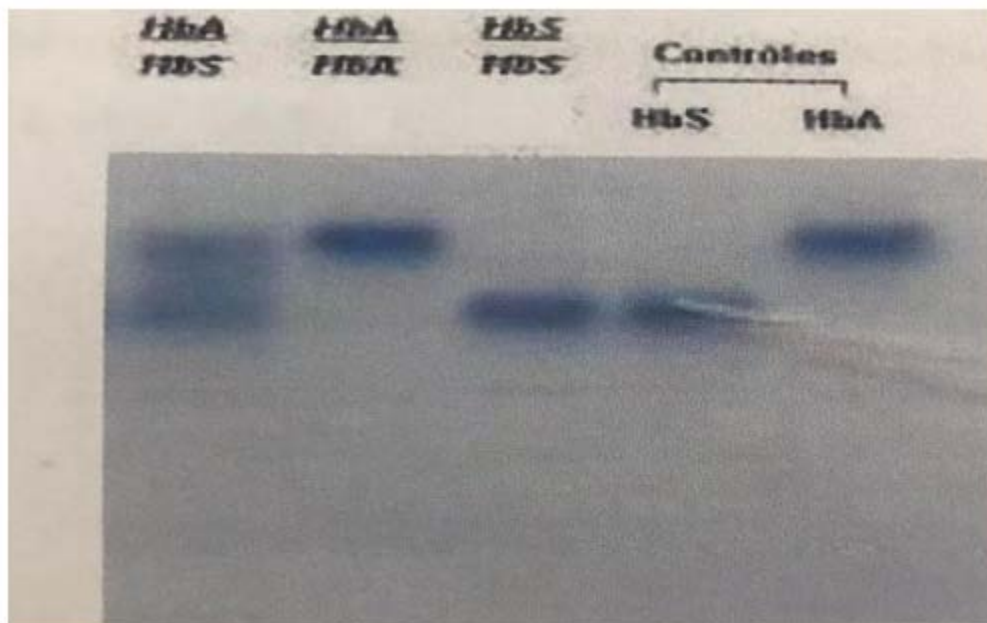


Fig 33 : migration de l'HbS sur acétate de cellulose à ph alcalin.(187)

5 - 2 Interpretation : Valeurs anormales

Les résultats indiquent ce qui suit :

- Présence d'HbS, mais avec une proportion plus élevée d'HbA que : trait drépanocytaire (HbAS) ou α -thalassémie drépanocytaire.

- Présence d'HbS et d'HbF, mais pas d'HbA : anémie drépanocytaire (HbSS), bêta⁰-thalassémie drépanocytaire (persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale [HPFH]) ou drépanocytose-HPFH.
- Proportion globalement plus élevée d'HbS que d'HbA et d'HbF:thalassémie bêta+ drépanocytaire (la plus probable)
- Présence d'HbC, mais avec une proportion plus élevée d'HbA que d'HbC : trait HbC (HbAC)
- Présence de HbC et de HbF, mais pas de HbA : 'hémoglobinoses C, thalassémie (HbC-HPFH)
- Une proportion plus élevée de HbC que de HbA : thalassémie
- Présence de HbS et de HbC : hémoglobinoses S-C
- Présence de HbH : hémoglobinoses H
- Augmentation de l'HbA₂ : bêta-thalassémie mineure
- Augmentation de l'HbF : persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale, drépanocytose, bêta-thalassémie, hémoglobinoses E(188)

B) Test de solubilité de l'hémoglobine (Itano, falciformation) :

1 – Généralités :

Le test d'Itano est une méthode biochimique utilisée pour détecter la présence d'HbS (hémoglobine S) dans un échantillon sanguin. Il s'agit d'un test de solubilité de l'hémoglobine (Hb) qui repose sur la formation d'un précipité lorsque l'HbS est désoxygénée.

Le test de falciformation est un test cytologique permettant la mise en évidence et l'évaluation du nombre d'hématies falciformes, contenant de grandes quantités d'hémoglobine S (HbS), dans un échantillon sanguin.

2 – Indications :

diagnostic d'un syndrome drépanocytaire majeur en situation d'urgence, lorsqu'une étude de l'hémoglobine et un dosage d'HbS, qui sont des techniques longues, sont impossibles à réaliser.

3 – Matériels :

* Pour réaliser le test d'Itano, également connu sous le nom de test de solubilité de l'hémoglobine S,

il faut :

- Échantillon sanguin : Sang total sur EDTA.
- Réactif de solubilité : une solution de réactif de solubilité spécifique, telle que la solution de dithionite de sodium, qui est couramment utilisée dans ce test
- Tubes à essai : des tubes à essai propres et stériles pour effectuer les réactions.
- Pipettes : Des pipettes jetables ou réutilisables sont nécessaires pour mesurer précisément les volumes d'échantillon sanguin et de réactif.
- Agitateur : moyen d'agiter l'échantillon sanguin avec le réactif de solubilité. Un agitateur mécanique ou une agitation manuelle peuvent être utilisés.

* Pour réaliser le test de falciformation, il faut :

- Échantillon sanguin : Sang totale sur EDTA
- Tubes à essai : Utilisez des tubes à essai propres et stériles pour effectuer les réactions.
- Réactif de solubilité : Utilisez une solution de réactif de solubilité spécifique, telle que la solution de métabisulfite de sodium (bisulfite de sodium)
- Pipettes : Des pipettes jetables ou réutilisables sont nécessaires pour mesurer précisément les volumes d'échantillon sanguin et de réactif.
- Agitateur : Vous aurez besoin d'un moyen d'agiter l'échantillon sanguin avec le réactif de solubilité. Un agitateur mécanique ou une agitation manuelle peuvent être utilisés.
- Microscope : Un microscope optique est nécessaire pour observer les échantillons et détecter la formation de cristaux ou de fibres en forme de faucille.

4 – Mode opératoire :

* Pour le test d'Itano :

- 1- Prélevez un échantillon de sang du patient et placez-le dans un tube à essai.
- 2- Ajoutez une solution de réactif de solubilité spécifique, tel que le dithionite de sodium, au tube contenant l'échantillon de sang. Mélangez délicatement le contenu du tube pour assurer une distribution homogène du réactif.
- 3- Laissez le tube à l'air libre pendant quelques minutes pour permettre la désoxygénation de l'hémoglobine.
- 4- Examinez visuellement le contenu du tube pour détecter la formation de précipités insolubles, ce qui indiquerait la présence d'hémoglobine S (HbS).

*Pour le test de falciformation :

1. Prélevez un échantillon de sang du patient et placez-le dans un tube à essai.
2. Ajoutez une solution de réactif de solubilité spécifique, telle que la solution de métabisulfite de sodium (bisulfite de sodium), au tube contenant l'échantillon de sang .
3. Mélangez délicatement le contenu du tube pour assurer une distribution uniforme du réactif.
4. Laissez le tube à l'air libre pendant quelques minutes pour permettre la désoxygénation de l'hémoglobine.
5. Examinez l'échantillon sous un microscope optique à faible grossissement (10x ou 20x) pour observer la formation de cristaux ou de fibres en forme de faucille caractéristiques de l'hémoglobine S (HbS).

5 – Résultats :

5.1 – Le test d'Itano :

Le test permet d'identifier la présence d'HbS, mais de rares autres variants de l'Hb précipitent également. De fausses réactions négatives sont observées avec des hémolysats trop dilués, ayant une concentration d'HbS égale ou inférieure à 20 % ou en présence d'un pourcentage important de méthémoglobine.

Le test ne permet pas d'apprécier le taux d'HbS.

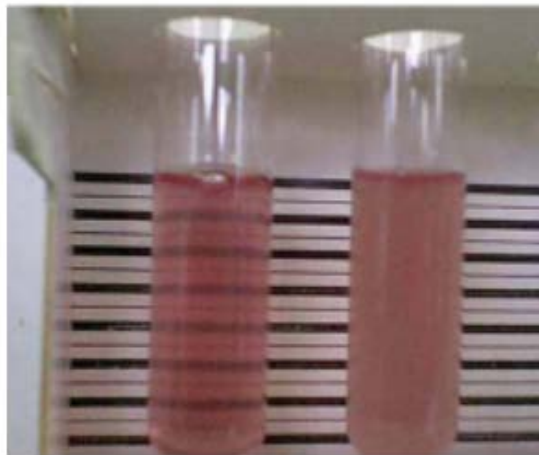


Fig 34 : Test d'Itano négatif (à gauche) et test d'Itano positif (à droite) après 5 à 15 minutes. (189)

5.2 – le test de falciformation :

- Le test est négatif si les hématies conservent leur forme ronde.
- Le test est positif si les hématies prennent progressivement une forme de faucille, de feuilles de houx, de banane aux extrémités pointues, souvent dentelée.
- Le test est positif pour le portage du trait drépanocytaire si quelques hématies sont en faucille (et qu'il n'y a pas de signes cliniques).

Un sujet sain possède moins de 1 % de cellules falciformes.

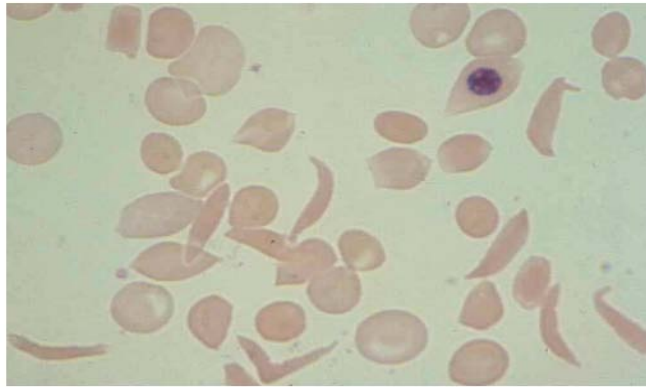


Fig 35 : Falciformation des hématies en milieu pauvre en oxygène (190)

C – Test à l’isopropanol (Hb instable) :

1 – Généralités :

Les variantes d'hémoglobine présentent un large spectre d'instabilité, mais les hémoglobines cliniquement instables peuvent être détectées par le test à l'isopropanol.(191)

Lorsque l'hémoglobine est dissoute dans un solvant tel que l'isopropanol, qui est moins polaire que l'eau, les liaisons hydrophobes de van der Waals sont affaiblies et la stabilité de la molécule est diminuée. Dans des conditions contrôlées, les hémoglobines instables précipitent, tandis que les hémoglobines stables restent en solution.(192)

2 –Indications :

Le test à l'isopropanol est utilisé pour détecter la présence d'une hémoglobine instable lors de l'évaluation des causes d'hémolyse chronique ou aiguë. Il est recommandé de le prescrire conjointement avec une étude complète de l'hémoglobine pour rechercher d'autres variants, ainsi que, si nécessaire, une recherche de corps de Heinz, qui correspond à la précipitation de l'hémoglobine instable à l'intérieur des érythrocytes et qui est généralement positive dans ce contexte.

3 – Matériels :

1 – Prélèvement :

- Sang total sur EDTA, citrate ou héparine.

2 – Solution de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 :

- Tris-hydroxyméthyl-amino-méthane (1,21 g)
- Eau distillée (100 ml)
- HCl 4 M pour ajuster le pH à 7,4.

3 – Tampon Tris-isopropanol :

- Solution de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 (83 ml)
- Isopropanol (17 ml).

4 – Matériel supplémentaire :

- Tubes propres et secs
- Pipettes ou micropipettes
- Agitateur vortex ou dispositif de mélange
- Centrifugeuse
- Réactifs supplémentaires (comme l'HCl 4 M, si nécessaire)
- Matériel de sécurité (gants, blouse de laboratoire, etc.)

4 – Mode opératoire :

1 – Prélevez du sang total sur un tube contenant de l'EDTA, du citrate ou de l'héparine.

2 – Préparez le tampon Tris-HCl 0,1 M en dissolvant 1,21 g de tris-hydroxyméthyl-amino-méthane dans 100 ml d'eau distillée. Ajustez le pH à 7,4 en ajoutant de l'HCl 4 M.

3 – Préparez le tampon Tris-isopropanol en mélangeant 83 ml de solution Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 avec 17 ml d'isopropanol.

4 – Ajoutez 1 ml de sang total prélevé dans un tube propre et sec.

5 – Ajoutez 2 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 dans le tube contenant le sang.

- 6 – Mélangez soigneusement le contenu du tube en utilisant un agitateur vortex ou un dispositif de mélange pour assurer une homogénéisation.
- 7 – Incubez le tube pendant 30 minutes à température ambiante.
- 8 – Ajoutez 1 ml de tampon Tris-isopropanol dans le tube contenant le mélange sang-tampon.
- 9 – Mélangez à nouveau soigneusement le contenu du tube.
- 10 – Centrifugez le tube à une vitesse appropriée pour séparer les cellules et le plasma.
- 11 – Dans deux petits tubes bouchés, placez 2 ml de tampon tris-isopropanol et 0,2 ml d'hémolysat dans chaque tube.
- 12 – Mélangez les tubes par inversion et placez-les à 37°C dans un bain-marie.
- 13 – Vérifiez la présence d'un précipité flocculant à 5, 20 et 30 minutes.
- 14 – Observez la présence de précipité ou de coloration anormale dans le plasma, ce qui peut indiquer la présence d'une hémoglobine instable.(193)

5 – Résultats :

La solution d'hémoglobine de contrôle reste claire pendant 30 à 40 minutes, alors que la présence d'une hémoglobine instable devient évidente en 5 minutes, avec la formation d'un précipité floconneux en 20 minutes.(194)

D – Recherche d'une anomalie de l'hémoglobine :

1 – Généralités :

Un bilan standard pour la recherche d'une hémoglobine anormale doit inclure 3 tests phénotypiques distincts, dont au moins une technique électrophorétique avec interprétation.

Les hémoglobinopathies sont classiquement séparées en deux grandes catégories:

- les variants de l'Hb avec anomalie qualitative: synthèse en quantité normale d'une hémoglobine «anormale»
- les variants de l'Hb avec anomalie quantitative: défaut quantitatif de production d'une hémoglobine normale, ce qui correspond à une thalassémie.

Quelques variants de l'Hb ont la particularité d'associer à la fois un défaut qualitatif et quantitatif.

2 – Indications :

La recherche d'anomalies de l'hémoglobine est couramment effectuée lorsque l'on découvre une anémie hémolytique, une microcytose isolée sans carence martiale évidente, des signes de polyglobulie ou des anomalies morphologiques des hématies. Elle peut également être demandée dans des contextes tels que des investigations familiales, chez des patients présentant une origine ethnique ou géographique à risque, dans le cadre d'un dépistage néonatal ou, plus rarement, suite à la découverte fortuite d'un variant lors d'un dosage d'HbA1c ou en présence de signes clinico-biologiques d'hémolyse tels qu'une splénomégalie, des taux élevés de LDH, une bilirubine élevée ou une diminution de l'haptoglobine, entre autres.(195)

3 – Matériels :

Le matériel dépend de la méthode utilisée.

4 – Mode opératoire :

Plusieurs techniques sont disponibles pour séparer les différentes fractions d'hémoglobine en fonction de leur charge électrique et de leur migration. Parmi ces techniques, on retrouve la chromatographie liquide haute pression (HPLC), l'électrophorèse capillaire, l'électrophorèse à pH acide, l'isofocalisation électrique, la séparation des chaînes de globine et le test d'Itano (HbS). Il est recommandé d'utiliser au moins trois méthodes, dont une méthode basée sur l'électrophorèse, pour effectuer une analyse complète des hémoglobines.

5 – Résultats :

Les anomalies des chaînes de globine sont associées à des pathologies spécifiques. La recommandation d'utiliser trois tests différents témoigne des sensibilités variables de ces techniques.(196)

E- Exploration de l'affinité de l'hémoglobine (oxymétrie mesure de la p50) :

1. Généralités :

L'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est définie par la valeur de la «P50» (Po₂, de demi-saturation de l'hémoglobine). Celle-ci dépend de plusieurs facteurs: pH, Pco₂, température, mais également de la concentration en phosphates organiques intra-globulaires: 2-3 diphosphoglycérate (2-3 DPG) et à un degré moindre ATP.(197)(198)(199)(200)

La mesure de cette affinité peut être obtenue par le tracé complet de la courbe de Barcroft(201) ou par un automate de gaz du sang sur un prélèvement veineux. (202)

2. Indication :

Cette analyse est le plus souvent prescrite dans un bilan de polyglobulie vraie,(203) après élimination d'une fausse polyglobulie, d'une polyglobulie secondaire à une hypoxie tissulaire (tabac, BPCO, apnées du sommeil, intoxication chronique au CO ou à des produits

méthémoglobinisants), liée à une sécrétion inappropriée d'EPO, ou primitive (maladie de Vaquez et autres néoplasies myéloprolifératives).

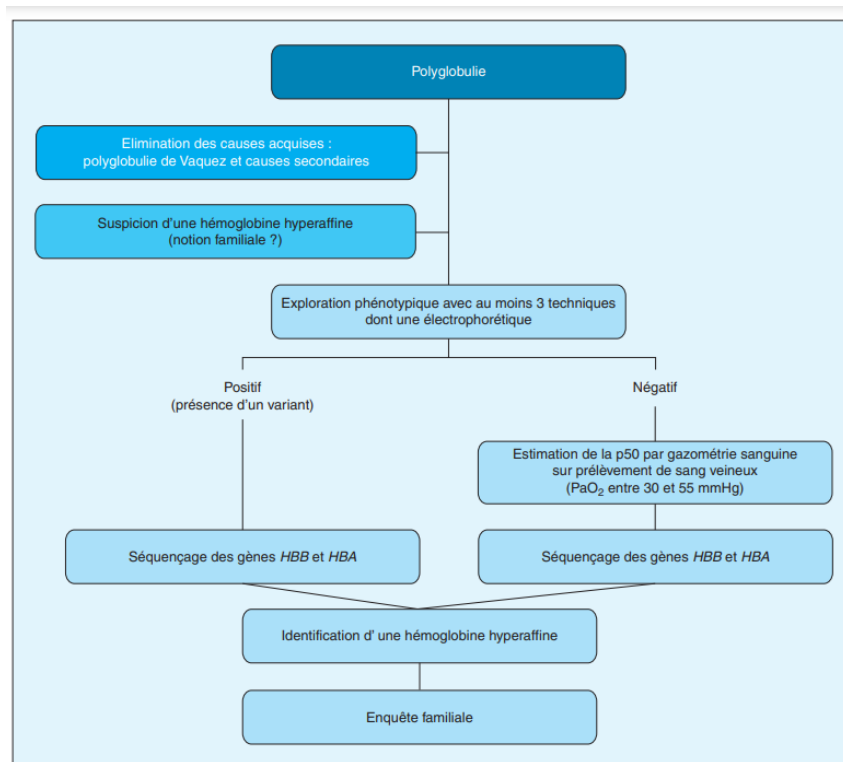


Fig 36 : . Proposition d'arbre décisionnel en cas de suspicion d'hémoglobine hyperaffine(204)

3. Matériels :

(Hémox-analyzer)

- Hemox Analyzer : Il s'agit de l'appareil principal utilisé pour mesurer la p50. L'automate Hemox Analyzer est spécialement conçu pour effectuer des analyses de gaz sanguins et d'hémoglobine.
- Échantillons de sang : Sang total sur EDTA.(205)
- Capillaires héparinés : Les capillaires héparinés sont de petits tubes en verre ou en plastique qui permettent de prélever et de manipuler de petites quantités de sang. Ils sont souvent utilisés pour les analyses de gaz sanguins.

- Réactifs : Les réactifs spécifiques à l'automate Hemox Analyzer sont nécessaires pour effectuer l'analyse de la p50. Ces réactifs peuvent varier en fonction du modèle d'automate utilisé.

4. Mode

opérateur :

1 . Préparation des échantillons :

- a. Prélevez des échantillons de sang veineux avec de l'héparine comme anticoagulant.
- b. Conservez les échantillons à 4°C sur de la glace humide jusqu'à l'analyse.
- c. Diluez 50 µL de sang total avec 5 µL de solution Hemox, un tampon fourni par le fabricant pour maintenir le pH à $7,4 \pm 0,01$.
- d. Aspirez l'échantillon-tampon dans une cuvette.

2 . Équilibrage de la température :

- a. Assurez-vous que la cuvette contenant l'échantillon-tampon est à une température de 37°C.
- b. Oxygénez l'échantillon en le mettant en contact avec de l'air pour atteindre une saturation à 100%.

3 . Enregistrement de la courbe :

- a. Ajustez la valeur de la pression partielle d'oxygène (pO₂) selon les paramètres requis.
- b. Désoxygénez l'échantillon en le mettant en contact avec de l'azote gazeux.
- c. Pendant le processus de désoxygénation, enregistrez la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine sur du papier millimétré.
- d. Utilisez une électrode à oxygène de Clark pour détecter le changement de tension de l'oxygène, qui est enregistré sur l'axe x d'un enregistreur x-y.

e. Simultanément, contrôlez l'augmentation de la fraction d'oxyhémoglobine en effectuant une spectrophotométrie à double longueur d'onde (560 nm et 576 nm) et en l'affichant sur l'axe des y.

4. Détermination de la p50 :

- a. Extrapoler la valeur de la p50 sur l'axe des x à partir de la courbe enregistrée.
- b. La p50 est définie comme le point où la saturation en oxygène est de 50%. (206)

5. Résultats :

La saturation artérielle de l'hémoglobine est liée à la PO₂. La PO₂ à une saturation de 50% (P₅₀) est normalement de 27 mmHg.

La courbe de dissociation est déviée à droite sous l'effet d'une augmentation de la concentration en ions hydrogène (H⁺), d'une augmentation du 2,3-diphosphoglycérate (DPG) des globules rouges, d'une augmentation de la température (T) et de la PCO₂.

La diminution des taux d'H⁺, de DPG, de la température et de la PCO₂ dévie la courbe vers la gauche.

L'hémoglobine caractérisée par une déviation à droite de la courbe de dissociation de l'hémoglobine a une affinité diminuée pour l'oxygène, et celle caractérisée par une déviation à gauche une affinité plus élevée pour l'oxygène. (207)

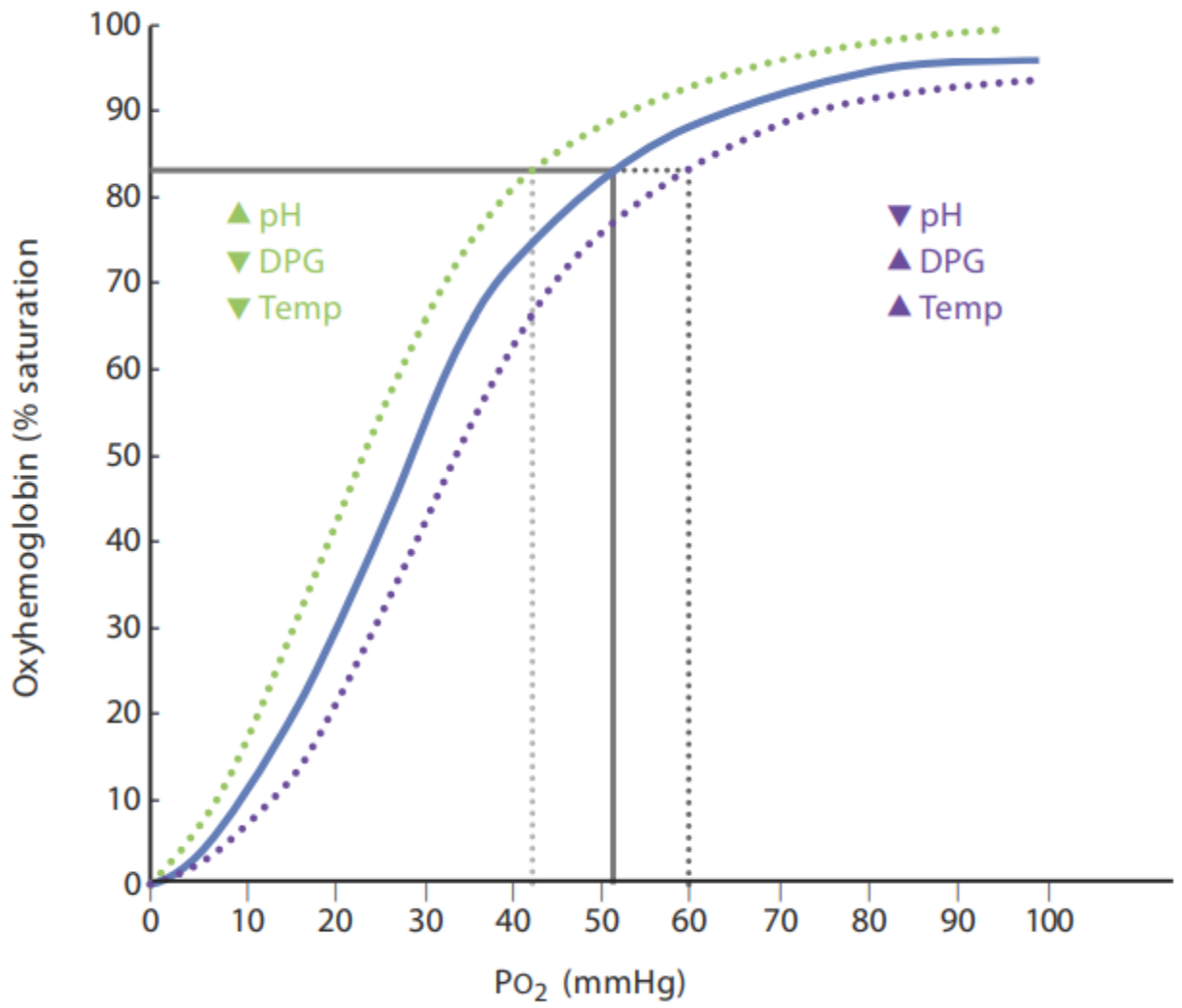


fig 37 : courbe de dissociation de l'hémoglobine(208)

F – Recherche des anomalies de l'hémoglobine sur carton de Guthrie dans le cadre du dépistage néonatal :

1 – Généralités :

Le test de Guthrie vise à détecter les maladies infectieuses et les caractéristiques génétiques, en particulier les anomalies innées du métabolisme, asymptomatiques à la naissance.

Cet examen permet le diagnostic et le traitement précoces des patients atteints de ces maladies, afin d'éviter des dommages à l'enfant, tels que les déficiences intellectuelles. 1-3 Pour le test de Guthrie, quelques gouttes de sang sont prélevées sur le talon du nouveau-né (NB), et recueillies sur du papier filtre. La période de prélèvement de l'échantillon ne doit pas être inférieure à 48 heures d'alimentation en protéines et ne doit pas dépasser 30 jours après la naissance. Cependant, la période idéale se situerait entre le troisième et le septième jour de la naissance chez les nouveau-nés.(209)(210)(211)

2. Indications :

L'indication majeure en hématologie est le dépistage néonatal la drépanocytose.(212)

3. Matériels :

– Carton de Guthrie :

Il s'agit d'un support en papier filtre spécial utilisé pour le prélèvement de gouttes de sang chez les nouveau-nés.

– Lancettes de prélèvement :

Utilisées pour percer la peau du talon du nouveau-né afin de prélever des gouttes de sang sur le carton de Guthrie.

– Tampons antiseptiques :

Utilisés pour nettoyer la peau du talon avant le prélèvement de sang.

– Gants jetables :

Pour assurer l'hygiène et la sécurité lors de la manipulation du sang et du matériel.

– Dispositif de prélèvement :

Peut inclure un stylo de lancettes ou un dispositif de piqûre du talon pour faciliter le prélèvement de sang.

– Bandelettes réactives :

Des bandelettes spéciales imprégnées de produits chimiques réagissant avec les différentes formes d'hémoglobine.

– Réactifs de coloration :

Comme le réactif de coloration à la dithionite de sodium

– Équipement de lecture ou de visualisation :

Un lecteur de carton de Guthrie ou une source de lumière adéquate pour examiner les résultats des tests de dépistage.

– Matériel d'emballage et d'expédition :

Des enveloppes spéciales, des étiquettes d'identification et des sacs de transport pour assurer l'envoi sécurisé des échantillons de carton de Guthrie au laboratoire.

Laisser sécher 2 heures loin d'une source de chaleur. Mettre le papier sous enveloppe et l'adresser au laboratoire chargé du dépistage. Informer les parents qu'ils ne seront prévenus qu'en cas d'anomalie et qu'une absence de réponse signifie que le test est normal.(213)



Fig 37 : Prélèvement sanguin sur carton Guthrie du dépistage néonatal par veinoponction au dos de la main.(214)

4. Méthodes :

Toutes méthodes de séparation de protéines peuvent être utilisées :

Chromatographie liquide à haute performance(215), électrophorèse capillaire(216) et la spectrométrie de masse(217)

Toutes ces méthodes sont automatisées.

5. Résultats :

- Mesure qualitative : la nature des variants fréquents et rares est présomptive et doit être impérativement confirmée par une ou deux autres techniques (y compris pour l'HbS).
- Évaluation semi-quantitative du pourcentage des fractions présentes normales et anormales.(218)



*TESTS GLOBAUX
ET FACTEURS DE
COAGULATION*



A – Temps de Quick (taux de prothrombine/INR) en l'absence de traitement par antivitamine K :

1 – Principe :

Le temps de quick (ou taux de prothrombine) est une mesure de l'intégrité des voies communes extrinsèques et finales de la cascade de la coagulation. Il s'agit du facteur tissulaire et des facteurs VII, II (prothrombine), V, X et du fibrinogène. Le test est réalisé en ajoutant du calcium et de la thromboplastine, un activateur de la voie extrinsèque, à l'échantillon de sang, puis en mesurant le temps (en secondes) nécessaire à la formation d'un caillot de fibrine.(219)

Cette mesure dépend de la thromboplastine utilisée (généralement imposée par les fabricants d'automates mesurant le TP) et peut donc varier d'un laboratoire à l'autre.

Pour harmoniser les résultats a été mis au point un indice appelé ISI ou index de sensibilité international qui compare la thromboplastine utilisée par le laboratoire avec une thromboplastine internationale étalon. L'ISI de la thromboplastine de référence est de 1.

L'INR est le rapport du temps de Quick du malade sur celui du témoin (exprimés tous deux en secondes) élevé à la puissance ISI, selon la formule :

$$\text{INR} = (\text{Temps du malade} / \text{Temps du témoin})^{\text{isi}} \quad (220)$$

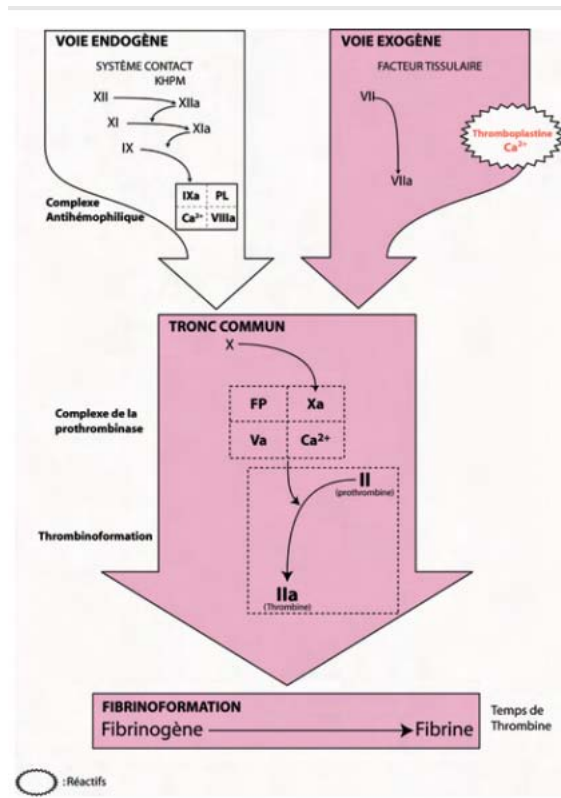


Fig 38: Schéma du principe de réalisation d'un TP : test global d'exploration de la voie exogène, du tronc commun et de la fibrinoformation.(221)

2 - Indications :

- Exploration d'un syndrome hémorragique(222)
- 3 Évaluation préopératoire de l'hémostase(223)
- 4 Suivi biologique des traitements par antivitamines K(224)
- 5 Diagnostic d'une insuffisance hépatocellulaire(225) ou d'une hypovitaminose k(226)
- 6 Diagnostic d'une coagulation intravasculaire disséminée(227)

3 - Matériels :

- 7 Réactif de thromboplastine : Le réactif de thromboplastine est un réactif spécifique contenant des facteurs de coagulation qui déclenchent la formation de caillots sanguins. Il est nécessaire pour réaliser le test de prothrombine. Selon les versions du test, il existe différentes formes de

réactifs de thromboplastine, tels que le réactif de thromboplastine tissulaire (RTT) ou le réactif de thromboplastine partielle (RTP).

8 Plasma sanguin du patient et témoin : Pour effectuer le test de prothrombine, vous aurez besoin de plasma sanguin. Le plasma est obtenu en prélevant du sang veineux et en le plaçant dans un tube de prélèvement anticoagulant approprié, tel que le tube d'EDTA (éthylène diamine tétra-acétique) ou le tube de citrate de sodium.

9 Chronomètre ou coagulomètre : Un chronomètre ou un coagulomètre est utilisé pour mesurer le temps de coagulation du plasma sanguin après l'ajout du réactif de thromboplastine. Les coagulomètres sont des instruments de laboratoire spécialisés conçus pour mesurer les temps de coagulation de manière précise.

10 CaCl_2 (0.025 mol/l)

11 Accessoires de laboratoire : Vous aurez également besoin d'accessoires de laboratoire tels que des tubes de prélèvement, des pipettes, des pipettes automatiques ou des pipettes électroniques pour manipuler les échantillons de sang et les réactifs.



Fig 39 : Coagulomètre à 4 canaux.



Fig 40 : Réactifs de Thromboplastine.

4 – Mode opératoire :

Déposez 0,1 ml de plasma dans un tube en verre placé dans un bain-marie et ajoutez 0,1 ml de thromboplastine. Attendez 1 à 3 minutes pour permettre au mélange de se réchauffer. Ensuite, ajoutez 0,1 ml de CaCl₂ réchauffé et démarrez le chronomètre. Mélangez le contenu du tube et enregistrez le point final. Effectuez le test en double sur le plasma du patient et le plasma témoin. Lorsque plusieurs échantillons doivent être testés en lot, les échantillons et les témoins doivent être espacés de manière appropriée pour éliminer les biais temporels. Certaines thromboplastines contiennent du chlorure de calcium, auquel cas 0,2 ml de thromboplastine-Ca est ajouté à 0,1 ml de plasma et le chronomètre est démarré immédiatement. (220)

5 – Résultats :

5.1 Valeurs normales : (temps de quick)

Les valeurs normales dépendent de la thromboplastine utilisée, de la technique exacte et de la lecture du point final, qu'elle soit visuelle ou instrumentale. Avec la plupart des thromboplastines de lapin, la plage normale du temps de prothrombine (TP) se situe entre 11 et

16 secondes ; pour la thromboplastine recombinante humaine, elle est légèrement plus courte (10 à 12 secondes). Chaque laboratoire devrait établir sa propre plage normale.(228)

5.2 Interpretation : Valeurs anormales

Les causes courantes d'un TP prolongé sont les suivantes :

1. Administration de médicaments anticoagulants oraux(229) (antagonistes de la vitamine K)
2. Présence d'un inhibiteur direct du facteur Xa(230)
3. Maladie du foie(231), notamment l'ictère obstructive(232)
4. Déficience en vitamine K(233)
5. Coagulation intravasculaire disséminée(234)
6. Rarement, une déficience ou un défaut précédemment non diagnostiqué du facteur VII, X, V ou de la prothrombine.(235)

B – Temps de céphaline avec activateur (TCA) :

1 – Généralités :

Le temps de céphaline activé est un test de dépistage courant des déficits en facteurs de coagulation. Le test est sensible à une diminution significative des activités des composants de la voie intrinsèque (FXI, FIX, FVIII), commune (FX, FV, FII et fibrinogène) et de contact (kallikréine, kininogène de haut poids moléculaire et FXII). La coagulation est initiée par une combinaison d'un activateur de surface anionique, d'une source de phospholipides et de calcium.(236)

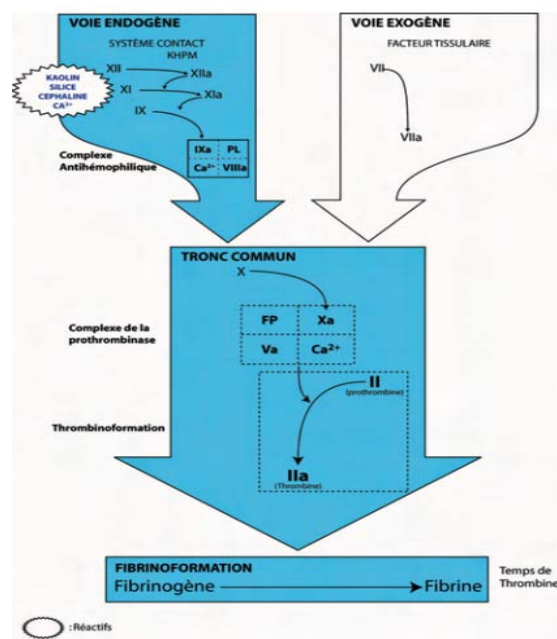


Fig 41 : Schéma du principe de réalisation d'un TCA : test global d'exploration de la voie endogène, du tronc commun et de la fibrinoformation.(225)

2 - Indications :

- 12 Exploration d'un syndrome hémorragique(237)
- 13 Evaluation du risque hémorragique dans un contexte de bilan pré-opératoire(238)
- 14 Suivi d'un traitement par HNF à dose curative en l'absence d'activité anti-Xa disponible.(239)

3 - Matériels :

1. Tube de prélèvement : Sang prélevé sur citrate de sodium
2. Réactif de céphaline activée : Le réactif de céphaline activée est une solution contenant des phospholipides, des activateurs de la coagulation (Koaline) et un tampon. Il est mélangé au plasma sanguin pour déclencher la cascade de coagulation.
3. Chronomètre ou coagulomètre : Un chronomètre ou un coagulomètre est utilisé pour mesurer le temps nécessaire à la formation d'un caillot après l'ajout du réactif de céphaline activée.

Les coagulomètres sont des instruments spécialement conçus pour mesurer les temps de coagulation de manière précise.

4. Pipettes : Des pipettes sont utilisées pour prélever les quantités précises de réactif de céphaline activée, de plasma sanguin et d'autres réactifs nécessaires pour réaliser le test.
5. Eau distillée ou réactif de contrôle fourni par le fabricant pour vérifier les performances du test.

4 – Mode opératoire :

Mélanger des volumes égaux de réactif phospholipidique et de suspension de kaolin et laisser dans un tube de verre au bain-marie à 37 °C. Introduire 0,1 ml de plasma dans un second tube de verre. Ajouter 0,2 ml de la solution kaolin-phospholipides au plasma, mélanger le contenu et déclencher simultanément le chronomètre. Laisser à 37 °C pendant 10 minutes en agitant de temps en temps. Après exactement 10 minutes, ajouter 0,1 ml de CaCl₂ préchauffé et déclencher un second chronomètre. Noter le temps nécessaire à la coagulation du mélange. Répéter le test au moins une fois sur le plasma du patient et sur le plasma de contrôle. Il est possible d'effectuer quatre tests à des intervalles de 2 minutes si l'on dispose d'un nombre suffisant de chronomètres.(240)

5 – Résultats :

5.1 Valeurs normales :

l'intervalle normal est généralement compris entre 26 et 40 s, Les temps réels dépendent des réactifs utilisés et de la durée de la période de préincubation, qui varie selon les recommandations des fabricants pour les différents réactifs. Les laboratoires peuvent choisir les conditions appropriées pour obtenir la sensibilité qu'ils souhaitent. Chaque laboratoire doit calculer son propre intervalle normal.

5.2 Interprétation : Valeurs anormales :

Un allongement du TCA est témoigné dans les cas suivants :

1. Coagulation intravasculaire disséminée
2. Maladie hépatique
3. Transfusion massive de concentrés de globules rouges
4. Administration ou contamination par l'héparine ou d'autres anticoagulants
5. Anticoagulant circulant non spécifique (tel qu'un anticoagulant circulant de type lupique)
6. La présence d'un médicament anticoagulant à action directe (par exemple, des agents anti-IIa ou anti-Xa).
7. Déficit d'un facteur de coagulation autre que le facteur VII
8. Le TCA est également modérément allongé chez les patients prenant d'anticoagulants oraux et en présence d'une carence en vitamine K.

Occasionnellement, un patient atteint d'hémophilie ou d'un autre trouble congénital de la coagulation non diagnostiqué auparavant présente un TCA prolongé isolé. (231)

C - Dosage du fibrinogène fonctionnel (facteur I) :

1 - Généralités :

Le fibrinogène (ou facteur I de la coagulation) est une glycoprotéine plasmatique de haut poids moléculaire, synthétisée par le foie, de demi-vie longue de quatre à six jours. Le fibrinogène est le substrat final de la cascade de la coagulation : cette dernière aboutit à la formation de thrombine, laquelle transforme alors le fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Le caillot de fibrine ainsi formé obture la brèche vasculaire, permettant l'arrêt du saignement. Le fibrinogène joue également un rôle important dans l'hémostase primaire : il est le ligand principal de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$, ce qui permet aux plaquettes d'agréger entre elles et de constituer le thrombus blanc.(241)

2 – Indications :

- Evaluation d'une anomalie de synthèse (dysfonction hépatique, traitement par L'asparaginase)
- Evaluation d'une réaction inflammatoire, d'une hémodilution (pertes sanguines importantes, échanges plasmatiques, etc.)
- Bilan pré-opératoire
- Recherche d'une consommation intravasculaire (disséminée ou localisée)
- Recherche d'une fibrinolyse primitive (par libération d'enzymes protéolytiques au cours d'affections pancréatiques, de certains néoplasmes, d'envenimations).
- En cas de résultat pathologique, le suivi peut être indiqué, après substitution à visée correctrice, ou comme marqueur de sévérité et d'évolution. (233) (242)(243)

3 – Matériels :

1. Tube de prélèvement : Sang prélevé sur citrate de sodium, Le dosage sur tube CTAD (citrate, théophylline, adénosine, dipyridamole) est également possible.
2. Réactif de thrombine : Le réactif de thrombine est une substance contenant de la thrombine, une enzyme clé dans la conversion du fibrinogène en fibrine. Il est utilisé pour déclencher la réaction de coagulation du fibrinogène.
3. Chronomètre ou coagulomètre : Un chronomètre ou un coagulomètre est utilisé pour mesurer le temps nécessaire à la formation d'un caillot après l'ajout du réactif de thrombine.
4. Pipettes : Des pipettes sont utilisées pour prélever des quantités précises de réactif de thrombine, de plasma sanguin et d'autres réactifs nécessaires pour réaliser le test.
5. Eau distillée ou réactif de contrôle fourni par le fabricant pour vérifier les performances du test.

4 – Mode opératoire :

Utiliser une solution-mère de thrombine à 500 unités NIH/ml en tampon Michaelis. Conserver la solution mère congelée par petites quantités en tubes plastiques, pendant 15 jours au maximum

à -20°C . Diluer cette solution-mère au 1/5e (100 U NIH/ml) en CaCl_2 M/40. Préparer une dilution au 1/10e et au 1/20e du plasma à tester en tampon Michaelis.

Introduire dans un tube en verre placé au bain-marie à 37°C , 0,2 ml de la dilution du plasma au 1/10e ; attendre 2 minutes pour assurer l'équilibre thermique. Déclencher un chronomètre en ajoutant: rapidement 0,2 ml de la solution de thrombine.

Noter l'apparition des premiers filaments de fibrine en s'aidant d'une pipette Pasteur à extrémité recourbée en crochet, placée dans le tube.

Répéter cette mesure et effectuer le même test sur la dilution au 1/20e.

Effectuer les mêmes mesures sur différentes dilutions (1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50) d'un plasma témoin dont la teneur exacte en fibrinogène est connue. Puis tracer une droite d'étalonnage, en portant en abscisse sur papier millimétré les concentrations de fibrinogène en g/L de plasma et en ordonnée, les temps de coagulation obtenus. Le taux de fibrinogène du plasma à tester est obtenu après lecture sur la droite d'étalonnage, en tenant compte de la dilution utilisée.(244)

5 - Résultats :

5.1 Valeurs normales :

Les valeurs normales du taux de fibrinogène 145–348 mg/dl ou 1,45 – 3,48 g/l .(245)

5.2 Interpretation : valeurs anormales :

- La baisse du fibrinogène témoigne :
 - d'une insuffisance hépatocellulaire ;
 - d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) ;
 - d'une fibrinogénolyse.
- Déficits constitutionnels : afibrinogénémie, dysfibrinogénémie.

- L'augmentation du fibrinogène s'observe dans toutes les situations où la vitesse de sédimentation (VS) est accrue puisqu'elle est une des causes principales de cette augmentation : rhumatismes inflammatoires, connectivites, cancers. (246)

D - Dosage de l'activité coagulante du facteur II (Prothrombine) :

1 - Généralités :

Le facteur II est une glycoprotéine de poids moléculaire 72 kDa, vitamine K-dépendante, synthétisée par le foie.

La prothrombine est activée en thrombine par le complexe Xa-phospholipides-Va «prothrombinase ».

La thrombine joue un rôle central dans les mécanismes de l'hémostase. Elle stimule les plaquettes, transforme le fibrinogène en fibrine, amplifie sa propre formation en activant les facteurs VIII, V, XI et déclenche le système de la protéine C.

Sa demi-vie est de 50-120 heures, le gène du facteur II est localisé sur le chromosome 11.(247)

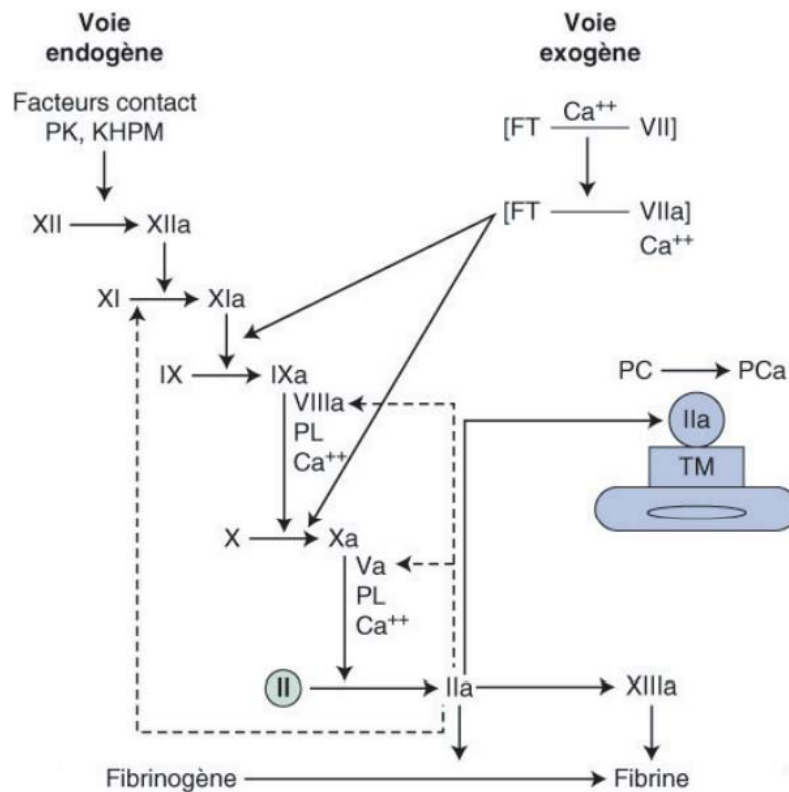


Fig 42 : Place du facteur II. Pointillés: rétroactivation par la thrombine. (252)

2 - Indications :

- Evaluation d'un syndrome hémorragique, si l'on observe une prolongation du temps de Quick et du temps de céphaline activée (TCA).
- Evaluation du risque hémorragique dans un contexte de bilan pré-opératoire lorsque le bilan biologique est indiqué.
- Diagnostic et du suivi d'une hépatopathie ou d'une hypovitaminose.
- du diagnostic et du suivi d'une coagulopathie de consommation.

3 - Matériels :

- 1) Tube de prélèvement : Le sang est généralement prélevé dans un tube de citrate de sodium.
- 2) Les réactifs utilisés sont:

- thromboplastine commerciale : mélange de facteur tissulaire, phospholipides et calcium ;
 - plasma déficient en facteur II: le taux de facteur II doit être inférieur à 0,01 UI/ml. Condition à vérifier à chaque lot en considérant le réactif comme un plasma de patient;
 - tampon Owren Koller pH 7,35.(248)
- 3) Chronomètre ou coagulomètre : Un chronomètre ou un coagulomètre est utilisé pour mesurer le temps nécessaire à la formation d'un caillot après l'ajout du réactif de thromboplastine.
- 4) Pipettes : Des pipettes sont utilisées pour prélever des quantités précises de réactif de thromboplastine, de plasma sanguin et d'autres réactifs nécessaires pour réaliser le test.
- 5) Calibrateur de prothrombine : fourni par le fabricant du test, est utilisé pour étalonner le test et obtenir des résultats précis.

4 - Mode opératoire : (Technique fonctionnelle chronométrique)

1) Calibration :

Les calibrants disponibles sur le marché sont étalonnés par rapport au standard international du National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC). La gamme d'étalonnage est adaptée, encadrant les valeurs obtenues pour le patient. Selon les automates, prévoir une courbe haute (0,15 à 1,50 UI/ml) et une courbe basse (0 à 0,15 UI/ml). En règle générale la dilution est de 1/10, on obtient donc 1 UI/ml. Il existe une relation linéaire en coordonnées bilogarithmiques entre le temps mesuré et les taux de facteur.

La précision du dosage est fonction de la pente de la droite d'étalonnage qui dépend des réactifs et de l'appareillage utilisé.

2) Contrôles :

ontrôles Dans chaque série, il faut passer un contrôle normal (0,80 à 1,20 UI/ml) et un contrôle pathologique (0,30 à 0,50 UI/ml) dans les mêmes conditions qu'un plasma de patient.

3) Dilutions du plasma du patient :

Les dilutions de plasma ne sont pas stables. Elles doivent être préparées extemporanément.

Deux dilutions sont prévues pour chaque patient (1/10 et 1/20). Il est possible de diluer au 1/40 si le taux est supérieur à 1,50 UI/ml. La droite dose-réponse du patient doit être parallèle à la

droite d'étalonnage. La dilution du plasma du patient rend négligeable l'effet des anticoagulants thérapeutiques comme l'héparine. Les lupus anticoagulants (LA) ont peu d'effet sur le TQ, peu sensible aux antiphospholipides du fait de la forte concentration de thromboplastine utilisée.

4) Dosage :

C'est le même volume de dilution approprié du plasma du patient et du plasma déficient en facteur II. L'incubation dure 2 minutes à 37 °C. La thromboplastine est ajoutée et le temps de coagulation mesuré. Les résultats sont lus sur les courbes adaptées : les résultats des dilutions au 1/10 sont lus directement, au 1/20, ils sont multipliés par 2 et au 1/40, ils sont multipliés par 4.(249)

5 - Résultats :

5.1 Valeurs normales :

Les résultats de la technique fonctionnelle sont:

- en pourcentage de la normale ou en UI/ml (100 % = 1 UI/ml);
- à partir de 12 mois et adultes : 0,70 à 1,40 UI/ml (soit 70–140 %);
- à la naissance : 0,25 à 0,70 UI/ml ;
- lors de la grossesse : 0,70 à 2,00 UI/ml.

5.2 Interprétation : valeurs anormales

1) Déficits acquis :

On distingue :

• les déficits isolés :

- autoanticorps contre facteur II
- associé à une infection virale chez l'enfant

• les déficits combinés :

- hypovitaminose K pathologique ou due à un traitement aux antivitamines K
- insuffisance hépatocellulaire
- coagulopathie de consommation (coagulation intravasculaire disséminée).

2) Déficits constitutionnels :

Le diagnostic de déficit constitutionnel est posé si le déficit persiste sur deux prélèvements espacés, si les causes de déficits acquis ont été éliminées, si l'enquête familiale est informative et retrouve exceptionnellement:

- < 0,01 UI/ml : déficit majeur
- de 0,01 à 0,20 UI/ml : déficit mineur
- de 0,20 à 0,40 UI/ml : déficit modéré
- de 0,40 à 0,70 UI/ml : taux limite.

Le déficit est typé en fonction du résultat du II antigène. On distingue :

- un déficit en facteur II de type I quantitatif (II antigène diminué);
- un déficit en facteur II de type II qualitatif (II antigène normal).

Un taux inférieur à 0,05 UI/ml peut présenter un risque hémorragique.(250)(251)

E – Dosage de l'activité coagulante du facteur V (proaccéléline) :

1 – Généralités :

– Le facteur V est une glycoprotéine de PM 330 000, synthétisée par le foie. C'est un cofacteur enzymatique. La proaccéléline est activée par le facteur Xa ou la thrombine. Le facteur Xa forme un complexe avec les phospholipides et le Va (prothrombinase) pour activer la prothrombine en thrombine.

– Concentration plasmatique : 5–10 mg/l.

– Demi-vie : 12–36 heures.

– Le facteur V activé est régulé par la protéine C activée (PCA), il est aussi le cofacteur de la PCA dans la régulation du facteur VIII activé. Le gène du facteur V est localisé sur le chromosome 1.(252)(253)(254)

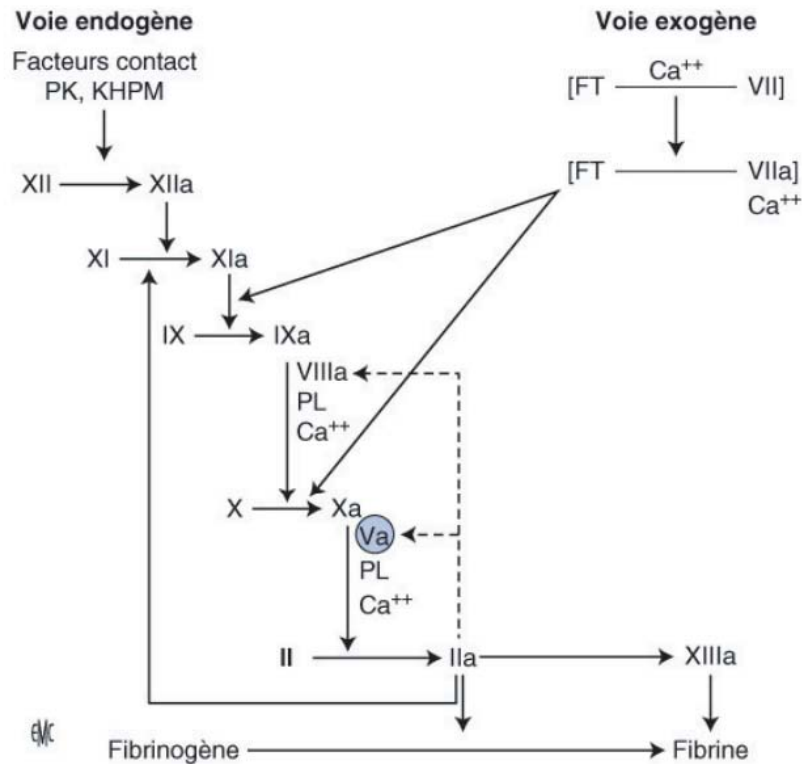


Fig 43 : Place du facteur V. FT : facteur tissulaire ; PK : prékallitréine ; KHPM : kininogène de haut poids moléculaire ; PL : phospholipides; pointillés: rétroactivation par la thrombine.(260)

2 - Indications :

- Devant un allongement du temps de Quick et du temps de céphaline avec activateur (TCA) lors de l'exploration d'un syndrome hémorragique.
- L'évaluation du risque hémorragique dans un contexte de bilan pré-opératoire lorsque le bilan biologique est indiqué.
- Diagnostic et du suivi d'une hépatopathie, d'une hypovitaminose K
- Diagnostic et du suivi d'une coagulopathie de consommation.(255)

3 - Matériels :

- 1 Tube de prélèvement : Le sang est généralement prélevé dans un tube de citrate de sodium.
- 2 Réactifs spécifiques :
 - Thromboplastine commerciale : mélange de facteur tissulaire, phospholipides et calcium.
 - Plasma déficient en facteur V : le taux de facteur V doit être inférieur à 0,01 UI/ml. Condition à

vérifier à chaque lot en considérant le réactif comme un plasma de patient.

– Tampon Owren Koller pH 7,35.

15 Chronomètre ou coagulomètre : Un chronomètre ou un coagulomètre est utilisé pour mesurer le temps de coagulation ou d'autres paramètres associés à l'activité coagulante du facteur V.

16 Pipettes : Des pipettes sont utilisées pour prélever des quantités précises de réactifs et de plasma sanguin nécessaires pour réaliser le test.

17 Équipement de laboratoire standard : Vous aurez également besoin d'équipement de laboratoire standard, tels que des pipettes, des tubes à essai, des agitateurs, etc., pour préparer et manipuler les échantillons et les réactifs.(256)

4 – Mode opératoire : Technique fonctionnelle chronométrique

Test chronométrique en un temps. La sensibilité du test est augmentée en diluant le plasma du patient. Le plasma réactif est sélectivement et totalement dépourvu du facteur à doser.

- Calibration : Les calibrants disponibles sur le marché sont étalonnés par rapport au standard international du National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC).

Gamme d'étalonnage adaptée, encadrant les valeurs obtenues pour le patient. Selon les automates, prévoir une courbe haute (0,15 à 1,50 UI/ml) et une courbe basse (0 à 0,15 UI/ml).

En règle générale, la dilution au 1/10 = 1 UI/ml.

Il existe une relation linéaire en coordonnées bi logarithmiques entre le temps mesuré et les taux de facteur. La précision du dosage est fonction de la pente de la droite d'étalonnage, qui dépend des réactifs et de l'appareillage utilisé.

- Contrôles : Dans chaque série, passer un contrôle normal (0,80 à 1,20 UI/ml) et un contrôle pathologique (0,30 à 0,50 UI/ml) dans les mêmes conditions qu'un plasma de patient.

- Dilutions du plasma du patient : Les dilutions de plasma ne sont pas stables. Il faut les préparer extemporanément. Prévoir deux dilutions par patient (1/10 et 1/20). Possibilité de diluer au 1/40 si le taux est > 1,50 UI/ml. La droite dose-réponse du patient doit être parallèle à la droite d'étalonnage. Une non-réponse évoque un possible auto-anticorps antifacteur V. La dilution du plasma du patient rend négligeable l'effet des anticoagulants thérapeutiques comme

l'héparine. Les lupus anticoagulants (LA) ont peu d'effet sur le TQ, peu sensible aux antiphospholipides du fait de la forte concentration de thromboplastine utilisée.

- Dosage :

- Même volume de dilution appropriée du plasma du patient et du plasma déficient en facteur V.
- Incubation 2 minutes à 37 °C.
- Ajout de thromboplastine et mesure du temps de coagulation. Les résultats sont lus sur les courbes adaptées : les résultats des dilutions au 1/10 sont lus directement, les résultats des dilutions au 1/20 sont multipliés par 2, ceux des dilutions au 1/40 sont multipliés par 4.(257)

5 - Résultats :

5.1 Valeurs normales :

Ils sont exprimés en pourcentage de la normale ou en UI/ml : 100 % = 1 UI/ml.

- À partir de l'âge de 12 mois et adultes : 0,70 à 1,50 UI/ml (soit 70 % à 150 %).
- À la naissance : 0,40 à 1,20 UI/ml.
- Grossesse : 0,40 à 2,00 UI/ml.

5.2 Interpretation : valeurs anormales :

1 - Déficits acquis :

- Déficit isolé :
 - autoanticorps contre le facteur V. La plupart des cas surviennent après une intervention chirurgicale utilisant des biocolles. Ces inhibiteurs sont en général transitoires.
- Déficits combinés :
 - insuffisance hépatocellulaire : signe de mauvais pronostic de l'atteinte cellulaire hépatique ;
 - coagulopathie de consommation (coagulation intravasculaire disséminée [CIVD]).

2 - Déficits constitutionnels :

Le diagnostic de déficit constitutionnel est posé si le déficit persiste sur deux prélèvements espacés, si les causes de déficits acquis ont été éliminées, si l'enquête familiale est informative.

Il est très rare, de prévalence 1/1 000 000 hétérozygotes. Les déficits sévères sont exceptionnels. En fonction du taux de facteur, on distingue :

- < 0,01 UI/ml, déficit majeur;
- de 0,01 à 0,20 UI/ml, déficit mineur;
- de 0,20 à 0,40 UI/ml, déficit modéré ;
- de 0,40 à 0,70 UI/ml, taux limite.

Typage du déficit en fonction du résultat du V antigène :

- déficit en facteur de type I quantitatif (V antigène diminué);
- déficit en facteur de type II qualitatif (V antigène normal).

Un taux inférieur à 0,10 UI/ml peut être à l'origine d'un syndrome hémorragique, mais certains patients avec une activité coagulante du facteur V inférieure à 0,05 UI/ml, voire inférieure à 0,01 UI/ml sont asymptomatiques.

Le syndrome hémorragique est corrélé au taux de facteur V plaquettaire.

Le taux hémostatique est à 0,25 UI/ml.(258)

F – Dosage de l'activité coagulante du facteur VII (proconvertine) :

1 – Généralités :

Le facteur VII est une glycoprotéine de PM 50 000, vitamine K dépendante, synthétisée par le foie. C'est un zymogène de sérine protéase. Le facteur tissulaire (FT) inséré dans les phospholipides a une forte affinité pour le facteur VII.

L'association FT-VII active le facteur VII en VIIa, et initie la « voie exogène » (extrinsèque) de la cascade de la coagulation. Le complexe FT-VIIa active ensuite les facteurs IX et X

Concentration plasmatique : 0,35–0,60 mg/l.

Demi-vie : 4–6 heures.

Le gène du facteur VII est localisé sur le chromosome 13.(259)

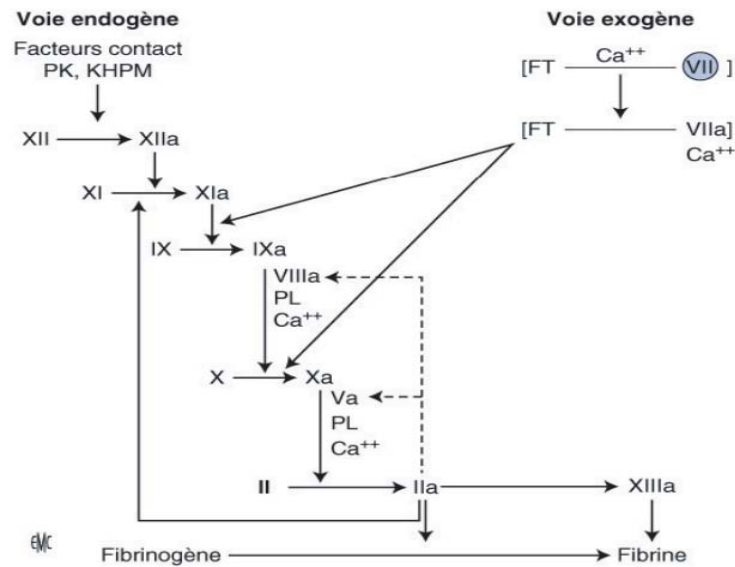


Fig 44 : Place du facteur VII. FT : facteur tissulaire ; PK : prékalligréine ; KHPM : kininogène de haut poids moléculaire ; PL : phospholipides; pointillés: rétroactivation par la thrombine (264)

2 - Indications :

- Devant un allongement du temps de Quick et du temps de céphaline avec activateur (TCA) lors de l'exploration d'un syndrome hémorragique.
- L'évaluation du risque hémorragique dans un contexte de bilan pré-opératoire lorsque le bilan biologique est indiqué.
- Diagnostic et du suivi d'une hépatopathie, d'une hypovitaminose K
- Diagnostic et du suivi d'une coagulopathie de consommation.

3 - Matériels :

- 1) Tube de prélèvement : Le sang est généralement prélevé dans un tube de citrate de sodium.
- 2) Réactifs spécifiques :
 - Thromboplastine commerciale : mélange de facteur tissulaire, phospholipides et calcium. L'origine animale ou humaine permet de différencier certains variants. L'utilisation de thromboplastine recombinante humaine pourrait permettre une meilleure standardisation.
 - Plasma déficient en facteur VII: le taux de facteur VII doit être inférieur à 0,01 UI/ml.

Condition à vérifier à chaque lot en considérant le réactif comme un plasma de patient.

- Tampon Owren Koller pH 7,35.(260)

3) Chronomètre ou coagulomètre : Un chronomètre ou un coagulomètre est utilisé pour mesurer le temps de coagulation ou d'autres paramètres associés à l'activité coagulante du facteur VII.

4) Pipettes : Des pipettes sont utilisées pour prélever des quantités précises de réactifs et de plasma sanguin nécessaires pour réaliser le test.

5) Équipement de laboratoire standard : Vous aurez également besoin d'équipement de laboratoire standard, tels que des pipettes, des tubes à essai, des agitateurs, etc., pour préparer et manipuler les échantillons et les réactifs.

4 – Mode opératoire : (Technique fonctionnelle chronométrique)

• Calibration :

- Les calibrants disponibles sur le marché sont étalonnés par rapport au standard international du National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC).
- Gamme d'étalonnage adaptée, encadrant les valeurs obtenues pour le patient. Selon les automates, prévoir une courbe haute (0,15 à 1,50 UI/ml) et une courbe basse (0 à 0,15 UI/ml).
- En règle générale, la dilution au 1/10 = 1 UI/ml. Il existe une relation linéaire en coordonnées bilogarithmiques entre le temps mesuré et les taux de facteur. La précision du dosage est fonction de la pente de la droite d'étalonnage, qui dépend des réactifs et de l'appareillage utilisé.

• Contrôles :

Dans chaque série, passer un contrôle normal (0,80 à 1,20 UI/ml) et un contrôle pathologique (0,30 à 0,50 UI/ml) dans les mêmes conditions qu'un plasma de patient.

Dilutions du plasma du patient

- Les dilutions de plasma ne sont pas stables. Il faut les faire extemporanément.
- Prévoir deux dilutions par patient (1/10 et 1/20).
- Possibilité de diluer au 1/40 si le taux est > 1,50 UI/ml.

- La droite dose-réponse du patient doit être parallèle à la droite d'étalonnage.
- La dilution du plasma du patient rend négligeable l'effet des anticoagulants thérapeutiques comme l'héparine. Les lupus anticoagulants (LA) ont peu d'effet sur le TQ, peu sensible aux antiphospholipides du fait de la forte concentration de thromboplastine utilisée.

• **Dosage :**

- Même volume de dilution appropriée du plasma du patient et du plasma déficient en facteur VII.
- Incubation 2 minutes à 37 °C.
- Ajout de thromboplastine et mesure du temps de coagulation. Les résultats sont lus sur les courbes adaptées : les résultats des dilutions au 1/10 sont lus directement, ceux des dilutions au 1/20 sont multipliés par 2, ceux des dilutions au 1/40 sont multipliés par 4. (261)

5 - Résultats :

5.1 Valeurs normales :

En pourcentage de la normale ou en UI/ml : 100 % = 1 UI/ml.

- À partir de l'âge de 12 mois et adultes : 0,70 à 1,40 UI/ml (soit 70 % à 140 %).
- À la naissance : 0,25 à 1,05 UI/ml.
- Grossesse : 0,84 à 3,36 UI/ml.

5.2 : Valeurs anormales : interprétation

a) Déficits acquis :

Ils sont les plus fréquents. Étant donné sa demi-vie très courte, le facteur VII est le premier à diminuer ou à être consommé.

⇒ Déficits isolés :

- Déficit modéré en vitamine K (début d'un traitement par antivitamines K).
- Autoanticorps contre le facteur VII.

⇒ Déficits combinés :

- Hypovitaminose K pathologique ou due à un traitement aux antivitamines K.

- Insuffisance hépatocellulaire.
- Coagulopathie de consommation (coagulation intravasculaire disséminée [CIVD]).

b) Déficits constitutionnels :

Le diagnostic de déficit constitutionnel est posé si le déficit persiste sur deux prélèvements espacés, si les causes de déficits acquis ont été éliminées, si l'enquête familiale est informative. on définit:

- < 0,01 UI/ml, déficit majeur;
- de 0,01 à 0,20 UI/ml, déficit mineur;
- de 0,20 à 0,40 UI/ml, déficit modéré ;
- de 0,40 à 0,70 UI/ml, taux limite.

Pour certains variants, le dosage peut dépendre du réactif thromboplastine utilisé.

Typage du déficit en fonction du résultat du VII antigène :

- déficit en facteur de type I quantitatif (VII antigène diminué);
- déficit en facteur de type II qualitatif (VII antigène normal).

Il n'existe pas d'élément prédictif du risque hémorragique, quel que soit le test d'hémostase utilisé.

Un taux < 0,10 UI/ml (Tp < 40 %) peut être à l'origine d'un syndrome hémorragique, mais certains patients avec une activité coagulante du facteur VII < 0,05 UI/ml, voire < 0,01 UI/ml, sont asymptomatiques.

Le taux hémostatique est à 0,20 UI/ml.

Des études en biologie moléculaire ont permis de mieux comprendre la relation déficit et risque hémorragique. Le syndrome hémorragique est en rapport avec le site muté :

- site de liaison au facteur tissulaire : pas de syndrome hémorragique ;
- site catalytique : syndrome hémorragique.(252) (262) (263) (264) (265)

G – Dosage de l'activité coagulante du facteur X (facteur Stuart) :

1 – Généralités :

Le facteur X est une glycoprotéine de PM 59 000, vitamine K dépendante, synthétisée par le foie. C'est un zymogène de sérine protéase.

Le facteur X est activé en Xa soit par le complexe facteur tissulaire-VIIa, soit par le complexe IXa-phospholipide-VIIIa. Il appartient à la voie commune de la coagulation. Le facteur Xa forme un complexe avec les phospholipides et le Va « prothrombinase » pour activer la prothrombine en thrombine.

Concentration plasmatique : 7 - 17 mg/L.

Demi-vie : 36 - 48 heures.

Le gène du facteur X est localisé sur le chromosome 13.(266)

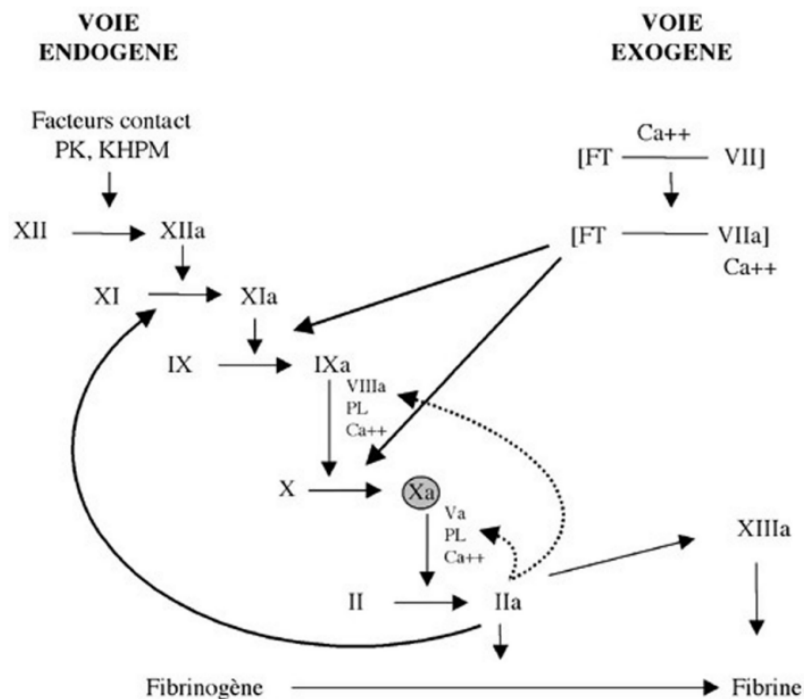


Fig 45 : Place du facteur X. FT : facteur tissulaire ; PK : prékallitréine ; KHPM : kininogène de haut poids moléculaire ; PL : phospholipides ; ----- : rétroactivation par la thrombine (272)

2 – Indications :

- Devant un allongement du temps de Quick et du temps de céphaline avec activateur (TCA) lors de l'exploration d'un syndrome hémorragique.
- L'évaluation du risque hémorragique dans un contexte de bilan pré-opératoire lorsque le bilan biologique est indiqué.
- Diagnostic et du suivi d'une hépatopathie, d'une hypovitaminose K
- Diagnostic et du suivi d'une coagulopathie de consommation.(267)

3 – Matériels :

1. Tube de prélèvement : Le sang est généralement prélevé dans un tube de citrate de sodium.
2. Réactifs spécifiques :
 - Thromboplastine commerciale : mélange de facteur tissulaire, phospholipides et calcium.
 - Plasma déficient en facteur X : le taux de facteur X doit être inférieur à 0,01 UI/mL. Condition à vérifier à chaque lot en considérant le réactif comme un plasma de patient.
 - Tampon Owren Koller pH 7,35.
3. Chronomètre ou coagulomètre : Un chronomètre ou un coagulomètre est utilisé pour mesurer le temps de coagulation ou d'autres paramètres associés à l'activité du facteur X (Stuart).
4. Pipettes : Des pipettes sont utilisées pour prélever des quantités précises de réactifs et de plasma sanguin nécessaires pour réaliser le test.
5. Équipement de laboratoire standard : Vous aurez également besoin d'équipement de laboratoire standard, tels que des pipettes, des tubes à essai, des agitateurs, etc., pour préparer et manipuler les échantillons et les réactifs.(268)

4 – Mode opératoire : (Technique fonctionnelle chronométrique) :

• Calibration :

Les calibrants disponibles sur le marché sont étalonnés par rapport au standard international du NIBSC (National Institute for Biological Standards and Controls).

Gamme d'étalonnage adaptée, encadrant les valeurs obtenues pour le patient. Selon les automates, prévoir une courbe haute (0,15 à 1,50 UI/mL) et une courbe basse (0 à 0,15 UI/mL).

En règle générale la dilution au 1/10 = 1 UI/mL. Il existe une relation linéaire en coordonnées bi logarithmiques entre le temps mesuré et les taux de facteur. La précision du dosage est fonction de la pente de la droite d'étalonnage qui dépend des réactifs et de l'appareillage utilisé.

* Contrôles :

Dans chaque série, passer un contrôle normal (0,80 à 1,20 UI/mL) et un contrôle pathologique (0,30 à 0,50 UI/mL) dans les mêmes conditions qu'un plasma de patient.

• Dilutions :

Les dilutions du plasma du patient Les dilutions de plasma ne sont pas stables. Il faut les faire extemporanément et les conserver à +4 °C (glace pilée).

Prévoir deux dilutions par patient (1/10 et 1/20). Possibilité de diluer au 1/40 si le taux est > 1,50 UI/mL.

La droite dose-réponse du patient doit être parallèle à la droite d'étalonnage.

La dilution du plasma du patient rend négligeable l'effet des anticoagulants thérapeutiques comme l'héparine. Les lupus anticoagulants (LA) ont peu d'effet sur le TQ peu sensible aux antiphospholipides du fait de la forte concentration de thromboplastine utilisée.

* **Dosage :**

- Même volume de dilution appropriée du plasma du patient et du plasma déficient en facteur X.
- Incubation 2 minutes à 37 °C.
- Ajout de thromboplastine et mesure du temps de coagulation.

Les résultats sont lus sur les courbes adaptées : les résultats des dilutions au 1/10 sont lus directement, les résultats des dilutions au 1/20 sont multipliés par 2, ceux des dilutions au 1/40 sont multipliés par 4.(260)(269)

5 - Résultats :

5.1 Valeurs normales :

Ils sont exprimés en pourcentage de la normale ou en UI/mL : 100 % = 1 UI/mL.

- À partir de l'âge de 12 mois et adultes : 0,70 à 1,50 UI/mL (soit 70 % - 150 %).

- À la naissance : 0,10 à 0,70 UI/mL.

- Grossesse : 0,70 à 2,00 UI/mL.

5.2 Interprétation : valeurs anormales :

• Déficits acquis :

⇒ Déficits isolés :

- autoanticorps contre le facteur X ;
- amylose primitive ou secondaire à un myélome.

⇒ Déficits combinés :

- hypovitaminose K pathologique ou due à un traitement aux antivitamines K ;
- insuffisance hépatocellulaire ;
- coagulopathie de consommation (coagulation intravasculaire disséminée [CIVD]).

• Déficits constitutionnels :

⇒ Le diagnostic de déficit constitutionnel est posé si le déficit persiste sur deux prélèvements espacés, si les causes de déficits acquis ont été éliminées, si l'enquête familiale est informative. Il est très rare, de prévalence 1/500 hétérozygotes, les déficits sévères sont exceptionnels.

Suivant le taux de facteur, on distingue :

- < 0,01 UI/mL, déficit majeur ;
- de 0,01 à 0,20 UI/mL, déficit mineur ;
- de 0,20 à 0,40 UI/mL, déficit modéré
- de 0,40 à 0,70 UI/mL, taux limite.

⇒ Typage du déficit en fonction du résultat du X antigène :

- déficit en facteur de type I quantitatif (X antigène diminué) ;
 - déficit en facteur de type II qualitatif (X antigène normal).
- Un taux < 0,05 UI/mL peut présenter un syndrome hémorragique, mais est le plus souvent asymptomatique.

- Le taux hémostatique est à 0,25 UI/mL.(260)(270)

H - Dosage de l'activité coagulante du facteur VIII (anti-hémophilique A) :

1 - Généralités :

Le facteur VIII ou antihémophilique A est un facteur de la coagulation, cofacteur enzymatique du facteur IXa, qui active le facteur X. Il circule dans le plasma lié au facteur Willebrand. Son dosage est réalisé en deuxième intention devant un allongement isolé du temps de céphaline plus activateur.

Sa demi-vie est de 10 à 16 heures.

Le déficit constitutionnel en facteur VIII ou hémophilie A est la plus fréquente des maladies hémorragiques graves : 1/5 000 naissances de sexe masculin. La sévérité de la maladie est directement liée au taux de facteur.(271)

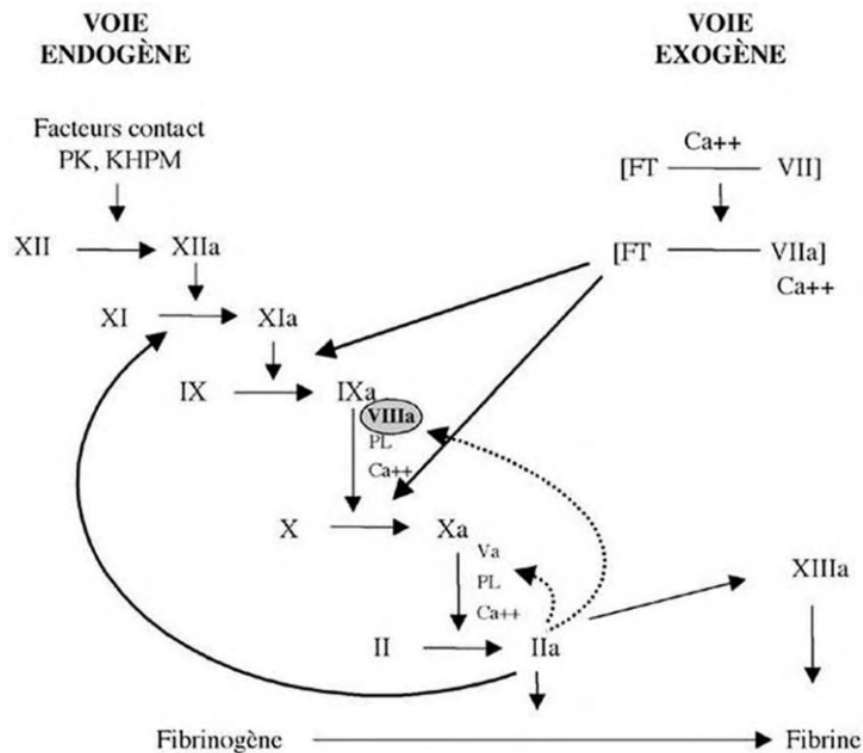


Fig 46: Place du facteur VIII. FT : facteur tissulaire ; PK : prékallicroïne; KHMP : kininogène de haut poids moléculaire; PL : phospholipides ; ----- : rétroactivation par la thrombine.(275)

2 – Indications :

- Si le temps de céphaline activée (TCA) est prolongé de manière isolée et/ou si des saignements inexpliqués surviennent, il est important de considérer la possibilité de déficits modérés en facteur VIII (FVIII) qui pourraient ne pas avoir un impact significatif sur le TCA, en fonction des réactifs utilisés.
- Suivi du traitement des patients atteints d'hémophilie A ou de la maladie de Willebrand qui reçoivent des concentrés de FVIII ou de la desmopressine.(272)

3 – Matériels : (Technique fonctionnelle chronométrique)

- Tube de prélèvement : Le sang est généralement prélevé dans un tube de citrate de sodium, 0,105 ou 0,109 M utilisée dans un rapport anticoagulant/sang total : 1 pour 9, volume à volume. Ces conditions sont valables pour un hématicrite compris entre 0,30 et 0,55 L/L, sinon le volume d'anticoagulant doit être adapté à l'hématicrite selon la formule :

Volume d' anticoagulant en mL =

Volume sang (mL) × (100 – hématicrite %) / 595 – hématicrite %

Le mélange CTAD (citrate trisodique, théophylline, adénosine, dipyridamole), inhibiteur de l'activation plaquettaire, est utilisable pour tous les tests d'hémostase en dehors de l'étude des fonctions plaquettaires. Son utilisation est vivement recommandée lorsque les contraintes de délai ne peuvent être respectées, en particulier pour le suivi des traitements hépariniques. Il permet une meilleure conservation du prélèvement mais induit un surcoût.

- Réactifs spécifiques :
 - Réactif TCA, composé de céphaline qui est un réactif phospholipidique apporté à une concentration optimale, et d'un activateur du système contact de la coagulation (sous forme de microparticules solides ou sous forme soluble).
 - Plasma déficient en facteur VIII : le taux de facteur VIII doit être inférieur à 0,01 UI/mL. Condition à vérifier à chaque lot en dosant le réactif comme un patient.
 - Chlorure de calcium 0,025 M.
 - Tampon Owren Koller pH 7,35.

- Chronomètre ou coagulomètre : Un chronomètre ou un coagulomètre est utilisé pour mesurer le temps de coagulation ou d'autres paramètres associés à l'activité du facteur VIII.
- Pipettes : Des pipettes sont utilisées pour prélever des quantités précises de réactifs et de plasma sanguin nécessaires pour réaliser le test.
- Équipement de laboratoire standard : Vous aurez également besoin d'équipement de laboratoire standard, tels que des pipettes, des tubes à essai, des agitateurs, etc., pour préparer et manipuler les échantillons et les réactifs. (263) (273)

4 - Mode opératoire : (Technique fonctionnelle chronométrique)

• Calibration :

Les calibrants disponibles sur le marché sont étalonnés par rapport au standard international du NIBSC (National Institute for Biological Standards and Controls).

Gamme d'étalonnage adaptée, encadrant les valeurs obtenues pour le patient. Selon les automates, prévoir une courbe haute (0,15 à 1,50 UI/mL) et une courbe basse (0 à 0,15 UI/mL).

En règle générale, la dilution au dixième = 1 UI/mL.

Il existe une relation linéaire en coordonnées bilogarithmiques entre le temps mesuré et les taux de facteur. La précision du dosage est fonction de la pente de la droite d'étalonnage, qui dépend des réactifs et de l'appareillage utilisé.

• Contrôles :

Dans chaque série, passer un contrôle normal (0,80 à 1,20 UI/mL) et un contrôle pathologique (0,30 à 0,50 UI/mL) dans les mêmes conditions qu'un plasma de patient.

• Dilutions du plasma du patient :

Les dilutions de plasma ne sont pas stables. Il faut les faire extemporanément et les conserver à +4 °C (glace pilée).

Prévoir deux dilutions par patient (1/10 et 1/20).

Possibilité de diluer au 1/40 si le taux est > 1,50 UI/mL.

La droite dose-réponse du patient doit être parallèle à la droite d'étalonnage.

La dilution du plasma du patient rend négligeable l'effet des anticoagulants thérapeutiques comme l'héparine.

Les lupus anticoagulants (LA) puissants peuvent affecter la mesure du facteur en système TCA : utiliser un réactif TCA peu sensible ou diluer fortement le plasma du patient au 1/40e, 1/80e voire au 1/160e. On observe la correction du déficit apparent avec les dilutions croissantes.

• Dosage :

- Même volume de dilution appropriée du plasma du patient, de céphaline plus activateur et du plasma déficient en facteur VIII.
- Incubation 2 minutes à 37 °C.
- Ajout de calcium et mesure du temps de coagulation.

Les résultats sont lus sur les courbes adaptées : les résultats des dilutions au 1/10 sont lus directement, ceux des dilutions au 1/20 sont multipliés par 2, ceux des dilutions au 1/40 sont multipliés par 4.

Attention, une amorce de coagulation donne des temps plus courts par activation des facteurs, et une coagulation avérée donne des temps plus longs par consommation des facteurs.

(263)(274)

5 - Résultats :

5.1 Valeurs normales :

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la normale ou en UI/mL : 100 % = 1 UI/mL.

- À partir de l'âge de 1 mois et adultes : 0,50 à 1,50 UI/mL (soit 50 %-150 %).
- À la naissance : 0,50 à 2,00 UI/mL.
- Grossesse : 0,70 à 6,00 UI/mL.

- Groupe sanguin O : 0,40 à 0,80 UI/mL.

5.2 Interprétation : Valeurs anormales :

- **Déficits acquis :**

- Déficit isolé : autoanticorps contre le facteur VIII.
- Déficit combiné : coagulopathie de consommation (coagulation intravasculaire disséminée [CIVD]).

- **Déficits constitutionnels :**

1) Hémophilie A :

Le diagnostic de déficit constitutionnel est établi si le déficit persiste sur deux prélèvements espacés, si les causes de déficits acquis ont été éliminées, si l'enquête familiale est informative.

La sévérité de la maladie est directement liée au taux de facteur :

- < 0,01 UI/mL : hémophilie A sévère;
- de 0,01 à 0,05 UI/mL : hémophilie A modérée;
- de 0,05 à 0,25 UI/mL : hémophilie A mineure ;
- de 0,25 à 0,40 UI/mL : taux abaissé
- de 0,40 à 0,70 UI/mL : taux limite.

Un taux < 0,25 UI/mL représente un risque hémorragique.

Le taux hémostatique est à 0,40 UI/mL.

L'étude en biologie moléculaire permet de définir s'il s'agit d'une délétion, d'une mutation ponctuelle ou de l'inversion dans l'intron 22 (50 % des cas d'hémophilie A majeure).

2) Maladie de Willebrand :

- Maladie de Willebrand type 1 : la diminution du taux de facteur VIII est associée à celle du facteur Willebrand.
- Maladie de Willebrand type 2N : seul le taux de facteur VIII est diminué. Il existe une anomalie du facteur Willebrand au niveau du site de liaison du facteur VIII, qui n'est plus fixé et donc n'est plus protégé de la dégradation protéolytique

• **Augmentation du facteur VIII :**

- Syndrome inflammatoire.
- Prise de contraceptifs oraux.
- Grossesse.
- Risque accru de thromboembolie (thrombophilie) : augmentation permanente et indépendante de la réaction inflammatoire due à un déterminisme familial. (263) (275)

I – Dosage de l'activité coagulante du facteur IX (anti-hémophilique B) :

1 – Généralités :

Le facteur IX est une glycoprotéine de PM 57 000 synthétisée par le foie. C'est un zymogène de sérine protéase. Le facteur IX est activé en IXa soit par le complexe facteur tissulaire-VIIa, soit par le facteur XIa. Le facteur IXa forme un complexe avec le facteur VIIIa et les phospholipides pour activer le facteur X.

Sa concentration plasmatique est de 3-5 mg/L.

Sa demi vie est de 20 à 24 heures. Le gène du facteur IX est localisé sur le chromosome X.(276)

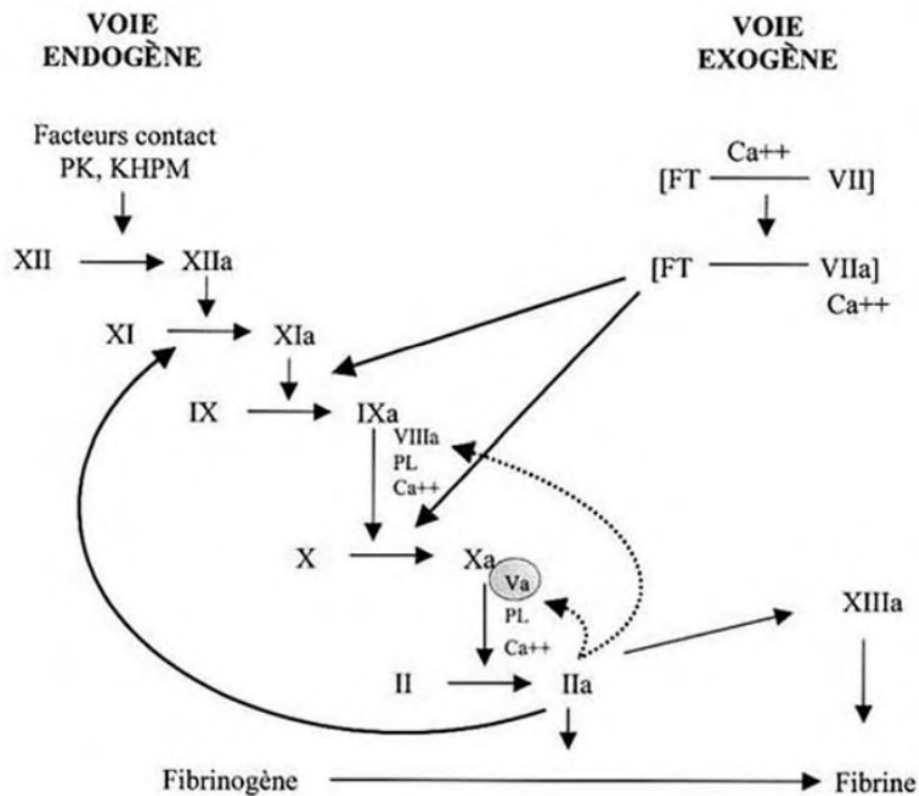


Fig 47: Place du facteur IX. FT : facteur tissulaire ; PK : prékallitréine; KHPM : kininogène de haut poids moléculaire; PL : phospholipides ; --- : rétroactivation par la thrombine (283)

2 - Indications :

- En cas d'allongement isolé du temps de céphaline avec activateur (TCA) et/ou de survenue de manifestations hémorragiques non expliquées, car, selon les réactifs utilisés, des déficits modérés en FIX peuvent ne pas allonger significativement le TCA.
- La mesure du FIX: C'est également utile dans le suivi du traitement des patients hémophiles B.(277)

3 - Matériels :

1. Tube de prélèvement : Le sang est généralement prélevé dans un tube de citrate de sodium, l'anticoagulant de référence est une solution de citrate trisodique 0,105 ou 0,109 M utilisée dans un rapport anticoagulant/sang total : 1 pour 9, volume à volume.

Ces conditions sont valables pour un hémocrite compris entre 0,30 et 0,55 L/L, sinon le

volume d'anticoagulant doit être adapté à l'hématocrite selon la formule :

Volume d' anticoagulant en mL =

Volume sang (mL) × (100 – hématocrite %) / 595 – hématocrite %

Le mélange CTAD (citrates trisodiques, théophylline, adénosine, dipyridamole), inhibiteur de l'activation plaquettaire, est utilisable pour tous les tests d'hémostase en dehors de l'étude des fonctions plaquettaires. Son utilisation est vivement recommandée lorsque les contraintes de délai ne peuvent être respectées, en particulier pour le suivi des traitements hépariniques. Il permet une meilleure conservation du prélèvement mais induit un surcoût.

2. Réactifs spécifiques :

- Réactif TCA, composé de céphaline qui est un réactif phospholipidique apporté à une concentration optimale, et d'un activateur du système contact de la coagulation (sous forme de microparticules solides ou sous forme soluble).
- Plasma déficient en facteur IX : le taux de facteur IX doit être inférieur à 0,01 UI/mL. Condition à vérifier à chaque lot en considérant le réactif comme un plasma de patient.
- Chlorure de calcium 0,025 M.
- Tampon Owren Koller pH 7,35.

3. Chronomètre ou coagulomètre : Un chronomètre ou un coagulomètre est utilisé pour mesurer le temps de coagulation ou d'autres paramètres associés à l'activité du facteur IX.

4. Pipettes : Des pipettes sont utilisées pour prélever des quantités précises de réactifs et de plasma sanguin nécessaires pour réaliser le test.

5. Équipement de laboratoire standard : Vous aurez également besoin d'équipement de laboratoire standard, tels que des pipettes, des tubes à essai, des agitateurs, etc., pour préparer et manipuler les échantillons et les réactifs.(278) (279) (280)

4- Mode opératoire : (Technique fonctionnelle chromométrique) :

- **Calibration :**

- Les calibrants disponibles sur le marché sont étalonnés par rapport au standard international du NIBSC (National Institute for Biological Standards and Controls).
- Gamme d'étalonnage adaptée, encadrant les valeurs obtenues pour le patient. Selon les automates, prévoir une courbe haute (0,15 à 1,50 UI/mL) et une courbe basse (0 à 0,15 UI/mL).
- En règle générale, la dilution au 1/10 = 1 UI/mL. Il existe une relation linéaire en coordonnées bilogarithmiques entre le temps mesuré et les taux de facteur. La précision du dosage est fonction de la pente de la droite d'étalonnage, qui dépend des réactifs et de l'appareillage utilisé.

- **Contrôles :**

Dans chaque série, il faut passer un contrôle normal (0,80 à 1,20 UI/mL) et un contrôle pathologique (0,30 à 0,50 UI/mL) dans les mêmes conditions qu'un plasma de patient.

- **Dilutions du plasma du patient :**

Les dilutions de plasma ne sont pas stables. Il faut les faire extemporanément et les conserver à +4 °C (glace pilée). Prévoir deux dilutions par patient (1/10 et 1/20). Possibilité de diluer au 1/40 si le taux est > 1,50 UI/mL. La droite dose-réponse du patient doit être parallèle à la droite d'étalonnage. La dilution du plasma du patient rend négligeable l'effet des anticoagulants thérapeutiques comme l'héparine. Les lupus anticoagulants (LA) puissants peuvent affecter la mesure du facteur en système TCA : utiliser un réactif peu sensible ou diluer fortement le plasma du patient au 1/40e, 1/80e voire au 1/160e. On observe la correction du déficit apparent avec les dilutions croissantes.

- **Dosage :**

- Même volume de dilution appropriée du plasma du patient, de céphaline plus activateur et du plasma déficient en facteur IX.
- Incubation 2 minutes à 37 °C.
- Ajout de calcium et mesure du temps de coagulation.

Les résultats sont lus sur les courbes adaptées : les résultats des dilutions au 1/10 sont lus directement, ceux des dilutions au 1/20 sont multipliés par 2, ceux des dilutions au 1/40 sont multipliés par 4. (270) (271)

5 – Résultats :

5.1 Valeurs normales :

- Les résultats sont exprimés en pourcentage de la normale ou en UI/mL : 100 % = 1 UI/mL.
- À partir de l'âge de 12 mois et adultes : 0,60 à 1,60 UI/mL (soit 60 %–160 %).
- À la naissance : 0,20 à 0,80 UI/mL.
- Grossesse : inchangé ou diminution de 10 à 30 %.

5.2 Interprétation : valeurs anormales

• Déficits acquis :

- Déficit isolé : autoanticorps contre le facteur IX.
- Déficients combinés : hypovitaminose K pathologique ou due à un traitement aux antivitamines K.
- Insuffisance hépatocellulaire.

• Déficits constitutionnels : hémophilie B

Le diagnostic de déficit constitutionnel est établi si le déficit persiste sur deux prélèvements espacés, si les causes de déficits acquis ont été éliminées, si l'enquête familiale est informative. C'est une maladie hémorragique grave (transmission liée au sexe).

La sévérité de la maladie est directement liée au taux de facteur :

- < 0,01 UI/mL : hémophilie B sévère ;
- de 0,01 à 0,05 UI/mL : hémophilie B modérée ;
- de 0,05 à 0,25 UI/mL : hémophilie B mineure ;
- de 0,25 à 0,50 UI/mL : taux limite.

Un taux < 0,25 UI/mL représente un risque hémorragique.

Le taux hémostatique est à 0,40 UI/mL.(271) (281)

J – Dosage de l'activité coagulante du facteur XI (facteur Rosenthal) :

1 – Généralités :

Le facteur XI (F XI) est une sérine protéase qui circule dans le plasma sous forme d'homodimère. Son activation a lieu préférentiellement à la surface des plaquettes activées, sous l'action des premières traces de thrombine. Le F XIa participe alors à la génération ultérieure de thrombine, notamment à faible concentration de facteur tissulaire. Le déficit en F XI s'accompagne in vitro d'un retard à la formation du caillot et d'une diminution par trois de la vitesse maximale de génération de thrombine. La compensation en F XI exogène de ces déficits permet de corriger ces paramètres cinétiques. In vivo, elle permet la correction de la symptomatologie hémorragique et s'accompagne d'une activation de la coagulation, comme en témoignent les marqueurs d'activation.

Demi-vie : 40-80 heures. Le gène du facteur XI est localisé sur le chromosome 4.(282)

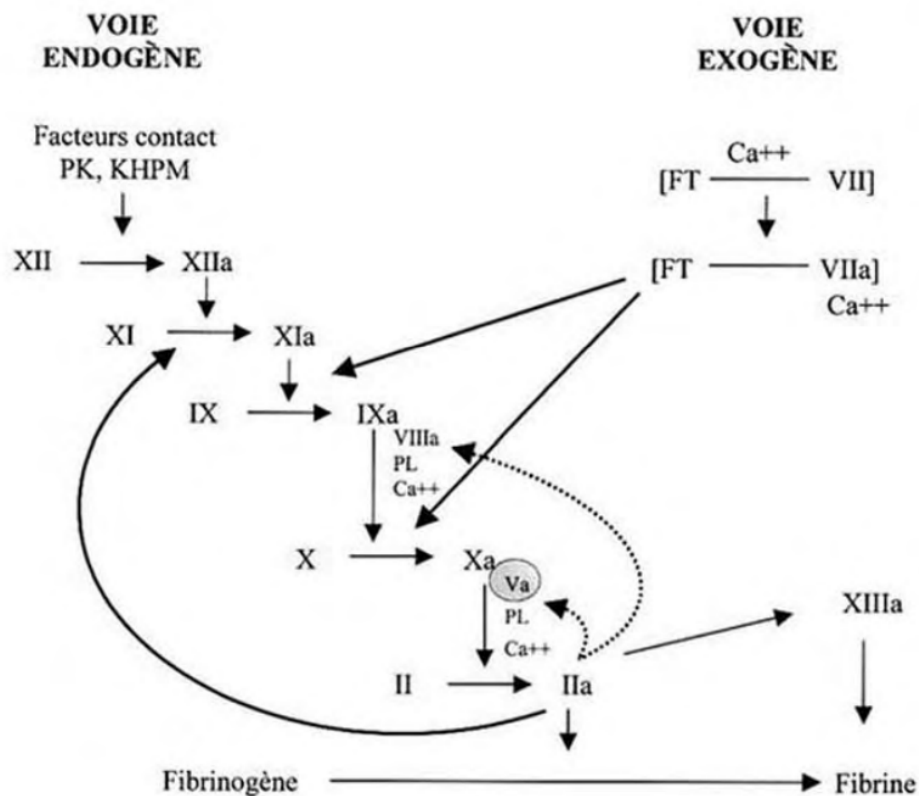


Fig 48 : Place du facteur XI. FT : facteur tissulaire ; PK : prékallitréine; KHPM : kininogène de haut poids moléculaire; PL : phospholipides ; --- : rétroactivation par la thrombine.(288)

2 – Indications :

En cas d'allongement isolé du temps de céphaline avec activateur (TCA) et/ou de survenue de manifestations hémorragiques non expliquées, car, selon les réactifs utilisés, des déficits modérés en FXI peuvent ne pas allonger significativement le TCA.(283)

3 – Matériels :

1. Tube de prélèvement : Le sang est généralement prélevé dans un tube de citrate de sodium, l'anticoagulant de référence est une solution de citrate trisodique 0,105 ou 0,109 M utilisée dans un rapport anticoagulant/sang total : 1 pour 9, volume à volume.

Ces conditions sont valables pour un hémocrite compris entre 0,30 et 0,55 L/L, sinon le volume d'anticoagulant doit être adapté à l'hémocrite selon la formule :

Volume d' anticoagulant en mL =

Volume sang (mL) × (100 – hémocrite %) / 595 – hémocrite %

Le mélange CTAD (citrate trisodique, théophylline, adénosine, dipyridamole), inhibiteur de l'activation plaquettaire, est utilisable pour tous les tests d'hémostase en dehors de l'étude des fonctions plaquettaires. Son utilisation est vivement recommandée lorsque les contraintes de délai ne peuvent être respectées, en particulier pour le suivi des traitements hépariniques. Il permet une meilleure conservation du prélèvement mais induit un surcoût.

2. Réactifs:

- Réactif TCA composé de céphaline, qui est un réactif phospholipidique apporté à une concentration optimale, et d'un activateur du système contact de la coagulation (sous forme de microparticules solides ou sous forme soluble).
- Plasma déficient en facteur XI : le taux de facteur XI doit être inférieur à 0,01 UI/mL. Condition à vérifier à chaque lot en considérant le réactif comme un plasma de patient. - Chlorure de calcium 0,025 M.
- Tampon Owren Koller pH 7,35.

3. Chronomètre ou coagulomètre : Un chronomètre ou un coagulomètre est utilisé pour mesurer le temps de coagulation ou d'autres paramètres associés à l'activité du facteur XI.

4. Pipettes : Des pipettes sont utilisées pour prélever des quantités précises de réactifs et de plasma sanguin nécessaires pour réaliser le test.

5. Équipement de laboratoire standard : Vous aurez également besoin d'équipement de laboratoire standard, tels que des pipettes, des tubes à essai, des agitateurs, etc., pour préparer et manipuler les échantillons et les réactifs.(284) (285)

4 – Mode opératoire : (Technique fonctionnelle chronométrique)

• Calibration :

Les calibrants disponibles sur le marché sont étalonnés par rapport au standard international du NIBSC (National Institute for Biological Standards and Controls).

Gamme d'étalonnage adaptée, encadrant les valeurs obtenues pour le patient. Selon les automates, prévoir une courbe haute (0,15 à 1,50 UI/mL) et une courbe basse (0 à 0,15 UI/mL).

En règle générale, la dilution au 1/10 = 1 UI/mL.

Il existe une relation linéaire en coordonnées bilogarithmiques entre le temps mesuré et les taux de facteur.

La précision du dosage est fonction de la pente de la droite d'étalonnage, qui dépend des réactifs et de l'appareillage utilisé.

• Contrôles :

Dans chaque série, passer un contrôle normal (0,80 à 1,20 UI/mL) et un contrôle pathologique (0,30 à 0,50 UI/mL) dans les mêmes conditions qu'un plasma de patient.

* Dilutions du plasma du patient :

Les dilutions de plasma ne sont pas stables. Il faut les faire extemporanément et les conserver à +4 °C (glace pilée).

Prévoir deux dilutions par patient (1/10 et 1/20). Possibilité de diluer au 1/40 si le taux est > 1,50 UI/mL. La droite dose-réponse du patient doit être parallèle à la droite d'étalonnage.

La dilution du plasma du patient rend négligeable l'effet des anticoagulants thérapeutiques comme l'héparine. Les lupus anticoagulants (LA) puissants peuvent affecter le TCA : utiliser un réactif peu sensible ou diluer fortement le plasma du patient au 1/40e, 1/80e voire au 1/160e. On observe la correction du déficit apparent avec les dilutions croissantes.

• **Dosage :**

- Même volume de dilution appropriée du plasma du patient, de céphaline plus activateur et du plasma déficient en facteur XI.
- Incubation 2 minutes à 37 °C.
- Ajout de calcium et mesure du temps de coagulation. Les résultats sont lus sur les courbes adaptées : les résultats des dilutions au 1/10 sont lus directement, les résultats des dilutions au 1/20 sont multipliés par 2, ceux des dilutions au 1/40 sont multipliés par 4.(286)

5 - Résultats :

5.1 - Valeurs normales :

Ils sont exprimés en pourcentage de la normale ou en UI/mL : 100 % = 1 UI/mL.

- À partir de l'âge de 12 mois et adultes : 0,70 à 1,30 UI/mL (soit 70 %-130 %).
- À la naissance : 0,10 à 0,70 UI/mL.
- Grossesse : inchangé ou diminution de 10 à 30 %.

5.2 Interprétation : Valeurs anormales

• **Déficits acquis :**

Autoanticorps contre le facteur XI.

• **Déficits constitutionnels :**

- ⇒ Le diagnostic de déficit constitutionnel est posé si le déficit persiste sur deux prélèvements espacés, si les causes de déficits acquis ont été éliminées, si l'enquête familiale est informative.
- ⇒ Décrit en 1958 par Rosenthal, il est très fréquent dans la population juive Ashkenaze, mais

rare dans le reste des populations. Selon le taux de déficit, on distingue :

- < 0,01 UI/mL : déficit majeur
- de 0,01 à 0,20 UI/mL : déficit mineur
- de 0,20 à 0,40 UI/mL : déficit modéré
- de 0,40 à 0,70 UI/mL : taux limite.
- Il n'existe pas d'élément prédictif du risque hémorragique.

⇒ Un taux < 0,10 UI/mL peut présenter un risque hémorragique.

⇒ Le syndrome hémorragique répond bien au traitement antifibrinolytique.

⇒ Le taux hémostatique est à 0,30 UI/mL.(287)

K - Dosage de l'activité coagulante du facteur XII (facteur Hageman)

1 - Généralités :

Le FXII, de synthèse hépatique, circule dans le plasma sous forme d'un zymogène de sérine protéase à chaîne unique de 80 kDa, à une concentration plasmatique moyenne est de 40 µg/ml. Sa demi-vie varie de 50 à 70 heures.(288)

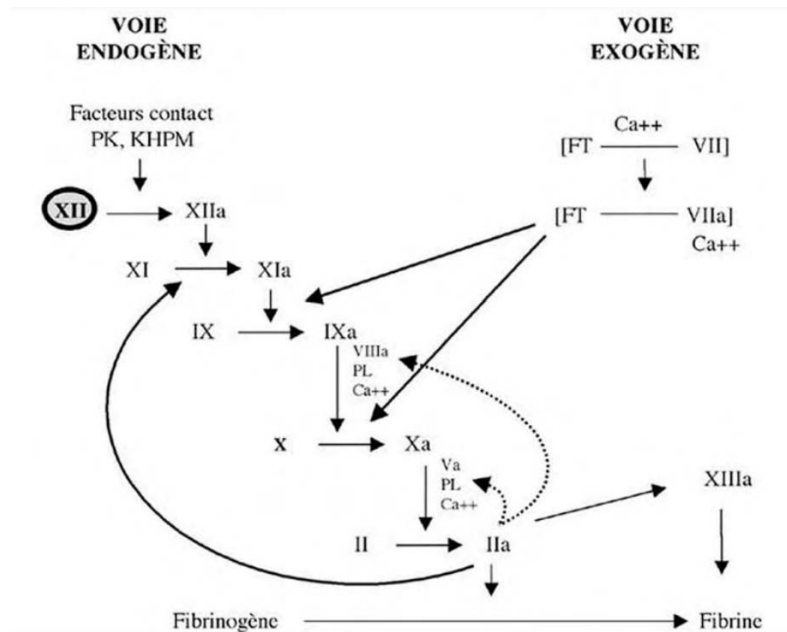


Fig 49: Place du facteur XII. FT : facteur tissulaire ; PK : prékallitréine ; KHPM : kininogène de haut poids moléculaire ; PL : phospholipides ; ----- : rétroactivation par la thrombine. (294)

2 – Indications :

L'objectif de la mesure de l'activité du FXII est d'exclure ou de confirmer un déficit en FXII.

Ce test peut être indiqué en cas d'allongement isolé significatif du temps de céphaline avec activateur (TCA). Selon les réactifs utilisés, des déficits modérés en FXII peuvent ne pas allonger significativement le TCA.(289)

3 – Matériels :

1. Tube de prélèvement : Le sang est généralement prélevé dans un tube de citrate de sodium, l'anticoagulant de référence est une solution de citrate trisodique 0,105 ou 0,109 M utilisée dans un rapport anticoagulant/sang total : 1 pour 9, volume à volume.

Ces conditions sont valables pour un hémocrite compris entre 0,30 et 0,55 L/L, sinon le volume d'anticoagulant doit être adapté à l'hémocrite selon la formule :

Volume d' anticoagulant en mL =

Volume sang (mL) × (100 – hémocrite %) / 595 – hémocrite %

Le mélange CTAD (citrate trisodique, théophylline, adénosine, dipyridamole), inhibiteur de l'activation plaquettaire, est utilisable pour tous les tests d'hémostase en dehors de l'étude des fonctions plaquettaires. Son utilisation est vivement recommandée lorsque les contraintes de délai ne peuvent être respectées, en particulier pour le suivi des traitements hépariniques. Il permet une meilleure conservation du prélèvement mais induit un surcoût.

2. Réactifs:

– Réactif TCA composé de céphaline, qui est un réactif phospholipidique apporté à une concentration optimale, et d'un activateur du système contact de la coagulation (sous forme de microparticules solides ou sous forme soluble).

– Plasma déficient en facteur XII : le taux de facteur XII doit être inférieur à 0,01 UI/mL.

Condition à vérifier à chaque lot en considérant le réactif comme un plasma de patient.

– Chlorure de calcium 0,025 M.

- Tampon Owren Koller pH 7,35.

3. Chronomètre ou coagulomètre : Un chronomètre ou un coagulomètre est utilisé pour mesurer le temps de coagulation ou d'autres paramètres associés à l'activité du facteur XII.

4. Pipettes : Des pipettes sont utilisées pour prélever des quantités précises de réactifs et de plasma sanguin nécessaires pour réaliser le test.

5. Équipement de laboratoire standard : Vous aurez également besoin d'équipement de laboratoire standard, tels que des pipettes, des tubes à essai, des agitateurs, etc., pour préparer et manipuler les échantillons et les réactifs.(290)

4 – Mode opératoire : (Technique fonctionnelle chronométrique)

• Calibration :

Les calibrants disponibles sur le marché sont étalonnés par rapport au standard international du NIBSC (National Institute for Biological Standards and Controls).

Gamme d'étalonnage adaptée, encadrant les valeurs obtenues pour le patient. Selon les automates, prévoir une courbe haut (0,15 à 1,50 UI/mL) et une courbe basse (0 à 0,15 UI/mL).

En règle générale, la dilution au 1/10 = 1 UI/mL. Il existe une relation linéaire en coordonnées bilogarithmiques entre le temps mesuré et les taux de facteur.

La précision du dosage est fonction de la pente de la droite d'étalonnage, qui dépend des réactifs et de l'appareillage utilisé.

• Contrôles :

Dans chaque série, passer un contrôle normal (0,80 à 1,20 UI/mL) et un contrôle pathologique (0,30 à 0,50 UI/mL) dans les mêmes conditions qu'un plasma de patient.

Dilutions du plasma du patient :

Les dilutions de plasma ne sont pas stables. Il faut les faire extemporanément et les conserver à +4 °C (glace pilée). Prévoir deux dilutions par patient (1/10 et 1/20). Possibilité de diluer au 1/40 si le taux est supérieur à 1,50 UI/mL.

La droite dose-réponse du patient doit être parallèle à la droite d'étalonnage. La dilution du plasma du patient rend négligeable l'effet des anticoagulants thérapeutiques comme l'héparine. Les lupus anticoagulants (LA) puissants peuvent affecter la mesure du facteur en système TCA : utiliser un réactif peu sensible ou diluer fortement le plasma du patient au 1/40e, 1/80e voire au 1/160e. On observe la correction du déficit apparent avec les dilutions croissantes.

• **Dosage :**

- Même volume de dilution appropriée du plasma du patient, de céphaline plus activateur et du plasma déficient en facteur XII.
- Incubation 2 minutes à 37 °C.
- Ajout de calcium et mesure du temps de coagulation. Les résultats sont lus sur les courbes adaptées : les résultats des dilutions au 1/10 sont lus directement, les résultats des dilutions au 1/20 sont multipliés par 2, ceux des dilutions au 1/40 sont multipliés par 4. Attention, une amorce de coagulation donne des temps plus courts par activation des facteurs, et une coagulation avérée donne des temps plus longs par consommation des facteurs.(291)

5 - Résultats :

5.1 Valeurs normales :

Les résultats ils sont exprimés en pourcentage de la normale ou en UI/ml : 100 % = 1 UI/mL.

- À partir de l'âge de 12 mois et adultes : 0,55 à 1,60 UI/mL (soit 55 %-160 %).
- À la naissance : 0,10 à 0,90 UI/mL.
- Grossesse : inchangé.

5.2 Interprétation : Valeurs anormales

• Déficits acquis :

Autoanticorps contre le facteur XII.

• Déficits constitutionnels :

- Le diagnostic de déficit constitutionnel est posé si le déficit persiste sur deux prélèvements espacés, si les causes de déficits acquis ont été éliminées, si l'enquête familiale est informative.

Il est très rare, de prévalence 1 / 500 000. Suivant le taux de facteur, on distingue :

- < 0,01 UI/mL : déficit majeur ;
- de 0,01 à 0,20 UI/mL : déficit mineur ;
- de 0,20 à 0,40 UI/mL : déficit modéré ;
- de 0,40 à 0,70 UI/mL : taux limite.
- Absence de risque hémorragique même en cas de déficit majeur.(292) (282)



*GROUPES
SANGUINS
ERYTHROCYTAIRES*



A – Le groupage sanguin ABO–RH1 (RhD)

1 – Généralités :

• LE SYSTEME ABO :

Il est le plus anciennement connu des systèmes de groupes sanguins. Il se caractérise par:

- la présence d'antigènes A et/ou B à la surface des hématies,
- Ces composés sont constitués de glucides et présentent deux types de sucres potentiels à la surface des érythrocytes : soit du galactose (Ag B), soit du N–Acétyl–Galactosamine (Ag A). Ces sucres sont attachés à une substance fondamentale appelée Substance H, qui est elle-même un glucide.
- mais aussi la présence systématique d'anticorps (Ac) naturels dans le plasma, dirigés contre le (ou les) antigènes absents du globule rouge.

La présence ou l'absence des antigènes (Ag) A ou B à la surface des hématies est sous la dépendance de 3 gènes :

- le gène A, qui induit la synthèse de l'Ag A,
- le gène B, qui induit celle de l'Ag B,
- le gène O, qui n'induit aucune synthèse.

La transmission héréditaire de ces gènes obéit aux lois de Mendel : A et B sont des allèles et s'excluent lors de la méiose. Le groupe sanguin de chaque individu dépend donc de la présence de 2 de ces 3 allèles A, B et O. Les gènes A et B sont codominants ; ils s'expriment au niveau du phénotype ; le gène O est récessif par rapport aux gènes A et B. Le système ABO offre ainsi 4 possibilités d'expression ou phénotypes : A, B, AB, O.

Phénotype	Génotype
A	A/A ou A/O
B	B/B/ ou B/O
AB	A/B
O	O/O

Fig 50 : Phénotype et génotype du système ABO (297)

Ces phénotypes sont définis à la fois par l'Ag globulaire et par l'Ac sérique. Leur répartition varie selon les populations.

Groupe A	Ag globulaire A	Ac anti B
Groupe B	Ag globulaire B	Ac anti A
Groupe AB	Ag A et B	Pas d'Ac
Groupe O	Pas d'Ag A ni B	Ac anti A et anti B

Fig 51 : Antigènes – Anticorps du système ABO (297)

Le phénotype A se subdivise en phénotypes A1 et A2 (les plus fréquents, mais aussi A3, Aend,...) qui se différencient quantitativement (par leur nombre de sites A) et qualitativement (par l'activité de leurs enzymes). La distinction entre A1 et A2 permet d'aboutir aux 6 phénotypes courants : A1, A2, A1B, A2B, B, et O.

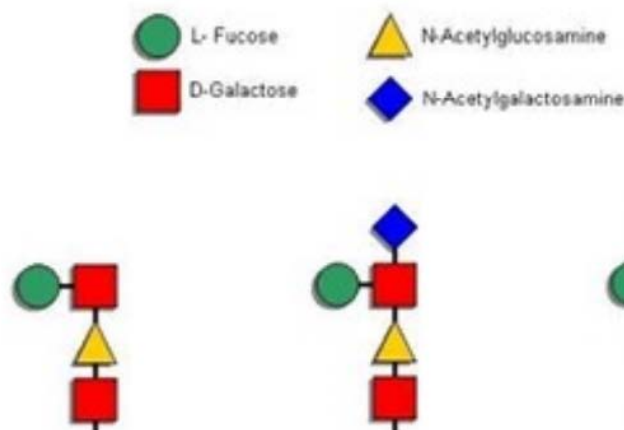


Fig 52 : Présentation schématique des antigènes du système ABO (293)

• LE SYSTEME RHESUS :

La définition du groupage ABO est indissociable du phénotype Rh D du système rhésus et sa réalisation indissociable du phénotype RH/KELL. Le système Rhésus comporte de nombreux Ag distincts dont 5 sont importants en pratique clinique :

- l'Ag D (Rh standard ou RH1 de la nomenclature internationale); le plus immunogène
- Les Ag C (RH2) et c (RH4)
- Les Ag E (RH3) et e (RH5)

Ces antigènes sont uniquement présents sur les hématies, définissant ainsi un système de

groupe sanguin. Il est possible de distinguer 18 phénotypes différents. Par définition, les personnes possédant l'Ag D sont dits «Rhésus +» et celles qui ne le possèdent pas : «Rhésus -». L'Ag D est produit par le gène D. Il n'existe pas d'Ag d ce qui n'exclut pas l'existence du gène d. Dans notre population, la fréquence des sujets Rh + est d'environ 85 %.(294)

2 - Indications :

- En contexte transfusionnel, la disponibilité d'un groupe ABO-RH1 valide du receveur est obligatoire. Elle permet d'assurer les règles de compatibilité lors de la sélection des concentrés de globules rouges et de plaquettes ainsi que du plasma. Il est toujours associé au phénotype RH (RH2, RH3, RH4, RH5) et KEL1.
- En contexte obstétrical, la connaissance du groupe RH1 (RhD) de la mère permet, chez les femmes RhD négatif (RH:-1) de mettre en oeuvre un calendrier de suivi adéquat de la grossesse et, lorsque le RH1 (RhD) de l'enfant (foetus et nouveau-né) est connu, d'indiquer une immunoprophylaxie anti-D ou de diagnostiquer une maladie hémolytique foetale et/ou néonatale par anti-D.

La détermination du groupe RH1 (RhD) du foetus se fait par génotypage foetal à partir de l'ADN circulant dans le plasma maternel.

La connaissance du groupe ABO de la mère et du nouveau-né permet de diagnostiquer une maladie hémolytique néo natale par incompatibilité foetomaternelle ABO.

- En contexte de transplantation d'organe, la connaissance du groupe ABO-RH1 du receveur et du greffon permet de sélectionner le greffon adéquat et, dans les transplantations rénales incompatibles majeures, de poser l'indication d'un titrage des anticorps ABO afin d'envisager une éventuelle stratégie de réduction de ces anticorps.

- En contexte de greffe de cellules souches hématopoïétiques, la connaissance du groupe ABO RH1 du receveur et du greffon permet d'évaluer les risques hémolytiques en cas d'incompatibilité ABO majeure ou mineure.
- Enfin, en cas de recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) positive, le groupe ABO–RH1 contribue à la validation d'un anti–RH1.(295)

3 – Matériels :

1. Tubes à essai : Utilisés pour collecter et manipuler les échantillons de sang on utilise tube EDTA.
2. Pipettes : Utilisées pour mesurer et transférer de petits volumes de sang et de réactifs.
3. Réactifs de groupage sanguin : Comprendra des anticorps spécifiques anti–A, anti–B et anti–D (pour le facteur Rh). Ces réactifs permettent de détecter la présence ou l'absence des antigènes A, B et D sur les globules rouges.
4. Les hématies–test : hématies humaines préparées à partir d'un sang prélevé sur anticoagulant.
5. Dispositifs de mélange : Des dispositifs tels que des agitateurs mécaniques ou des vortex peuvent être utilisés pour mélanger les échantillons de sang avec les réactifs.
6. Cartes de groupage sanguin : Ce sont des cartes spéciales qui contiennent des puits ou des zones de test où les échantillons de sang et les réactifs sont mélangés pour observer les réactions.
7. Centrifugeuse : Utilisée pour séparer le sérum ou le plasma des globules rouges, si nécessaire, pour des tests supplémentaires.

8. Lampe à lecture : Dans certains cas, une lampe spéciale, telle qu'une lampe de lecture directe, peut être utilisée pour faciliter la visualisation des réactions et des agglutinations.



Fig 53 : sérums-test anti-A, anti-B et anti-AB et anti-D



Fig 54 : Hématies test

4 – Mode opératoire :

Les modalités techniques utilisées sont : la détermination sur plaque, en tube, en gel ou en microplaques.

Elle repose sur 2 réalisations exécutées par 2 techniciens différents. La saisie manuelle des résultats doit passer par une double saisie réalisée par 2 personnes différentes.

•Groupage ABO :

Peut être réalisé de façon manuelle, semi-automatique ou automatique. Il se compose de 2 épreuves complémentaires :

- l'épreuve de BETH-VINCENT ou épreuve globulaire qui consiste à mettre en évidence à la surface des hématies la présence des antigènes A et ou B (ou leur absence) à l'aide de 3 sérums tests monoclonaux anti A, anti B, et anti AB.

- l'épreuve de SIMONIN ou épreuve sérique qui consiste à rechercher la présence ou l'absence des Ac anti A et/ou anti B dans le sérum à l'aide d'hématies tests A1 et B.

1) Technique sur plaque d'opaline et/ou plaque alvéolée à usage unique :

a) Préparations des échantillons de sang :

- centrifuger le sang et séparer les hématies et le plasma
- diluer les hématies au 1/10ième en eau physiologique

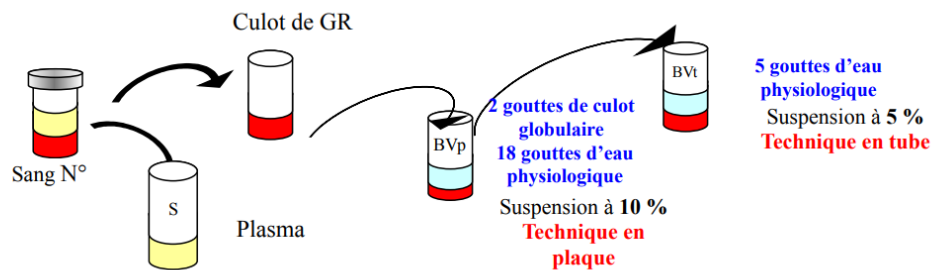


Fig 55 : Préparation du sang à grouper (296)

b) Réalisation de témoins :

Le témoin auto est réalisé systématiquement, les témoins AB et allo sont surtout réalisés uniquement en cas de discordance entre les épreuves globulaires et sériques.

Mais par mesure de sécurité, les 3 témoins seront réalisés systématiquement au cours des groupages

ABO.

→Témoin « auto » = une goutte de sérum à tester et une goutte de GR à tester

→Témoin « AB » = une goutte d'un sérum de groupe AB (appelé sérum AB, à ne pas confondre avec le sérum anti-A + anti-B) et une goutte de GR à tester.

→Témoin « allo » = 2 gouttes de sérum à tester et une goutte de GR test.

c) Épreuve globulaire directe de Beth Vincent :

- 1 goutte de sérum test anti-A
- 1 goutte de sérum test anti-B
- 1 goutte de sérum test anti-A + anti-B

Ajouter à coté de chaque goutte de sérum test, 1 goutte de culot d'hématies diluées.

d) Épreuve globulaire de Simonin :

- Déposer 1 goutte de suspension globulaire à A1, A2, B.
- Déposer 2 gouttes du sérum à tester.

⇒ Animer la plaque d'un mouvement de va et vient afin de faciliter l'agglutination. Laisser reposer 30 secondes. Lire en imprimant un mouvement de « roulis » à la plaque et compléter par une seconde lecture au bout de 3 minutes.

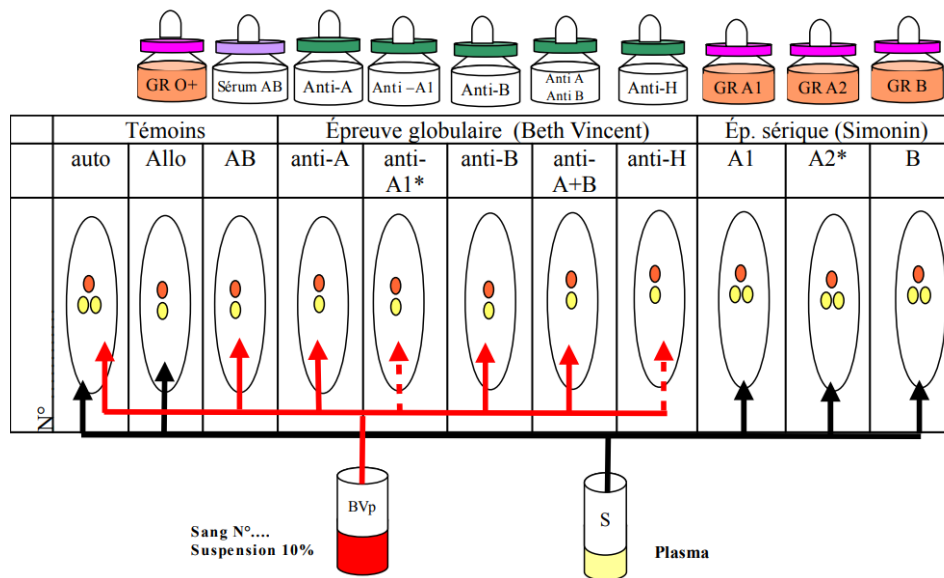


Fig 56 : Technique sur plaque alvéolée pour groupage ABO, * épreuve complémentaire (297)

e) Lecture :

D'une manière générale, les agglutinats de l'épreuve sérique apparaissent plus lentement que ceux de

L'épreuve globulaire. Noter l'absence ou la présence d'agglutinats et leur intensité.

- « +++ » 1 à 3 énormes agglutinats sur fond clair.
- « ++ » jusqu'à 10 agglutinats sur fond clair.
- « + » très nombreux agglutinats sur fond clair.
- « (+) » innombrables agglutinats à la limite du visible sur fond clair.
- « - » absence d'agglutinats-suspension rosée homogène.

Signaler aussi la présence éventuelle d'une image de double population (notée ++/--) ou d'une hémolyse partielle.

2) Technique en tube :

a) Préparations des échantillons de sang :

- A partir du sang centrifugé, diluer les hématies au 1/5ième en eau physiologique. (Fig 55)

b) Réalisation des témoins :

Le témoin auto est réalisé systématiquement, les témoins AB et allo sont surtout réalisés uniquement en cas de discordance entre les épreuves globulaires et sériques.

Mais par mesure de sécurité, les 3 témoins seront réalisés systématiquement au cours des groupages

ABO.

→Témoin « auto » = une goutte de sérum à tester et une goutte de GR à tester

→Témoin « AB » = une goutte d'un sérum de groupe AB (appelé sérum AB, à ne pas confondre avec le sérum anti-A + anti-B) et une goutte de GR à tester.

→Témoin « allo » = 2 gouttes de sérum à tester et une goutte de GR test.

c) La réalisation de l'épreuve :

Les réactions sont effectuées dans 6 ou 8 tubes de la même façon que pour la technique en plaque, en utilisant les mêmes volumes de réactifs.

Boucher les tubes.

Agiter légèrement les tubes.

Centrifuger 1 minute à 500 g (environ 1000 rpm).

Lire par remise en suspension des culots.

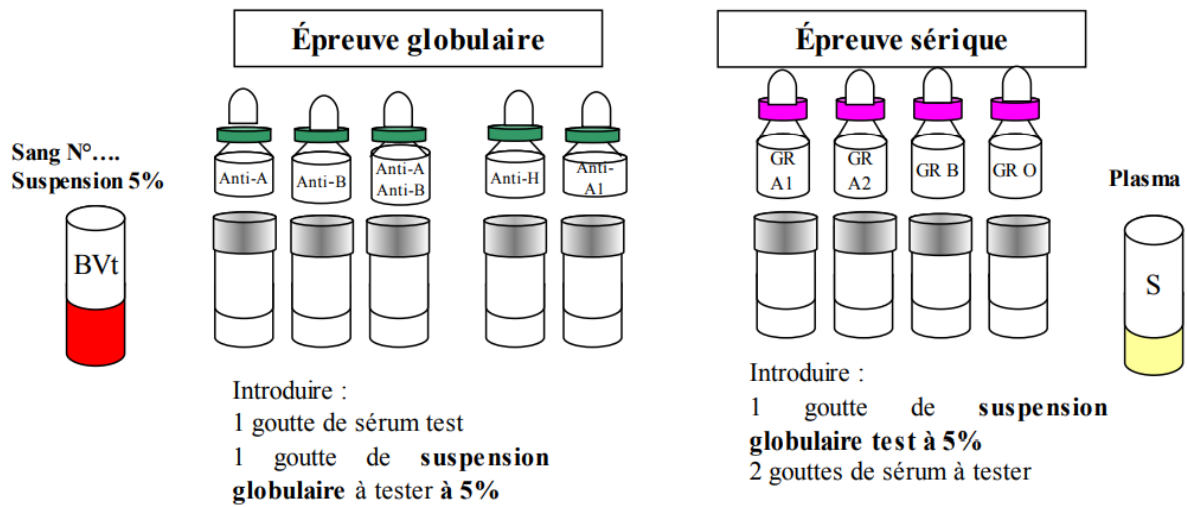


Fig 57 : Technique en tube pour groupage ABO (301)

d) Lecture :

- « +++ » : le culot se décolle et se dissocie en 3 amas maximum (agglutinat volumineux non dissocié sur fond clair).
- « ++ » : le culot se dissocie en de nombreux amas volumineux (agglutinat volumineux sur fond clair).
- « + » : le culot se dissocie en de nombreux petits amas (agglutinat fin sur fond rosé).
- « - » : suspension homogène (« fumée de cigarette »).

3) Technique en microplaque :

a) Préparations des échantillons de sang :

- Le test se fera à partir des hématies diluées au 1/10^{ième} ou au 1/5^{ième} en eau physiologique (fig 55)

b) Réalisation des témoins :

Sur une microplaque à fond en V: déposer dans l'ordre dans des puits différents

- témoin auto: 50µL de plasma à tester + 50µL d'hématies à tester
- témoin AB : 50µL de sérum de groupe AB + 50µL d'hématies à tester

c) Épreuve globulaire directe de Beth Vincent :

- 50µL de sérum test anti-A
- 50µL de sérum test anti-B
- 50µL de sérum test anti-A + anti-B

Ajouter à chaque puit de sérum test, 50µL de culot d'hématies diluées.

Centrifuger 1 minute à 1000 tours par minute.

Observer s'il y a ou non agglutination.

• RH 1 (Ag D)

Recherche des Ag D éventuellement présents à la surface des hématies par :

- agglutination active indirecte (artificielle) : à l'aide d'un sérum test contenant des Ac antiD (IgG) enrichi en albumine à 37°C.
- Par agglutination active directe : à l'aide d'un sérum test contenant des Ac anti-D (IgM) en milieu salin.

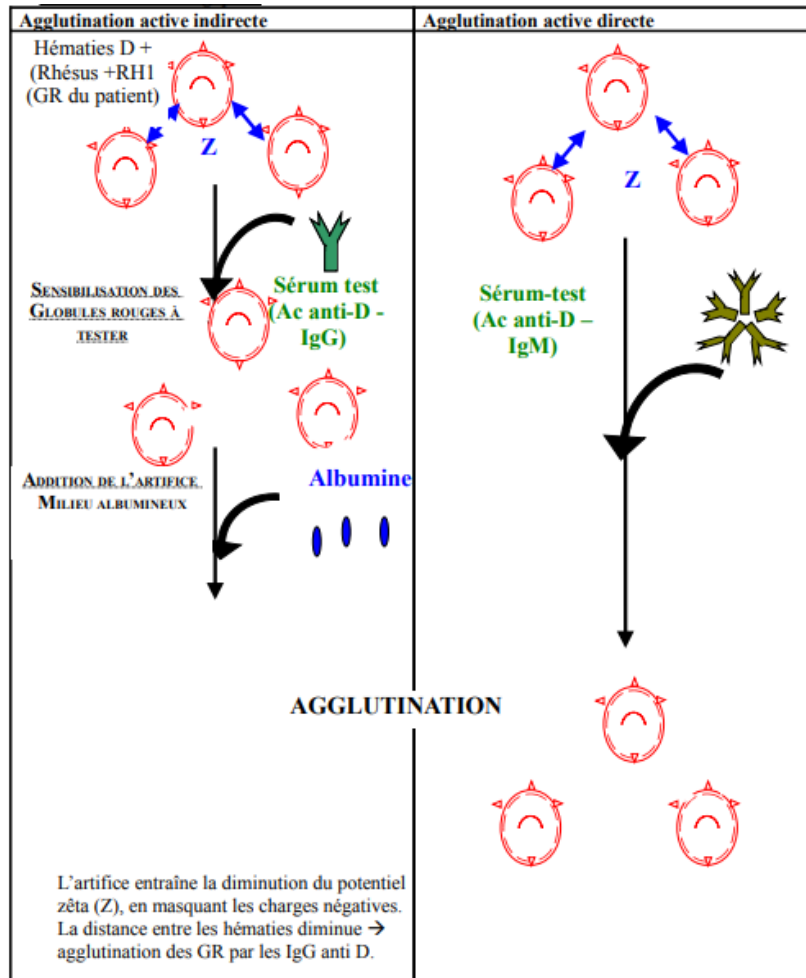


Fig 58 : Schéma explicatif d'agglutination active indirecte et direct lors du phénotypage du Rhésus standard.(298)

- Protocole :

a) Préparations des échantillons de sang :

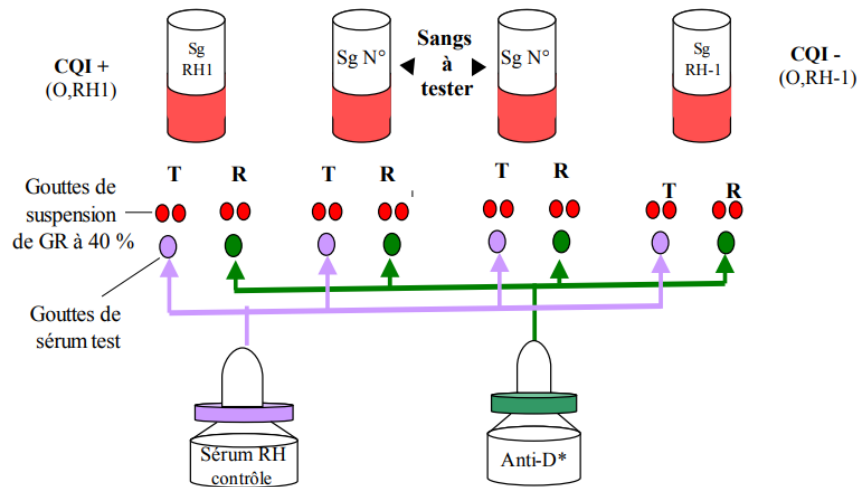
Dans un tube soigneusement référencé, verser 6 gouttes de plasma et 4 gouttes de culot globulaire à tester.



Fig 59 : Préparation du sang à tester pour groupage rhésus standard (302)

b) Technique : agglutination active directe :

Déposer rapidement sur la plaque alvéolée, comme indiqué sur le schéma ci-dessous :



* En laboratoire, deux sérums tests sont parfois utilisés : sérum-test anti-D_(VI+) et anti-D_(VI-).

Fig 60: Réalisation de la technique d'agglutination active directe pour groupage Rhésus standard (302)

Mélanger et essuyer l'agitateur entre chaque réaction.

Incliner la boîte chauffante d'un angle juste suffisant pour permettre l'homogénéisation des gouttes.

Poursuivre l'agitation pendant 3 minutes

Effectuer la lecture des agglutinats

5 - Résultats :

5- 1 Interprétation du résultat du groupage ABO :

La vérification analytique du groupage ABO - RH1 repose sur :

- L'absence d'ambiguïté réactionnelle avec chaque réactif.
- L'absence de double population.
- L'absence de discordance entre 2 réalisations.
- L'absence de discordance avec l'antériorité.
- De la négativité du témoin réactif réalisé dans le cadre de la détermination du phénotype RH1
- Un profil réactionnel cohérent par rapport à la table d'interprétation des groupes.

Le groupe ABO sera conclu si les réactions obtenues correspondent à la grille d'interprétation suivante.

:

Groupe	Nomenclature internationale	Anti A	Anti B	Anti AB	HT A1	HT B
A	ABO :1,-2,3 ou ABO:1,3	+++	-	+++	-	+++
B	ABO :-1,2,3 ou ABO:2,3	-	+++	+++	+++	-
AB	ABO :1,2,3	+++	+++	+++	-	-
O	ABO :-1,-2,-3	-	-	-	+++	+++

fig 61 : Grille d'interprétation du Groupage érythrocytaire ABO

5 - 2 Interprétation des résultats du phénotypage Rh 1 (Ag D) :

Résultats des deux techniques concordants = Groupage RH correct

La présence d'agglutinat indique une réaction positive et signifie que le sujet est porteur de l'antigène D, il est dit sujet « RH1 positif ».

En revanche leur absence traduit une réaction négative qui doit être compléter obligatoirement par la recherche de l'antigène D faible chez les donneurs de sang, les femmes enceintes et les nouveau-nés de mère RH1 négatif. Seule l'absence du D faible, permet d'étiqueter ces catégories de RH1 négatif.(299)

B – Le phénotypage RH–KEL1 (Rh–K)

1 – Généralités :

Le système des groupes sanguins Kell est complexe et contient de nombreux antigènes hautement immunogènes. Ces antigènes sont les troisièmes plus puissants, après ceux des groupes sanguins ABO et Rh, à déclencher une réaction immunitaire.

L'antigène K est l'un des antigènes Kell les plus significatifs sur le plan clinique.

Le phénotype RH–KEL1 regroupe les antigènes C ou Rh2, E ou Rh3, c ou Rh4, e ou Rh5 et KEL1 ou K du système KELL. (300)

2 – Indications :

- En contexte transfusionnel :
 - Chez les patients ayant développé un ou des allo–anticorps antiérythrocytaires contre au moins l'un des antigènes suivants : RH2, RH3, RH4, RH5 et KEL1.
 - dans les situations suivantes, avec pour objectif de prévenir l'apparition d'allo–anticorps : femmes, de la naissance jusqu'à la fin de la période procréatrice ; patients atteints d'hémoglobinopathies ; patients atteints d'affections chroniques dont la survie prolongée est conditionnée par des transfusions itératives de CGR comme dans les myélodysplasies ; patients présentant un groupe sanguin rare.
- En contexte obstétrical, la réalisation du phénotype RH–KEL1 est obligatoire
- En cas de RAI (Recherche d'Anticorps Irréguliers) positif le phénotype RH–KEL1, est nécessaire et joue un rôle dans la confirmation des anticorps ciblant les différents antigènes qu'il regroupe.(301) (302) (303)

3 – Matériels :

- Échantillons de sang : Vous aurez besoin d'échantillons de sang prélevés dans un tube EDTA.
- Réactifs anti-sérums : Les réactifs anti-sérums spécifiques pour les groupes sanguins RH (anti-C, anti-E, anti-c, anti-e) et KEL (anti-K) sont nécessaires pour identifier les antigènes correspondants dans les échantillons de sang.
- Plaques de microtitration ou tubes de test : Vous utiliserez des plaques de microtitration ou des tubes de test pour effectuer les réactions entre les réactifs anti-sérums et les échantillons de sang.
- Centrifugeuse : Une centrifugeuse est utilisée pour séparer les cellules sanguines du plasma, ce qui est nécessaire pour les tests de groupage.
- Pipettes : Des pipettes de précision sont utilisées pour prélever et transférer de petites quantités de réactifs et d'échantillons de sang.
- Lampe à spectre visible : Une lampe à spectre visible est utilisée pour détecter les réactions entre les réactifs anti-sérums et les échantillons de sang. Certains réactifs anti-sérums peuvent provoquer des réactions visibles, telles que l'agglutination ou la formation de précipités.
- Matériel de sécurité : Comme vous travaillez avec du sang, il est important de porter des gants, des lunettes de protection et une blouse de laboratoire pour assurer votre sécurité et prévenir toute contamination croisée.

4 – Mode opératoire :

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

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



Fig 62 : résultats du test d'agglutination direct sur plaque (308)

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

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

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

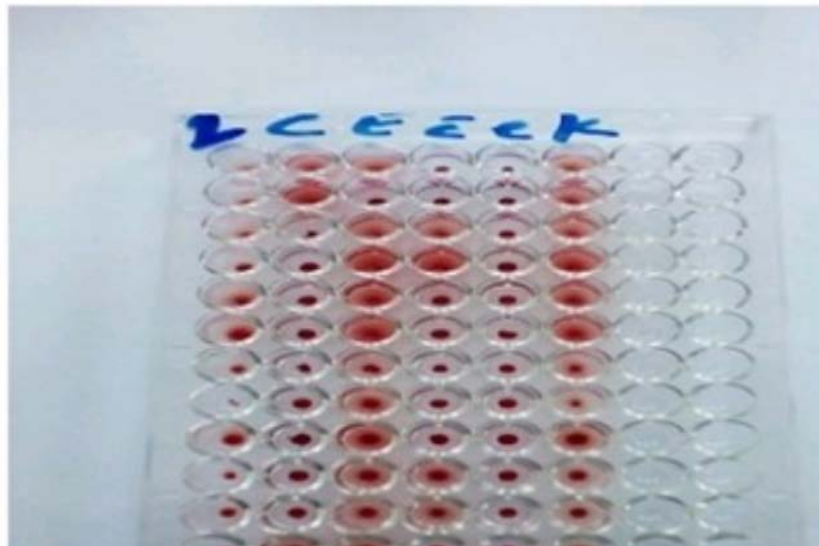


Fig 63 : Technique d'agglutination sur microplaques pour la recherche des antigènes (C, E, c, e et K) (308)

C) Technique sur carte-gel :

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

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

1. Préparer une suspension de globules rouges :

- En distribuant 1 ml de Scan Liss (LowIonicStrength Saline) dans un tube à usage unique, identifié
 - Rajouter 10 µl de culot globulaire puis on a mélangé.
2. Identifier la carte par le numéro d'échantillon correspondant, Remettre en suspension les globules rouges avant utilisation.
 3. Distribuer 50 µl de suspension globulaire dans la cupule de chaque microtube de la carte.
 4. Incuber le mélange pendant 15mn à 37°C Les Examens immunohématologiques au centre de transfusion sanguine
 5. Centrifuger 10 minutes dans une centrifugeuse.
 6. Lecture des réactions.(304)

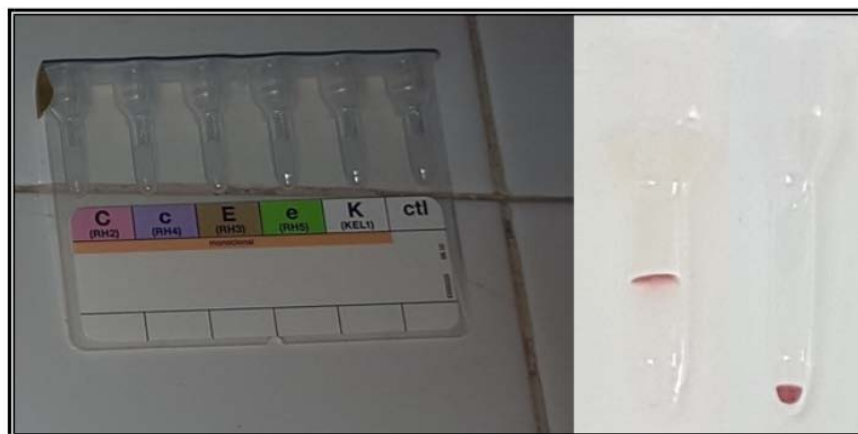


Figure 64 : Carte gel phénotype Rh + Kell avant emploi et exemple de réaction +(droite) et - (gauche) (308)

5. Résultats :

Lorsque de l'agglutination se produit, cela signifie que l'échantillon testé contient l'antigène correspondant.

En revanche, si aucune agglutination n'est observée en présence du réactif, cela indique un résultat négatif et que l'échantillon testé ne contient pas l'antigène correspondant.

C – Le phénotypage étendu :

1 – Généralités :

Le phénotypage étendu est défini comme la détermination des autres anti- gènes érythrocytaires tels que les antigènes des systèmes Duffy, Kidd et MNS. On parle donc de phénotype étendu lorsque l'analyse du phénotype érythrocytaire concerne un antigène de groupes sanguins en dehors des antigènes du système de groupe sanguin ABO, des cinq antigènes principaux du système RH (RH1, 2, 3, 4 et 5) et du premier antigène du système KEL, KEL1.(305)

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

- Rhésus : Ag Cw (RH8)
- Duffy : Ag Fya (FY1), Fyb (FY2)
- Kidd : Ag Jka (JK1) ,Jkb(JK2)
- MNS : Ag M (MNS1), N (MNS2), S(MNS3), s (MNS4)
- Lewis : Ag Lea (LE1), Leb (LE2)
- P : Ag P1(306)

2 – Indications :

* Validation de l'identification d'anticorps anti-érythrocytaire chez un donneur de sang ou un patient.

* En cas d'allo-immunisation érythrocytaire complexe.

* Chez certains transfusés de manière itérative en particulier dans le cadre de pathologies hématologiques fortement consommatrices de produits sanguins labiles et de longue durée (drépanocytaire essentiellement).

* chez le donneur du sang afin de pouvoir disposer de poches de concentrés de globules rouges compatibles lorsqu'un patient allo-immunisé doit être transfusé.(307) (308) (309) (293)

3 – Matériels :

1. Échantillons de sang : Des échantillons de sang du patient ou du donneur sont nécessaires pour effectuer le phénotypage étendu, sang récupéré sur tube EDTA.
2. Réactifs anti-sérums : Vous utiliserez différents types de réactifs anti-sérums spécifiques pour les différents groupes sanguins, tels que les groupes sanguins ABO, Rh (anti-D, anti-C, anti-E), Kell (anti-K), Duffy (anti-Fya, anti-Fyb), Kidd (anti-Jka, anti-Jkb), etc. Ces réactifs permettent de détecter les antigènes correspondants dans les échantillons de sang.
3. Plaques de microtitration ou tubes de test : Les réactions entre les réactifs anti-sérums et les échantillons de sang sont réalisées dans des plaques de microtitration ou des tubes de test.
4. Centrifugeuse : Une centrifugeuse est utilisée pour séparer les cellules sanguines du plasma, lorsque cela est nécessaire pour les tests de phénotypage.
5. Pipettes : Des pipettes de précision sont utilisées pour prélever et transférer de petites quantités de réactifs et d'échantillons de sang.
6. Lampe à spectre visible : Une lampe à spectre visible est utilisée pour détecter les réactions entre les réactifs anti-sérums et les échantillons de sang. Certaines réactions peuvent provoquer des changements de couleur ou d'autres caractéristiques visibles.
7. Matériel de sécurité : Comme vous travaillez avec du sang, il est important de porter des gants, des lunettes de protection et une blouse de laboratoire pour assurer votre sécurité et prévenir toute contamination croisée.

4 – Mode opératoire :

A) Pour le système Kell (antigène Kell2) :

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

Lorsqu'il est utilisé selon la technique recommandée, le réactif provoque l'agglutination (amas) des hématies portant l'antigène K (cellano). La non-agglutination démontre l'absence de l'antigène K (cellano).(310)

⇒ **Technique carte gel :**

a) 1^{er} temps : Préparation de l'échantillon de sang :

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

Ramener le diluant à température ambiante avant utilisation.

1. Distribuer 0.5 ml d'ID-Diluent 1 dans un tube propre.
2. Ajouter 50 µl de sang total ou 25 µl de culot d'hématies, mélanger doucement.
3. Incuber 10 minutes à température ambiante (18-25 °C).

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

b) 2^{ème} temps :

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

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

B) Pour les systèmes MNS; DUFFY ; KIDD ; LUTHERAN ; LEWIS :

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

Mis à part les antigènes les plus souvent étudiés que sont FY1 et 2, JK1 et 2, MNS3 et 4, la méthode de phénotypage est en général manuelle.(311)

Les méthodes manuelles sont classiques. Soit l'anticorps a pu faire objet d'une synthèse monoclonale, de classe IgM et, dans ces conditions, est utilisable en technique saline (par exemple, anti-JK1 /-JK2), soit on ne dispose que de réactifs polyclonaux marqués CE ou monoclonaux de type IgG (FY1, FY2) qui nécessitent la mise en œuvre d'un test indirect à l'antiglobuline (TIA). Les réactifs disponibles sur automate sont utilisables, soit en microplaque (immunoadhérence), soit en support filtration avec, dans ce cas, soit une distribution du réactif par l'automate, soit un réactif déjà incorporé dans le support réactionnel.(312)



*ANTICORPS ANTI-
ERYTHROCYTAIRES*



A) Recherche d'agglutinines irrégulières (RAI)

1 – Généralités :

La détection des anticorps anti-érythrocytaires est une analyse biologique cruciale utilisée pour prévenir et diagnostiquer les accidents immunohémolytiques transfusionnels, ainsi que pour diagnostiquer les incompatibilités foeto-maternelles.

En général, cette recherche est valable pendant 3 jours (72 heures) lorsqu'elle est utilisée pour la transfusion de concentrés de globules rouges (CGR).

Certains anticorps sont considérés comme "naturels" car ils peuvent être détectés chez des individus qui n'ont jamais été exposés à l'antigène correspondant.

Cependant, La plupart des anticorps détectés sont le résultat d'une réponse immunitaire suite à une grossesse ou à des transfusions sanguines.(313) (314)

2 – Indications :

* avant toute transfusion de produits sanguins labiles.

* pour le bilan post transfusionnel.

* lors du suivi de la grossesse et le diagnostic des incompatibilités foeto-maternelles .(315)

(316) (317)

3 – Matériels :

1. Échantillons de sérum : Le sérum du patient est prélevé pour effectuer l'analyse. Il est obtenu à partir d'un prélèvement sanguin et est séparé des autres composants sanguins par centrifugation.

2. Hématies de groupe O (généralement utilisées) : Les hématies de groupe O sont utilisées comme réactif pour détecter les agglutinines irrégulières présentes dans le sérum du patient. Les hématies de groupe O sont dépourvues des antigènes A et B, ce qui les rend compatibles avec la plupart des groupes sanguins.

3. Réactifs d'élu­tion : Les réactifs d'élu­tion sont utilisés pour libérer les agglutinines irrégulières qui se sont fixées aux hématies du patient. Ils permettent de récupérer les anticorps attachés aux hématies pour une meilleure identification.

4. Centrifugeuse : Une centrifugeuse est nécessaire pour séparer les différentes composantes du sang, permettant ainsi d'obtenir le sérum nécessaire à l'analyse.

5. Supports de réaction : Des plaques, des tubes ou des cartes de test spécialement conçus sont utilisés comme supports de réaction pour réaliser les tests d'agglutination.

6. Équipement de laboratoire standard : Cela peut inclure des pipettes, des micropipettes, des tubes à essai, des agitateurs, des réfrigérateurs, des incubateurs et d'autres équipements couramment utilisés en laboratoire.

4. Mode opératoire :

- L'objectif de la recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) est de détecter et d'identifier les anticorps anti-érythrocytaires en exposant le sérum (ou le plasma à étudier) à une série d'hématies-tests O phénotypées dans la plupart des systèmes de groupes sanguins.

La présence d'anticorps est généralement indiquée par une réaction d'agglutination.

La recherche des agglutinines irrégulières comporte deux étapes : une 1ère étape de dépistage et une deuxième étape d'identification.

- On utilise la technique de gel-filtration ou immunoadhérence :

1) Panel de dépistage :

– Un panel de dépistage est utilisé. Ce panel est constitué généralement 3 lots d'hématies, l'ensemble de ces lots d'hématies devant posséder l'ensemble des Ag spécifiques des Ac irréguliers recherchés.

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

Test de Coombs indirect

Éventuellement test à la papaïne* (non obligatoire).

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

Fig 65 : Panel de dépistage à l'aide du test de coombs indirect et test à la papaïne(318)

2) Panel d'identification :

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

Test de Coombs indirect

Éventuellement test à la papaïne (non obligatoire).

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

fig 66 : Panel d'identification utilisant le test de coombs indirect et test à la papaïne(319)

5. Résultats :

1) Pour le dépistage des agglutinines irrégulières :

- Si le dépistage initial est négatif, cela indique que la recherche d'agglutinines irrégulières est également négative. En revanche, si le dépistage est positif, une étape d'identification devient nécessaire.
- Des résultats négatifs (absence d'agglutination) lors des tests de Coombs indirects (et de papaïne) avec les trois lots d'hématies indiquent l'absence d'agglutinine irrégulière (AI).
- Des résultats positifs (présence d'agglutination) lors des tests de Coombs indirects (et de papaïne) avec au moins un lot d'hématies indiqueraient la présence d'agglutinines irrégulières qui devront être identifiées et titrées.

2) L'analyse du panel d'identification :

- permet d'identifier l'agglutinine irrégulière probable ou les agglutinines irrégulières probables.

- L'identification de la spécificité nécessite de trouver une corrélation entre les réactions positives et négatives observées en fonction de la présence ou de l'absence d'un antigène spécifique sur les hématies testées, correspondant à l'anticorps suspecté.
- L'identification repose sur la connaissance des fréquences des différents phénotypes dans tous les systèmes de groupes sanguins, des anticorps les plus couramment rencontrés en raison de l'immunogénicité des antigènes correspondants, des variations de l'intensité antigénique d'un donneur d'hématies-tests à un autre, des différents types de réactions d'agglutination selon les systèmes impliqués, des effets de dosage de certains anticorps, ainsi que des techniques préférentielles pour détecter les anticorps en fonction des méthodes utilisées.

⇒ Plusieurs situations peuvent être rencontrées :

1. L'identification la plus simple est celle qui met en évidence un anticorps unique.
2. Les résultats de l'étude des réactions positives et négatives obtenues avec les hématies tests de la gamme d'identification font suspecter un mélange d'anticorps.
3. Le sérum testé agglutine toutes les hématies-tests des différentes gammes d'identification.

⇒ AI identifiée est ensuite titrée.

B – Dosage pondéral des agglutinines irrégulières (RAI) dans le cadre du suivi de grossesse :

1 – Généralités :

Les conséquences de l'interaction entre les antigènes présents sur les globules rouges et les anticorps varient et dépendent de divers facteurs liés aux antigènes, aux anticorps et à la réactivité du système phagocytaire (ou réticulo-endothélial) spécifique à chaque individu. Par conséquent, il est essentiel d'évaluer la signification clinique d'un anticorps identifié chez un patient ou un donneur.

L'un des éléments permettant d'évaluer le risque hémolytique d'un anticorps est son taux, qui peut être estimé de manière semi-quantitative par le titrage ou par le dosage pondéral. Dans le contexte d'une incompatibilité foeto-maternelle, le dosage pondéral permet d'exprimer la concentration en $\mu\text{g/mL}$ ou UI/mL d'anticorps de type IgG, notamment les anticorps du système Rh. Cette méthode ne dépend pas de l'affinité de l'anticorps, qui est évaluée par le titrage. L'association du titrage et du dosage pondéral permet une évaluation complémentaire du risque hémolytique pour le fœtus lié à un anticorps donné.

Lorsque des seuils dangereux sont atteints, il est nécessaire d'examiner la détresse fœtale, ce qui peut indiquer, en fonction de l'âge gestationnel, une transfusion in utero ou un accouchement prématuré avec une prise en charge transfusionnelle du nouveau-né.

2 – Indications :

- * Suivi immuno-hématologique d'une grossesse normale ou après injection d'anti-RH1 au décours d'une complication obstétricale
- * Maladie hémolytique du nouveau-né
- * Suivi de l'immunoprophylaxie par les immunoglobulines anti-RH1 injectées suite à un avortement ou à une grossesse extra-utérine
- * Bilan étiologique d'avortements à répétition ou de mort fœtale in-Utéro(320)

3. Matériels :

1. Analyseur d'hémagglutination en flux continu : C'est l'instrument principal utilisé pour effectuer le dosage pondéral par hémagglutination en flux continu. L'analyseur est conçu pour automatiser le processus de détection et de mesure des agglutinats formés entre les échantillons de sang et les réactifs.
2. Réactifs : Les réactifs spécifiques sont utilisés pour détecter et évaluer les agglutinines irrégulières dans les échantillons de sang. Ces réactifs peuvent inclure des suspensions de globules rouges portant l'antigène correspondant à l'anticorps à doser (les hématies utilisées

sont de phénotype D+C+E+c+e+ (RH:1,2,3,4,5)

et une solution de polyvinylpyrrolidone.

3. Tubes à essai : Des tubes à essai spéciaux, généralement conçus pour être compatibles avec l'analyseur d'hémagglutination en flux continu, sont utilisés pour contenir les échantillons de sang et les réactifs.
4. Pipettes et micropipettes : Les pipettes et les micropipettes sont utilisées pour prélever avec précision les volumes nécessaires d'échantillons de sang et de réactifs, et pour les transférer dans les tubes à essai.
5. Solutions de lavage et tampons : Des solutions de lavage, des tampons ou des diluants spécifiques peuvent être utilisés pour préparer les échantillons de sang et les réactifs, et pour laver les globules rouges afin d'éliminer les substances non pertinentes.
6. Contrôles de qualité : Des échantillons de contrôle de qualité peuvent être utilisés pour vérifier la performance et l'étalonnage de l'analyseur d'hémagglutination en flux continu.
7. Logiciel d'analyse : Un logiciel spécifique est généralement utilisé pour contrôler l'analyseur, collecter les données et interpréter les résultats.(321)

4 – Mode opératoire :

Les dilutions de sérum et la suspension de globules rouges portant l'antigène correspondant à l'anticorps à doser (les hématies utilisées sont de phénotype D+C+E+c+e+ (RH:1,2,3,4,5)) sont propulsées par des pompes dans un long circuit constitué de tubulures souples et de tubes en verre, horizontaux ou enroulés en spires de façon à assurer leur mélange en permanence. Le mélange est segmenté par de l'air dans le but de bien séparer les différentes dilutions de sérum qui, sans ce procédé, auraient tendance à se chevaucher les unes sur les autres. Pour induire l'agglutination des hématies sensibilisées dans le circuit, il existe plusieurs alternatives. Dans tous les cas, ce n'est pas l'ajout d'une antiglobuline mais l'addition d'une solution de macromolécules qui va permettre l'hémagglutination. En effet, cette solution a pour effet d'augmenter la constante diélectrique du milieu, donc de diminuer le potentiel zêta ; ceci facilite

le rapprochement physique des hématies à une distance telle que les molécules d'IgG deviennent capables de fixer une hématie sur chacun de leurs bras et donc d'induire une agglutination. Les pentamères d'IgM peuvent toujours induire une agglutination et cette méthode ne permet pas de distinguer la part d'hémagglutination due aux IgG de celle due aux IgM dans le cas où ces deux classes d'immunoglobulines seraient présentes.

La technique de Rosenfield met en jeu des hématies bromélinées avec une solution de polyvinylpyrrolidone.

La technique de Gunson, dont le principe est similaire à celui de la technique Rosenfield, recourt à une autre macromolécule, la méthylcellulose.

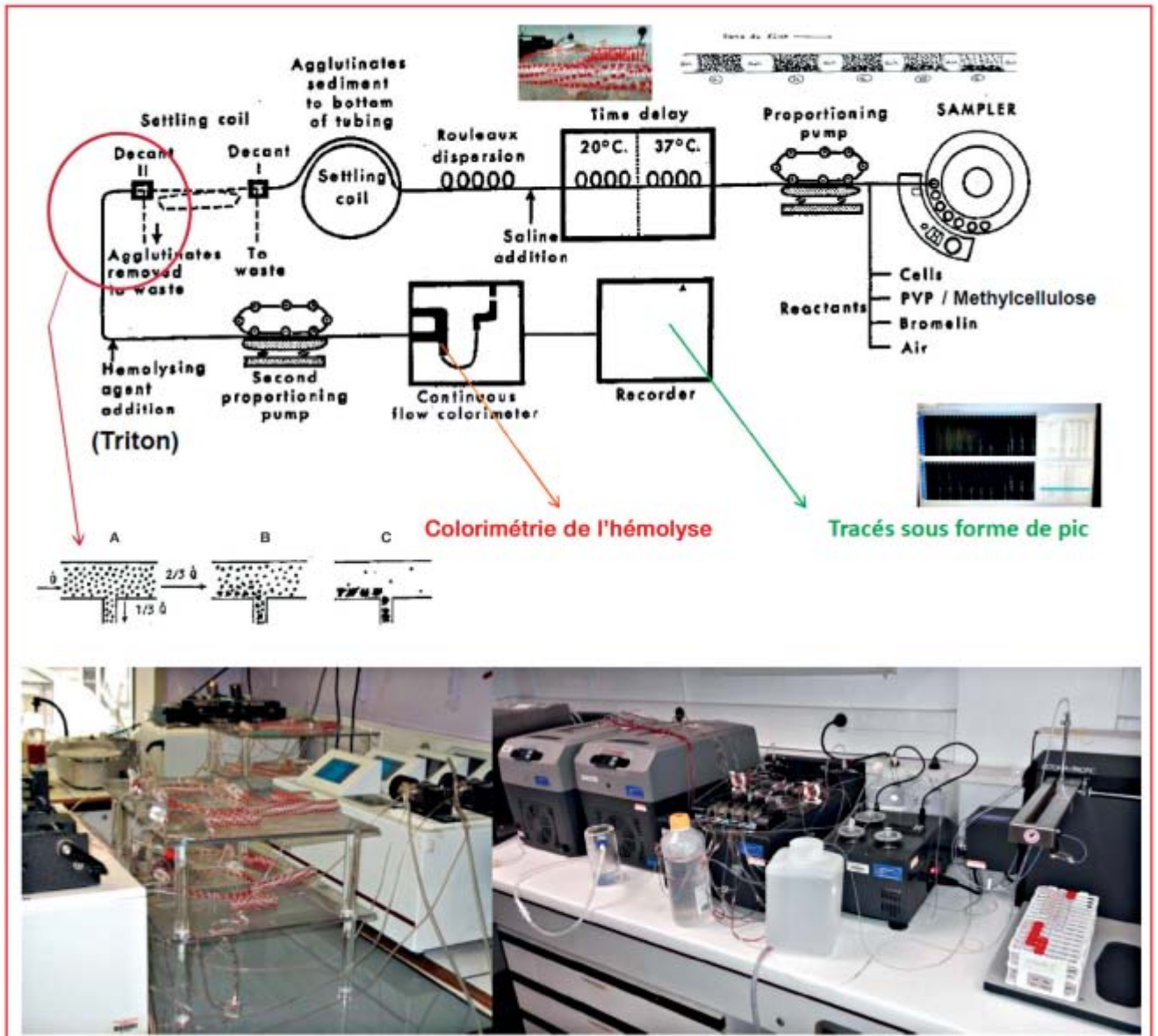


Fig. 67 - Schéma d'un circuit de dosage pondéral par hémagglutination en flux continu et photos d'auto-analyseurs.(322)

5. Résultats :

5.1 Valeurs normales :

Ces anticorps sont normalement absents.

5.2 Valeurs anormales : Interprétation

* Pour l'anti-D un seuil de risque modéré est fixé à 5 UI/mL ou 250 UCHP/mL (par technique de Rosenfield)

* pour l'anti-c un seuil de risque modéré est fixé à 500 UCHP/mL

* pour l'anti-E et l'anti-e un seuil de risque modéré est fixé à 700 UCHP/mL

* pour l'anti-C un seuil de risque modéré est fixé à 1000 UCHP/mL (323) (324) (210)

Spécificité de l'anticorps	Test de quantification	Fréquence des titrages/dosages*	Seuil de mise en place d'un suivi échographique fœtal (risque d'anémie fœtale sévère)
Anti-D (RH1)	Titration (tube)	Au premier trimestre, puis toutes les 2 semaines à partir de 18SA	16 (dès 18SA) mais pouvant être adapté en fonction du dosage pondéral
	Dosage pondéral	Au premier trimestre, puis toutes les 2 semaines à partir de 18SA	5 UI/mL = 1 µg/mL = 250 UCHP/mL (dès 18SA)
Anti-c (RH4)	Titration (tube)	Au premier trimestre, puis tous les mois à partir de 18SA, puis toutes les 2 semaines à partir de 28SA	4 (dès 18SA) mais pouvant être adapté en fonction du dosage pondéral
	Dosage pondéral	Au premier trimestre, puis tous les mois à partir de 18SA, puis toutes les 2 semaines à partir de 28SA	500 UCHP/mL ≈ 7,5 UI/mL (dès 18SA)
Anti-E (RH3)	Titration (tube)	Au premier trimestre, puis tous les mois à partir de 28SA	8 (dès 28SA) mais pouvant être adapté en fonction du dosage pondéral
	Dosage pondéral	Au premier trimestre, puis tous les mois à partir de 28SA	700 UCHP/mL (troisième trimestre)
Autres anti-RH	Titration (tube)	Au premier trimestre, puis tous les mois à partir de 28SA	Anti-e (RH5) et « anti-publics » : 8 (dès 28SA) mais pouvant être adapté en fonction du dosage pondéral Autres anticorps : 16 (dès 28SA) mais, selon la spécificité, pouvant être adapté en fonction du dosage pondéral
	Dosage pondéral (pour anti-C (RH2), anti-G (RH12), anti-e (RH5) et anti-public)	Au premier trimestre, puis tous les mois à partir de 28SA	Anti-e (RH5) et « anti-publics » : 700 UCHP/mL (dès 28SA) Anti-C (RH2) et anti-G (RH12) : 1 000 UCHP/mL (dès 28SA)

Fig 68 : Seuils critiques préconisés par le Centre National de Référence en Hémobiologie

Périnatale pour la mise en place d'un suivi échographique et clinique anténatal et fréquence des titrages/dosages recommandée (210)

C – Épreuve directe de compatibilité au laboratoire :

1 – Généralités :

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

2 – Indications :

- Pour les patients polytransfusés qui n'ont pas d'anticorps irréguliers anti-érythrocytaires, il est recommandé de réaliser cette épreuve. En revanche, elle n'est plus recommandée chez les femmes enceintes.
- En dehors des situations d'urgence, cette épreuve n'est pratiquée que chez les patients ayant eu un résultat positif à la recherche d'anticorps irréguliers.
- En France, lorsqu'une recherche d'anticorps irréguliers est négative, elle est considérée comme suffisante pour transfuser un patient.
- Il n'y a pas de gain significatif en termes de sécurité associé à cette analyse lorsque la recherche d'agglutinines irrégulières prétransfusionnelle, réalisée dans de bonnes conditions techniques, est négative, même chez les patients polytransfusés ou les nouveau-nés avec un test de datation sanguine négatif.³²⁵

3 – Matériels :

1. Échantillons de sang : Des échantillons de sang du donneur et du receveur sont nécessaires pour effectuer l'épreuve directe de compatibilité. Ces échantillons sont prélevés conformément aux protocoles de prélèvement sanguin

2. Réactifs de groupage sanguin : Des réactifs spécifiques sont utilisés pour déterminer le groupe sanguin du donneur et du receveur. Cela peut inclure des sérums anti-A, anti-B, anti-AB et anti-D pour les groupes ABO et Rh.
3. Plaques ou tubes de test : Des plaques ou des tubes spécialement conçus sont utilisés pour mélanger les échantillons de sang du donneur et du receveur avec les réactifs de groupage sanguin. Ces supports de réaction permettent d'observer les réactions d'agglutination.
4. Centrifugeuse : Une centrifugeuse est nécessaire pour séparer les composants sanguins et obtenir le sérum à partir des échantillons de sang.
5. Pipettes et micropipettes : Des pipettes ou des micropipettes sont utilisées pour mesurer avec précision les volumes nécessaires des échantillons de sang et des réactifs.
6. Équipement de laboratoire standard : Cela peut inclure des agitateurs, des compte-gouttes, des pipeteurs, des réfrigérateurs, des incubateurs et d'autres équipements couramment utilisés en laboratoire.

4 – Mode opératoire :

• Technique de microfiltration :

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

Fig 69 : Modalités techniques de réalisation de l'ECDL en microfiltration (326)

• Test Indirect à l'antiglobuline :

⇒ Technique par simple mélange en tube :

Dans ce contexte, différentes techniques sont utilisées, comme illustré dans le tableau ci-

dessous, et la plus couramment utilisée est celle du cross-match, qui implique l'utilisation de l'antiglobuline humaine (AHG)

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

Fig 70 : technique de l'ECDL en tube

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

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

N.B : La présence de rouleaux n'est pas une indication d'incompatibilité.(327)

5.Résultats :

1 - Si aucune réaction d'agglutination n'est observée, le résultat de l'épreuve directe de compatibilité au laboratoire (ECDL) est négatif, ce qui signifie que l'unité de concentré de

globules rouges (CGR) est déclarée compatible avec le sérum ou le plasma du patient.

⇒ La compatibilité entre le sang du donneur et du receveur est confirmée lorsqu'il n'y a pas d'agglutination observée à la fois dans le cross-match majeur et le cross-match mineur.

2 - Si une réaction d'agglutination est observée, le résultat de l'épreuve directe de compatibilité au laboratoire (ECDL) est positif, ce qui indique que l'unité de concentré de globules rouges (CGR) est déclarée incompatible avec le sérum ou le plasma du patient.

⇒ Il est impératif de ne jamais transfuser un sang qui présente une incompatibilité dans le cross-match majeur, car le grand volume de plasma du receveur contenant des anticorps peut facilement détruire les globules rouges du donneur.

⇒ Une incompatibilité dans un cross-match mineur est moins préoccupante, car le plasma du donneur contenant les anticorps est dilué dans le plasma du receveur, ce qui réduit la concentration des anticorps et les rend moins efficaces.(328)

D - Test direct à l'antiglobuline (TDA) :

1 - Généralités :

Le test d'antiglobuline, également connu sous le nom de test de Coombs, est une procédure de laboratoire d'immunologie utilisée pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre les globules rouges (GR) en circulation dans l'organisme, qui induisent alors une hémolyse. La destruction de ces globules rouges par des anticorps dirigés contre eux est décrite sur le plan diagnostique comme une anémie hémolytique auto-immune (AIHA).

De nombreuses étiologies entrent dans cette classification.

Le principe du test direct à l'antiglobuline (TDA) est de détecter la présence d'anticorps fixés directement aux globules rouges, en lavant un échantillon de sang prélevé dans une solution

saline afin d'isoler les globules rouges du patient ; cette procédure permet d'éliminer les anticorps non liés qui pourraient autrement fausser le résultat.(329)

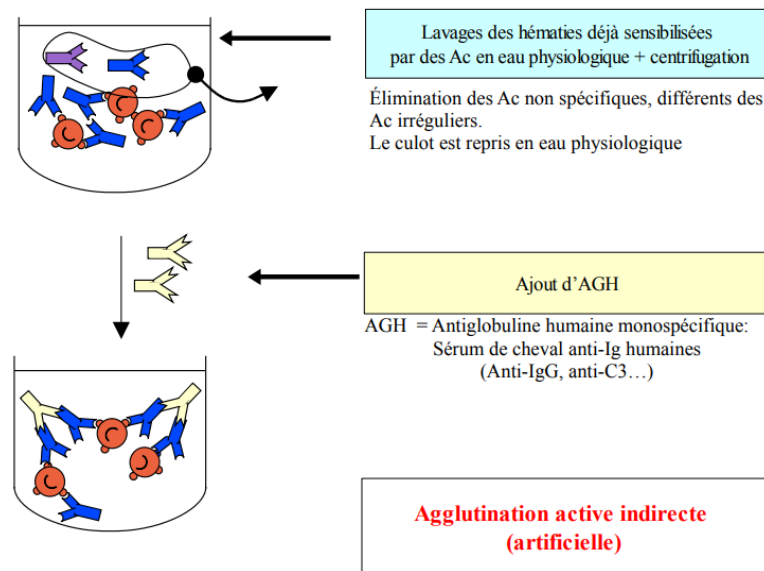


Fig 71: Principe du test direct à l'antiglobuline (330)

2 - Indications :

- Anémie hémolytique auto-immune.
- Anémie hémolytique immunitaire d'origine médicamenteuse.
- Réactions transfusionnelles hémolytiques médiées par des allo-anticorps
- Maladie hémolytique du nouveau-né
- Lupus érythémateux systémique (sans anémie hémolytique). (331)

3 - Matériels :

- Échantillons de sang : Des échantillons de sang du patient prélevés dans un tube EDTA.
- Réactifs d'antiglobuline : Des réactifs polyspécifique ou monospécifique d'antiglobuline, tels que l'antiglobuline humaine (AHG), sont utilisés pour détecter les anticorps déjà liés aux globules rouges du patient.
- Réactifs d'induction d'agglutination : Des réactifs spécifiques, tels que des antigènes globulaires rouges de groupes sanguins connus, sont utilisés pour induire l'agglutination des globules rouges en présence d'anticorps.

- Plaques ou tubes de test : Des plaques ou des tubes spécialement conçus sont utilisés pour mélanger les échantillons de sang du patient avec les réactifs d'antiglobuline et les réactifs d'induction d'agglutination.
- Centrifugeuse : Une centrifugeuse est utilisée pour séparer les composants sanguins et obtenir le sérum à partir des échantillons de sang.
- Pipettes et micropipettes : Des pipettes ou des micropipettes sont utilisées pour mesurer avec précision les volumes nécessaires des échantillons de sang et des réactifs.
- Équipement de laboratoire standard : Cela peut inclure des agitateurs, des compte-gouttes, des pipeteurs, des réfrigérateurs, des incubateurs et d'autres équipements couramment utilisés en laboratoire.(332)

4 – Mode opératoire :

Dans 4 tubes à hémolyse, verser :		Réaction de Coombs directe			
		Réaction	T contrôle	CQI (+)	CQI (-)
Sensibilisation des GR témoins	Sérum anti-D	-	-	2 gouttes	2 gouttes
	GR témoins	-	-	1 goutte de GR [O, Rh +]	1 goutte de GR [O, Rh -]
<i>Incuber à 37°C – 30 min</i>					
Lavage	GR du patient 50 % eau Ψ	1 goutte	1 goutte	-	-
	Eau Ψ	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL
	<i>Centrifuger 3 min à 800g Jeter l'eau du lavage dans la Javel et décoller le culot en grattant le tube sur le portoir Refaire ainsi 2 autres lavages dans 4 mL d'eau physiologique Puis déposer sur chaque culot du dernier lavage :</i>				
Suspension à 20 % de GR pour technique en plaque	Eau Ψ	3 gouttes	3 gouttes	3 gouttes	3 gouttes
	<i>Poursuivre comme indiqué dans le tableau jaune (Technique en plaque) ci-dessous.</i>				
Suspension à 5 % de GR pour technique en tube	Eau Ψ	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL
	<i>Poursuivre comme indiqué dans le tableau bleu (Technique en tubes) ci-dessous.</i>				

Eau Ψ : Eau physiologique

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

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

Fig 72 : Mode opératoire du test direct à l'antiglobuline (TDA) (334)

5 – Résultats :

⇒ Contrôles de qualité internes et témoin

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

- * la présence de la présence de GR sensibilisés par des Ac est bien repérée par un agglutinat
- * les différents temps de la réaction (lavage et action de l'AGH) se déroulent parfaitement
- * la bonne qualité de l'AGH.

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

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

⇒ Lecture des réactions

Si les témoins sont corrects :

- Une agglutination signifie que les GR sont recouvertes par un Ac que le contexte biologique identifiera comme un Ac d'origine maternelle.(334)

E – Titrage des agglutinines froides :

1 – Généralités :

Les agglutinines froides sont des auto-anticorps anti-érythrocytaires capables d'entraîner une agglutination des globules rouges en dessous de 30 °C avec une réactivité maximale entre 0 et + 5 °C, ce phénomène étant réversible après réchauffement. Les agglutinines froides ne sont pas forcément pathogènes : il existe en effet chez beaucoup d'individus la présence d'agglutinines froides naturelles à titre très faible dans leur sérum sans manifestation pathologique in vivo.

En revanche, certaines agglutinines froides ont une réelle signification pathologique et peuvent être responsables d'anémies hémolytiques auto-immunes dites « à auto-anticorps froids » (16 à 32 % des AHAI).

2 – Indications :

- Bilan d'anémie hémolytique auto-immune: recherche d'auto-anticorps froids pour diagnostic ou suivi.(333)

CLASSIFICATION OF AUTOIMMUNE HAEMOLYTIC ANAEMIA ^{4,5,8-11,58-60}
Warm Autoantibodies (70–80%)
<i>Idiopathic</i>
<i>Secondary</i>
Malignancy: lymphoma, chronic lymphocytic leukaemia, ovarian dermoid cyst, Kaposi sarcoma
Autoimmune disorders: SLE, rheumatoid arthritis, ulcerative colitis
Infection: hepatitis C
Immunodeficiency: HIV infection, common variable immune deficiency, autoimmune lymphoproliferative disease
After allogeneic bone marrow or other haemopoietic stem cell transplantation
Cold Autoantibodies (10–15%)
<i>Idiopathic</i>
<i>Secondary</i>
Malignancy: lymphoma, chronic lymphocytic leukaemia, IgM gammopathy
Waldenström macroglobulinaemia
Infection: atypical or <i>Mycoplasma pneumoniae</i> infection, infectious mononucleosis
After allogeneic bone marrow or other haemopoietic stem cell transplantation
Paroxysmal Cold Haemoglobinuria (1–2%)
<i>Idiopathic</i>
<i>Secondary</i>
Viral infection, syphilis
Combined Warm and Cold Autoantibodies (Mixed Type AIHA) (6–8%)
<i>Idiopathic</i>
<i>Secondary</i>
SLE, lymphoma
Drug-induced AIHA

Fig 73 : CLASSIFICATION DE L'ANÉMIE HÉMOLYTIQUE AUTO-IMMUNE (334) (335) (336) (337) (338) (339)

3 – Matériels :

- Tubes à essai : Prélèvement de 2 tubes secs de 7 mL de sang et de 1 tube de 7 mL sur EDTA.
- Pipettes : Vous aurez besoin de pipettes volumétriques ou de micropipettes pour transférer les volumes précis de réactifs et d'échantillons lors de la préparation des dilutions.
- Réfrigérateur : Vous aurez besoin d'un réfrigérateur pour stocker les échantillons à des températures appropriées lors des différentes étapes du titrage.
- Agitateur : Un agitateur mécanique ou vortex est utile pour mélanger les échantillons et les réactifs de manière homogène.
- Thermomètre : Un thermomètre précis vous permettra de mesurer la température des échantillons et des réactifs, car les agglutinines froides sont généralement actives à des températures inférieures à la température corporelle.
- Réfrigérant : Si vous effectuez des titrages à des températures très basses, vous pouvez avoir besoin d'un réfrigérant spécifique, comme de la glace ou de l'azote liquide, pour maintenir les échantillons à la température souhaitée.
- Plaques ou microplaques : Utilisez des plaques ou des microplaques à puits pour effectuer les réactions d'agglutination. Assurez-vous d'utiliser des plaques compatibles avec les réactifs et les techniques que vous utilisez.
- Photomètre ou spectrophotomètre : Un photomètre ou un spectrophotomètre peut être utilisé pour mesurer l'absorbance ou la turbidité des échantillons après réaction et évaluer le titre des agglutinines froides.
- Réactifs : Vous aurez besoin de réactifs spécifiques pour détecter et mesurer les agglutinines froides. Cela peut inclure des solutions de polyéthylène glycol (PEG), des réactifs anti-igM ou anti-igG, et d'autres réactifs spécifiques selon la méthode de titrage que vous utilisez.

4 – Mode opératoire :

Le titrage est réalisé sur des hématies traitées à la papaïne et/ou natives.

La technique classique décrite ici est celle réalisée en microtubes de verre avec lecture de

l'agglutination sous microscope. Il s'agit de la technique de référence. Des techniques en gel filtration, plus simples de réalisation, ont aussi été validées. Une dilution géométrique de raison 2 du sérum est réalisée dans 10 tubes en verre, sous un volume de 0,5 mL. Une série de titrages est réalisée à + 4 °C et une autre à + 37 °C, en déposant 1 goutte d'hématies sélectionnées dans chaque tube. Les hématies sont de 3 catégories : des globules rouges d'adultes (exprimant l'antigène I), des globules rouges de nouveau-nés (exprimant uniquement l'antigène i), les propres globules rouges du patient (provenant du tube EDTA).

Après 2 heures à + 4 °C et à + 37 °C, une goutte de chaque tube est déposée entre lame et lamelle et lue au microscope pour rechercher l'agglutination.

Le résultat du titrage est rendu à + 4 °C et à + 37 °C.(340)

5 - Résultats :

En utilisant des sérums d'adultes caucasiens normaux et de globules rouges d'adultes normaux, le titre d'agglutinine froide à 4 °C est de 1 à 32. ; avec des cellules de sang de cordon, le titre est de 0 à 8. Dans le cas de maladie des agglutinines froides chronique, le point final peut ne pas avoir été atteint à une dilution de 1/512 ; si tel est le cas, d'autres dilutions doivent être préparées et testées, Si tel est le cas, d'autres dilutions doivent être préparées et testées.

Si une agglutinine froide est présente à un titre élevé, la présence d'un allo-anticorps froid doit être exclue. Dans ce cas, les globules rouges du patient réagissent beaucoup moins fortement que les globules rouges normaux de l'adulte I. Il convient de noter qu'en cas de maladie d'agglutinines froides, les cellules du patient réagissent généralement moins fortement que les cellules adultes I normales.

TABLE 13-7

AGGLUTINATION TITRES USING VARIOUS TYPES OF COLD AUTOANTIBODIES AND NORMAL ADULT AND NORMAL CORD RED CELLS, THE PATIENT'S RED CELLS AND ENZYME-TREATED (PAPAINISED) NORMAL ADULT RED CELLS

Patient	Agglutination Titre (4 °C)			
	Adult (I) Cells	Cord (i) Cells	Patient's Cells	Papainised Adult (I) Cells
A.G.	4000	512	2000	8000
F.B.	512	32 000	128	8000
A.R.	2000	2000	2000	16

A.G: This patient had chronic cold haemagglutinin disease. The antibody was of the common anti-I type.

F.B: This patient had haemolytic anaemia associated with a lymphoma. The antibody was of the anti-i type.

A.R: This patient had chronic cold haemagglutinin disease. The antibody was of the rare anti-Pr type.

Fig 74 : TITRES D'AGGLUTINATION UTILISANT DIVERS TYPES D'AUTO-ANTICORPS FROID ET ADULTE NORMAL ET CORDON NORMAL LES GLOBULES ROUGES, LES GLOBULES ROUGES DU PATIENT ET ENZYMATISÉ (PAPAINISÉ) NORMAL GLOBULES ROUGES ADULTES (341)

F – Épreuve d'adsorption d'anticorps anti-érythrocytaires :

1 – Généralités :

L'adsorption est un processus chimique de surface où les molécules d'un gaz ou d'une substance en solution ou en suspension sont retenues à la surface d'un solide. Dans le contexte des anticorps, il est possible d'éliminer un anticorps du sérum ou du plasma en l'adsorbant sur des hématies qui expriment l'antigène ciblé. Une fois que l'anticorps s'est fixé à l'antigène membranaire, le liquide excédentaire est séparé par centrifugation. Ensuite, une recherche des anticorps anti-érythrocytaires (RAI) est réalisée sur le matériau adsorbé.

2 – Indication :

L'objectif de l'analyse est d'assurer la sécurité immuno-hémolytique des transfusions en identifiant un ou des allo-anticorps et en différenciant les allo-anticorps des auto-anticorps.

♦ **Une autoadsorption est réalisée pour :**

- Confirmer si les réactions spécifiques ou non spécifiques observées lors de la recherche d'anticorps irréguliers (RAI) sont d'origine autologue, c'est-à-dire produites par le patient lui-même. Cela est réalisé en utilisant un témoin autologue positif ou négatif lors de l'analyse.

- Détecter des allo-anticorps après adsorption d'auto-anticorps.

♦ **Une allo-adsorption est réalisée pour permettre la détection d'allo-anticorps après adsorption :**

- D'auto-anticorps

- D'allo-anticorps qui agglutinent la plupart ou la totalité des hématies, soit à travers un mélange d'anticorps, soit par la reconnaissance d'un antigène présent à une fréquence élevée.

3 – Matériels :

1. Tubes à essai : Recueil de 2 à 3 tubes de 7 mL sur EDTA ou tube sec traité.
2. Pipettes : Vous aurez besoin de pipettes volumétriques ou de micropipettes pour transférer les volumes précis d'échantillons et de réactifs lors de la préparation des mélanges.
3. Réfrigérateur : Vous aurez besoin d'un réfrigérateur pour stocker les échantillons et les réactifs à des températures appropriées pendant les différentes étapes de l'épreuve.
4. Centrifugeuse : Une centrifugeuse est nécessaire pour séparer les cellules ou les particules adsorbées des échantillons après la réaction.
5. Agitateur : Un agitateur mécanique ou vortex est utile pour mélanger les échantillons et les réactifs de manière homogène.

6. Réactifs : Vous aurez besoin de réactifs spécifiques pour réaliser l'épreuve d'adsorption :
- Pour une alloadsorption : hématies adsorbantes sélectionnées : prêtes à l'emploi ou préparées extemporanément
 - Pour une autoadsorption : hématies du patient traitées extemporanément
 - Support de microfiltration
 - Panels de dépistage et d'identification, voire de référence : suspension adaptée à la technique de RAI
 - Solution saline 0.15 M
 - Solution basse force ionique(LISS) adéquate (validée par la technique considérée)
 - Papaïne
 - DTT (dithiothréitol) pH 8 à 0.2 M
7. Thermomètre : Un thermomètre précis vous permettra de mesurer et de contrôler la température des échantillons et des réactifs pendant les différentes étapes de l'épreuve.
8. Photomètre ou spectrophotomètre : Un photomètre ou un spectrophotomètre peut être utilisé pour mesurer l'absorbance ou la turbidité des échantillons après l'épreuve d'adsorption, permettant ainsi d'évaluer le degré d'adsorption des anticorps anti-érythrocytaires.(342)

4 - Mode opératoire :

a) Préparation des hématies du patient pour une autoadsorption :

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

⇒ **En cas de traitement enzymatique :**

- Incuber séparément les GR et la papaïne 15 min à 37°C (5 volumes de GR et 1 volume de papaïne)
- Mettre en contact les GR et la papaïne dans un tube (5volume/1 volume)
- Incuber le mélange 10min à +37°C - Laver 3 fois en solution saline 0.15M.

⇒ **En cas de traitement par le ZZAP :**

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

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

b) Préparation des hématies pour une alloadsorption :

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

c) Adsorption :

• Dans un tube, à 1 volume de CG d'hématies adsorbantes, ajouter 1 volume de sérum à adsorber. Ajouter éventuellement 1 volume de solution Liss si l'AC à adsorber a une intensité >

1+

- Incuber le tube bouché et couché 20 min à 37°C ou +4°C (suivant les circonstances)
- Centrifuger 10 min à 2000g

- Décanter le surnageant (adsorbat) et le transférer dans le tube suivant puis recommencer comme ci-dessus sans Liss
- Répéter l'opération (si besoin) une 3^{ème} fois.(343)

5 – Résultats :

L'utilisation de l'adsorption est particulièrement pertinente lorsqu'il s'agit d'analyser une situation de pan-agglutination.(344)

3 types de résultats peuvent être obtenus :

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

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

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

Dans le cadre d'alloadsorption : Dans ce contexte, deux situations peuvent se présenter : soit le contexte suggère la présence d'un autoanticorps qui n'entrave pas la détection des anticorps dirigés contre l'un des antigènes du panel, soit le phénotypage révèle l'absence d'un antigène de grande fréquence et/ou le contexte laisse supposer la présence d'un anticorps dirigé contre un antigène de grande fréquence(ce qui se manifeste par une pan-agglutination sur le sérum natif avec un témoin autologue négatif ou de faible intensité).

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

Un anticorps adsorbé, qu'il s'agisse d'un autoanticorps ou d'un alloanticorps, dissimule un autre anticorps dont la spécificité doit être évaluée.

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

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

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

Il s'agit d'un échec de l'adsorption.

Dans le cadre d'une autoadsorption, L'échec observé peut être attribué à divers facteurs, tels qu'une saturation des globules rouges du patient, un nombre insuffisant d'adsorptions, une faible affinité de l'anticorps ou la présence d'un alloanticorps ciblant un antigène fréquent.

Dans le cadre d'une alloadsorption cela peut être soit un anticorps ciblant un antigène fréquent avec un titre élevé, soit un anticorps présentant une faible affinité.(345)

G - Épreuve d'élution d'anticorps à partir de globules rouges :

1 - Généralités :

La présence d'un syndrome hémolytique nécessite une clarification des mécanismes de destruction des globules rouges. On distingue généralement des causes intrinsèques (anomalies de la membrane, des enzymes ou de l'hémoglobine) et des causes extrinsèques (immunologiques, toxiques et mécaniques). Le test direct à l'antiglobuline est utilisé pour confirmer l'origine immunologique d'une anémie hémolytique. Cependant, dans certaines situations, il est nécessaire d'identifier la spécificité des anticorps qui ont sensibilisé les globules rouges. L'épreuve d'élution permet de détacher ces anticorps des globules rouges et de les identifier ensuite à l'aide d'une recherche d'agglutinines irrégulières (RAI). Enfin, les limites de sensibilité du test direct à l'antiglobuline (TDA, test de Coombs) ne permettent pas toujours de confirmer la sensibilisation. L'épreuve d'élution, en concentrant les éventuels anticorps sensibilisants, peut confirmer que les globules rouges ont été sensibilisés in vivo par des anticorps.

2 - Indications :

Le but de ce test est de séparer et d'identifier les anticorps responsables d'une sensibilisation in vivo des globules rouges. Les domaines d'application incluent :

- 18 Un résultat positif du test direct à l'antiglobuline (TDA) chez un nouveau-né.
- 19 La présence d'un syndrome hémolytique dans un contexte transfusionnel ou non, indépendamment du résultat du TDA.
- 20 La suspicion d'un incident transfusionnel ou d'une inefficacité transfusionnelle.
- 21 Un résultat positif du TDA avec une histoire de transfusion remontant à moins de 3 mois.

3 -Matériels : (pour l'élution par acide)

- Un tube de 7ml de sang prélevé sur EDTA et traité dans les 72 heures suivant le prélèvement.
- Tube à hémolyse
- Centrifugeuse (tubes et supports filtration)
- Incubateur à +37°C
- Parafilm
- Micropipette de précision.
- Réactifs :

⇒ Technique validée par le kit commercial « DiaCidel, Biorad »

- ◆ Solution de lavage concentrée : solution mère à diluer extemporanément en eau distillée au 1/10 et conserver à +4°C } Solution d'élution de digitonine acide prête à l'emploi conservée à +4°C
- ◆ Solution tampon prête à l'emploi conservée à +4°C
- ◆ Support de microfiltration

- TIA = polyspécifique ou anti-IgG
- Neutral pour réaction enzymatique
- Panels de dépistage et d'identification, voire de référence, en suspension adaptée à la technique.
- Hématies-test A1-A2-B en suspension adaptée à la technique.

4) Mode opératoire :

a) Lavage des hématies :

- Laver 4 fois à +4°C en solution de lavage 1 ml de CG
- Récupérer la dernière eau de lavage (DEL) « isovolume »

b) Elution :

- Dans le tube, déposer 1ML de culot lavé et 1 ml de solution acide
- Renverser lentement le tube à 3 reprises en obturant l'ouverture avec un parafilm
- Le centrifuger pendant 1 min à 900g
- Récupérer immédiatement le surnageant dans un tube propre
- Ajouter goutte à goutte de la solution tampon jusqu'au « virage au bleu »
- Centrifuger pendant 1 min à 900g et récupérer le surnageant (éluat).

c) Distribution de l'éluat et la DEL sur les supports de filtration :

- Identifier les supports
- Répartir l'éluat et des hématies-test (Dépistage +/- identification ET A1, A2 et B) ; Les volumes sont ceux prévus par la notice. Pour le volume de l'éluat, il est celui prévu pour le sérum dans le cadre de la RAI
- Répartir la DEL dans les mêmes conditions que l'éluat
- Centrifuger les supports filtration avec une centrifugeuse préprogrammée
- Lecture (346)

5 – Résultats :

1. Présence d'anticorps spécifiques identifiés : L'épreuve d'éluat révèle la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques présents sur les globules rouges. Par exemple, des anticorps anti-érythrocytaires de groupe sanguin A ont été identifiés.
2. Absence d'anticorps spécifiques identifiés : Aucun anticorps spécifique n'est détecté lors de l'épreuve d'éluat. Aucune réaction d'agglutination ou de sensibilisation n'est observée.

3. Épreuve d'élution négative : L'épreuve d'élution ne montre aucune libération d'anticorps à partir des globules rouges. Cela suggère l'absence d'anticorps sensibilisants ou leur présence à un niveau très bas.
4. Présence d'anticorps non spécifiques : Des anticorps non spécifiques sont détachés des globules rouges lors de l'épreuve d'élution. Cela peut indiquer la présence d'anticorps dits "froids" qui se lient de manière non spécifique aux globules rouges.

Il est important de noter que les résultats de l'épreuve d'élution doivent être interprétés en conjonction avec d'autres informations cliniques et des tests supplémentaires pour établir un diagnostic précis et déterminer la signification clinique des résultats.



*AUTRES
ANTICORPS ANTI-
ELEMENTS*



A – Recherche d'anticorps dirigés contre la membrane des polynucléaires neutrophiles :

1 – Généralités :

Les anticorps dirigés contre la membrane des polynucléaires neutrophiles peuvent être soit :

1) Des auto-anticorps dirigés contre les glycoprotéines de la membrane du polynucléaire neutrophile :

- CD16/FcγRIIIb et CD177/NB1
- Ou plus spécifiquement contre les antigènes HNA (*Human Neutrophil Antigens*)

exprimés par ces derniers : HNA-1a/NA1 et HNA-1b/NA2.

2) Des allo-anticorps dirigés contre les antigènes des groupes granulocytaires HNA :

- HNA-1, HNA-2, HNA-3, HNA-4, HNA-5.

3) des iso-anticorps (rares) anti-CD16 chez les sujets déficitaires en FcγRIIIb.

N.B : Actuellement, les allo-anticorps sont détectés uniquement chez les donneuses qui ont développé une allo-immunisation pendant leur grossesse, suite à des transfusions de produits déleuocytés.

2 – Indications :

- Recherche d'**auto-anticorps** dans le cadre d'une neutropénie quand l'origine auto-immune est suspectée
- Rechercher et identifier des **allo-anticorps** anti-HNA lors :
 - ♦ D'une suspicion de neutropénie néonatale due à une allo-immunisation fœto-maternelle.
 - ♦ D'une réaction transfusionnelle de type TRALI (Transfusion Related Acute Lung Injury) chez le transfusé et les donneuses.

- ◆ D'une réactions post-transfusionnelles de type frisson-hyperthermie.
- ◆ D'une neutropénie inexplicquée post greffe de cellules souches hématopoïétiques.

3 – Matériels :

Il faut réaliser 3 techniques : *Granulocyte Immunofluorescence Test* GIFT, *Granulocyte Agglutination Test* GAT et *Monoclonal Antibody-Specific Immobilization of Granulocyte Antigens*, MAIGA

• Matériels pour réaliser *Granulocyte Immunofluorescence Test* GIFT :

1. Échantillons de sang : Des échantillons de sang des patients prélevés dans des tubes appropriés, tels que des tubes secs ou tubes EDTA
2. Tubes à essai ou microplaques : Les tubes à essai ou les microplaques sont utilisés pour réaliser les réactions immunologiques du GIFT.
3. Réactifs d'immunofluorescence : Ces réactifs comprennent des anticorps fluorescents spécifiques qui se lient aux antigènes présents sur les granulocytes. Les réactifs primaires sont des anticorps spécifiques dirigés contre les granulocytes, tandis que les réactifs secondaires sont des anticorps marqués aux fluorochromes qui se lient aux anticorps primaires. Ces réactifs permettent la visualisation et la détection des anticorps dirigés contre les granulocytes.
4. Granulocytes normaux : Des granulocytes normaux provenant d'individus sains sont utilisés comme source d'antigènes pour réaliser les réactions immunologiques. Ces granulocytes peuvent être isolés à partir de sang total ou de buffy coat.
5. Microscope à fluorescence ou cymomètre en flux : Un microscope à fluorescence équipé d'un système de détection approprié est nécessaire pour l'observation et l'interprétation des résultats. Le microscope doit être capable d'exciter les fluorochromes utilisés et de visualiser les émissions fluorescentes correspondantes.
6. Équipements de laboratoire standard : Cela comprend des pipettes, des centrifugeuses, des incubateurs, des agitateurs, des systèmes de lavage automatisés (le cas échéant) et d'autres équipements de laboratoire couramment utilisés pour les analyses immunologiques.

• Matériels pour réaliser le test d'agglutination des granulocytes, GAT :

1. Échantillons de sang : Des échantillons de sang des patients prélevés dans des tubes appropriés, tels que des tubes secs ou tubes EDTA.
2. Tubes à essai : Les tubes à essai en verre ou en plastique sont utilisés pour réaliser les réactions d'agglutination.
3. Réactifs d'agglutination : Ces réactifs comprennent des anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes présents sur les granulocytes. Les réactifs primaires sont des anticorps spécifiques qui se lient aux granulocytes, induisant ainsi l'agglutination. Les réactifs secondaires peuvent également être utilisés pour amplifier l'agglutination.
4. Agitation : Un agitateur ou une méthode d'agitation appropriée, telle que l'inversion douce des tubes, est utilisé pour favoriser l'agglutination des granulocytes en présence d'anticorps.
5. Centrifugeuse : Une centrifugeuse est utilisée pour séparer les granulocytes agglutinés des granulocytes non agglutinés après la réaction.
6. Équipements de laboratoire standard : Cela comprend des pipettes, des tubes à essai, des supports de tubes, une source de chaleur (le cas échéant), une source de lumière adéquate et d'autres équipements de laboratoire couramment utilisés.

• Matériels pour réaliser Monoclonal Antibody-Specific Immobilization of Granulocyte Antigens, MAIGA :

1. Échantillons de sang : Des échantillons de sang des patients prélevés dans des tubes appropriés, tels que des tubes secs ou tubes EDTA.
2. Microplaques ou supports solides : Les microplaques ou les supports solides, tels que des billes ou des puits de réaction, sont utilisés pour immobiliser les anticorps monoclonaux spécifiques.
3. Anticorps monoclonaux spécifiques : Des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre les antigènes présents sur les granulocytes sont nécessaires pour réaliser la réaction d'immobilisation. Ces anticorps monoclonaux peuvent être préparés en interne dans le laboratoire ou achetés auprès de fournisseurs spécialisés.

4. Réactifs de marquage : Des réactifs de marquage spécifiques, tels que des enzymes ou des fluorochromes, sont utilisés pour détecter les anticorps immobilisés sur les granulocytes.
5. Réactifs de lavage : Des solutions de lavage appropriées, généralement des tampons de lavage, sont utilisées pour éliminer les éléments non liés lors des étapes de lavage.
6. Microscope ou lecteur de plaques : Un microscope ou un lecteur de plaques est utilisé pour mesurer ou observer les résultats de l'immobilisation spécifique des antigènes des granulocytes.
7. Équipements de laboratoire standard : Cela comprend des pipettes, des agitateurs, des incubateurs, des systèmes de lavage automatisés (le cas échéant) et d'autres équipements de laboratoire couramment utilisés.

4 – Mode opératoire :

• **Granulocyte Immunofluorescence Test GIFT : (c'est mieux d'écrire les étapes ou garder les schémas) :**

⇒ Préparation des cellules :

- 1) Mélanger 10 ml de sang anticoagulé à l'EDTA et 2,5 ml de dextran à 5 %. Fermer le tube à essai avec un film plastique et incubé pendant 30 minutes à 37 °C à un angle de 45°.
- 2) Transférer délicatement le plasma de dextran (surnageant) sur 2,5 ml de Ficoll dans un nouveau tube à essai et centrifuger pendant 20 min à 310 × g.
- 3) Jeter le surnageant restant et ajouter 2 ml de tampon d'hémolyse au culot.
- 4) Incuber pendant 5 minutes sur de la glace fondante.
- 5) Remplir le tube avec du tampon PBS et centrifuger pendant 5 minutes à 140 × g.
- 6) Jeter le surnageant, remettre en suspension le culot avec du tampon PBS, et répéter le lavage deux fois.
- 7) Jeter le surnageant, remettre en suspension le culot avec 1,5 ml de tampon PBS et ajouter 0,5 ml de solution PFA. Incuber exactement pendant 5 minutes dans l'obscurité.
- 8) Remplir le tube avec du tampon PBS et centrifuger pendant 5 minutes à 140 × g.

9) Jeter le surnageant, remettre en suspension le culot avec du tampon PBS, et répéter le lavage deux fois.

10) Jeter le surnageant, remettre le culot en suspension avec du tampon PBS, et ajuster la concentration de neutrophiles à 5 000 cellules/ μ L avec du tampon PBS.(347)

◆ Par microscope à fluorescence : (348)

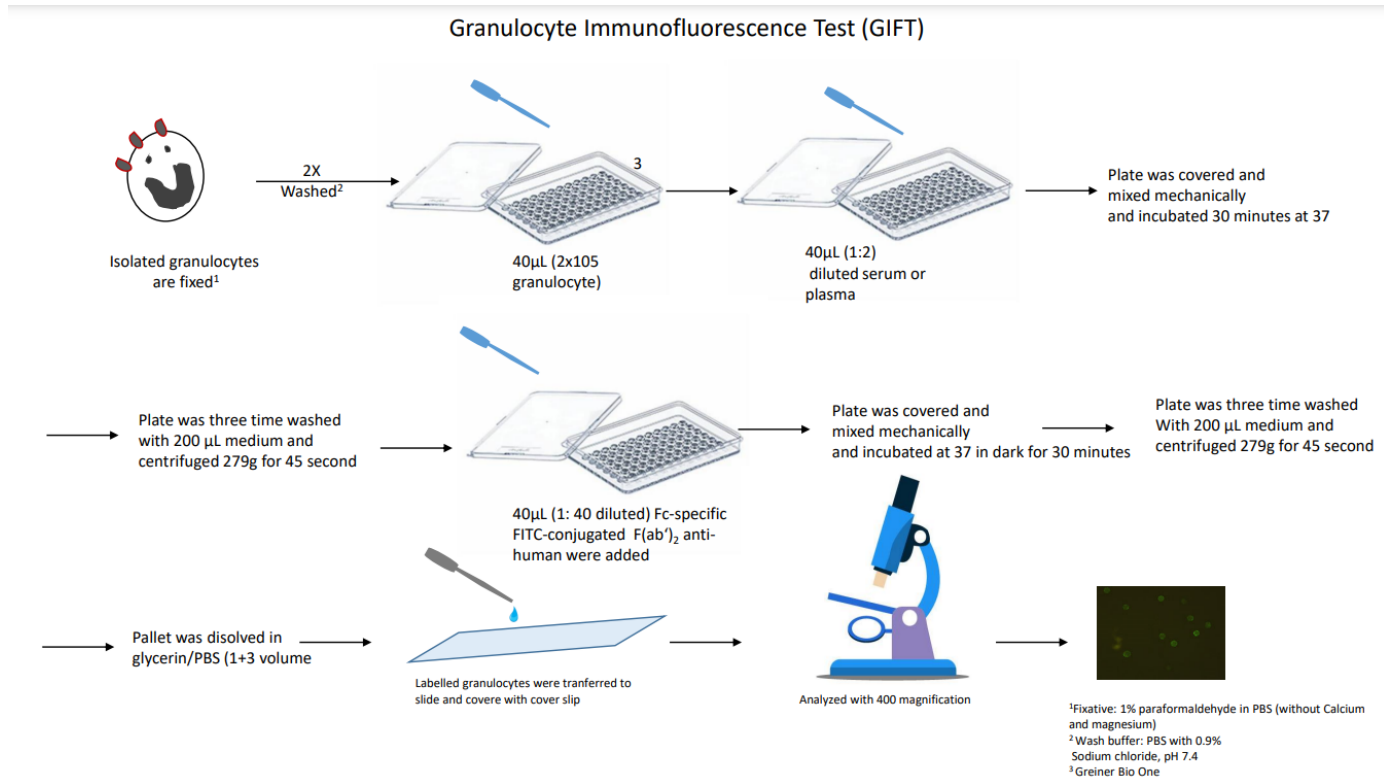


Fig 75 : Mode opératoire de la méthode GIFT

◆ Par cytomètre de flux : (343)

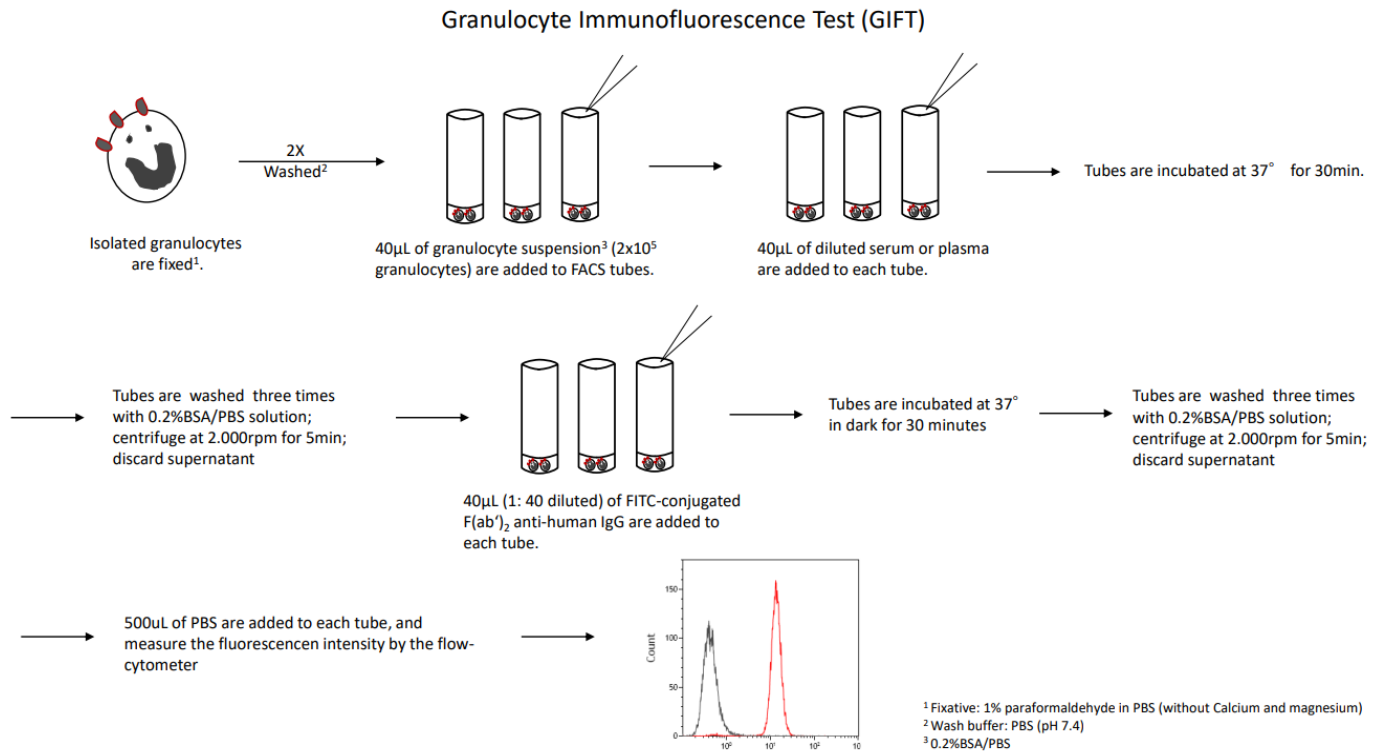


Fig 76 : Mode opératoire de la méthode GIFT

• Le test d'agglutination des granulocytes, GAT :

- 1) 3 ml de sang anticoagulé à l'EDTA, ajouter 1 ml de dextrane à 5 % et 300µl d'EDTA à 5 %.
- 2) Incuber à 37°C pendant 30 minutes.
- 3) Transférer le surnageant sur 2,5 ml de Ficoll-Hypaque puis centrifuger à 310xg pendant 20 min.
- 4) Prélever 1 ml de plasma
- 5) Jeter le surnageant restant
- 6) Ajouter 2 ml de NH₄Cl au culot (Globules rouges + polynucléaires neutrophiles) afin de lyser les globules rouges.
- 7) Incuber à 0°C pendant 5 minutes
- 8) Laver les cellules deux fois dans du PBS (Tampon phosphate salin) et centrifuger pendant 5 minutes à 140xg.

- 9) Remettre en suspension le culot avec du plasma autologue et ajuster la concentration à 5×10^3 cellules/ μl
- 10) Pour éviter l'évaporation pendant l'incubation, pipeter une goutte de paraffine dans chaque puits d'une plaque Terrasaki.
- 11) Effectuer tous les tests en double.
- 12) Pipeter 2 μL de suspension de granulocytes (concentration cellulaire $5 \times 10^3/\mu\text{l}$) par puits
- 13) Ajouter 6 μl de sérum de patient dans chaque puits.
- 14) Incuber pendant 4-6 h à 30 °C et évaluer à l'aide d'un microscope inversé. (342)

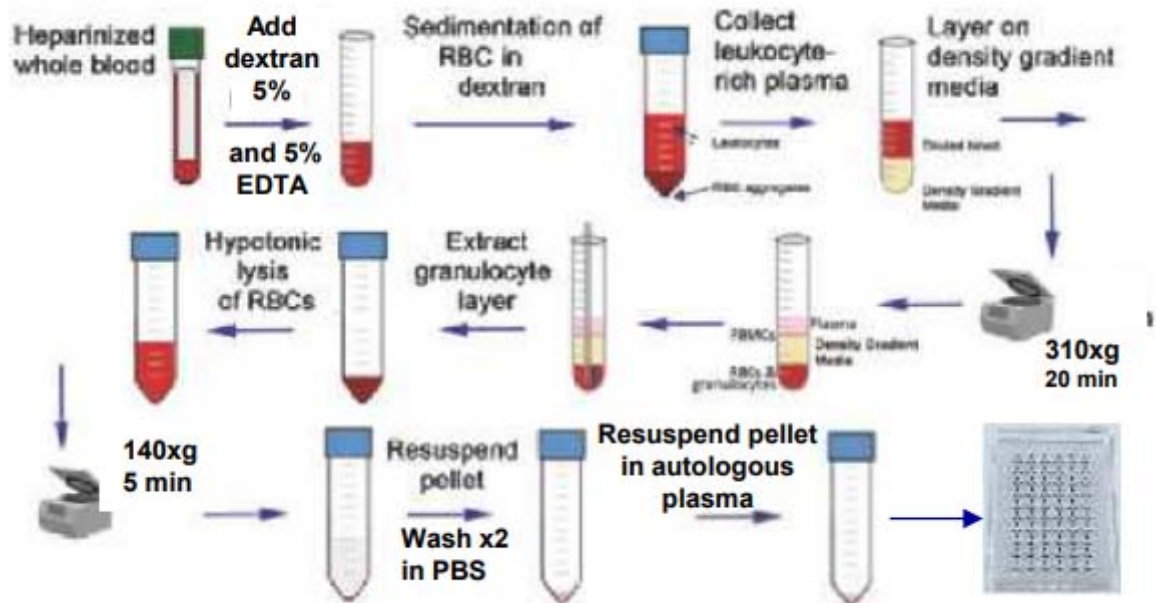


Fig 77: Les étapes du test d'agglutination des granulocytes

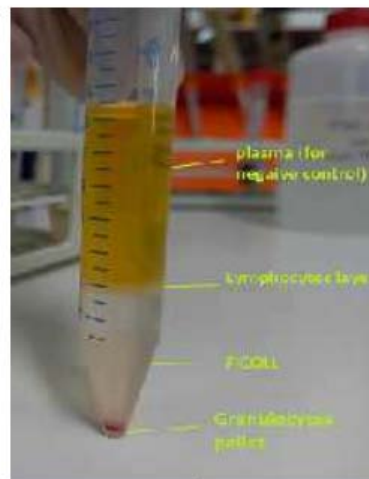


Fig 78: Un puit lors du test d'agglutination des granulocytes

• **Le test Monoclonal Antibody-Specific Immobilization of Granulocyte Antigens, MAIGA:**

- 1) Mélanger 10 ml de sang anticoagulé à l'EDTA et 2,5 ml de dextran à 5 %. Fermer le tube à essai avec un film plastique et incuber pendant 30 minutes à 37 °C à un angle de 45°.
- 2) Transférer délicatement le plasma de dextran (surnageant) sur 2,5 ml de Ficoll dans un nouveau tube à essai et centrifuger pendant 20 min à 310 × g.
- 3) Jeter le surnageant restant et ajouter 2 ml de tampon d'hémolyse au culot.
- 4) Incuber pendant 5 minutes sur de la glace fondante.
- 5) Remplir le tube avec du tampon PBS et centrifuger pendant 5 minutes à 140 × g.
- 6) Jeter le surnageant, remettre en suspension le culot avec du tampon PBS, et répéter le lavage deux fois.
- 7) Jeter le surnageant, remettre en suspension le culot avec 1,5 ml de tampon PBS et ajouter 0,5 ml de solution PFA. Incuber exactement pendant 5 minutes dans l'obscurité.
- 8) Remplir le tube avec du tampon PBS et centrifuger pendant 5 minutes à 140 × g.
- 9) Jeter le surnageant, remettre en suspension le culot avec du tampon PBS, et répéter le lavage deux fois.
- 10) Jeter le surnageant, remettre le culot en suspension avec du tampon PBS, et ajuster la concentration de neutrophiles à 5 000 cellules/ μ L avec du tampon PBS.

11) Enduire les plaques de microtitration de 100 µL d'IgG anti-souris de chèvre (dilution 1:5 000 dans le tampon d'enrobage) dans chaque puits. Couvrir la plaque et incuber pendant au moins 12 h à 2–8 °C. Une heure avant que les plaques ne soient requises le jour du test, jeter la solution d'enrobage et remplir les puits avec 200–300 µL de PBS/0,2 % de BSA pour bloquer la plaque. Incuber pendant 1 h à 2–8 °C. Laver la plaque cinq fois avec du PBS/0,05 % Tween 20 avant utilisation. Sécher la face supérieure de la microplaque entre les lavages en la plaçant sur un tissu absorbant.

12) Pipeter 200 µL de suspension granulocytaire (PFA-fixée, concentration cellulaire $5 \times 10^3/\mu\text{L}$) par puits pour chaque antiserum spécifique HNA dans une microplaque à puits en U, essorer pendant 1 min à $275 \times g$, jeter le surnageant et remettre en suspension avec 100 µL de PBS/0,2 % de BSA.

13) Ajouter 50 µL d'antisérum spécifique HNA aux neutrophiles, mélanger manuellement et incuber pendant 30 minutes à 37 °C.

14) Laver les cellules avec 50 µL de PBS/0,2 % de BSA, et essorer pendant 1 min à $275 \times g$. Jeter le surnageant et remettre en suspension les cellules avec 50 µL de PBS/2 % BSA.

15) Ajouter 10 µL de l'anticorps monoclonal respectif (0,02 mg/ mL) et incuber pendant 30 minutes à 37 °C.

16) Laver les cellules trois fois avec 150 µL de PBS/0,2 % BSA, puis remettre en suspension les culots avec 100 µL de tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéase et les transférer dans des tubes microfuges de 1,5 mL.

17) Lyse : Incuber pendant 30 minutes à 2–8 °C.

18) Pendant ce temps, préparer une autre série de tubes de microcentrifugation. Pour chaque test, aliquotez 180 µL de tampon de lavage Tris/0,2 % BSA dans les tubes et conservez-les à 2–8 °C.

18) Centrifuger les lysats cellulaires à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse ($14\,000 \times g$ environ) pendant 30 min à 4 °C. Pipeter 70 µL du surnageant dans le nouveau tube contenant 180 µL de tampon de lavage Tris /0,2 % BSA.

- 19) Transférer 100 µL de lysat granulocytaire dilué, en double exemplaire, sur la microplaque à puits F pré-enduit et bloqué. Ajouter 100 µL de tampon de lavage Tris 0,2 % BSA dans 2 puits pré-enduit (= blanc réactif). Incuber à 4 °C pendant 90 minutes.
- 20) Laver la plaque cinq fois avec du PBS/0,05 % Tween 20. Sécher la face supérieure de la microplaque entre les lavages en la plaçant sur un tissu absorbant.
- 21) Ajouter 100 µL d'anticorps IgG anti-humains marqués à la peroxydase (1:5 000) à chaque puits et incuber à 4 °C pendant 120 minutes.
- 22) Laver la plaque cinq fois avec du PBS/0,05 % Tween 20. Sécher la face supérieure de la microplaque entre les lavages en la plaçant sur un tissu absorbant.
- 23) Ajouter 100 µL de solution de substrat dans chaque puits et incuber pendant 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
- 24) Arrêter la réaction en ajoutant 100 µL de H₂SO₄ 0,5 M. Lire l'absorbance à 492 nm (pour les lecteurs ELISA à double longueur d'onde, un filtre de référence entre 620 et 650 est approprié) dans l'heure qui suit. (342)

5) Résultats :

5.1 Granulocyte Immunofluorescence Test GIFT :

Des images de fluorescence spécifiques peuvent être associées à certains HNA.

- Une membrane granuleuse assez fine (a) indique la présence d'anticorps HNA-3, HNA-4 et des anticorps HLA de classe I.

- Une fluorescence plus grossière et granuleuse est typique de HNA-1 et HNA-2.

HNA-2 n'est exprimé que sur une proportion des neutrophiles qui peut varier de 5 à près de 100 % et est caractéristique de chaque individu.

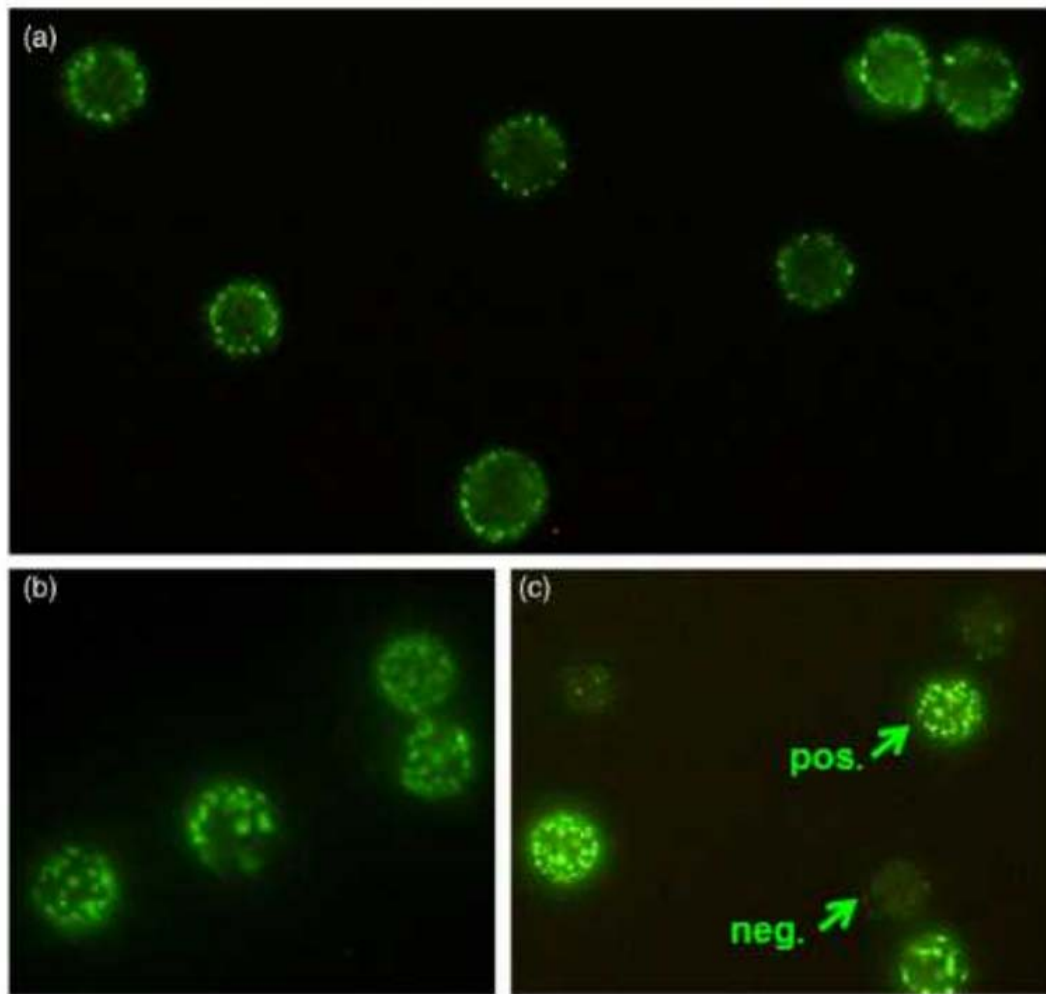


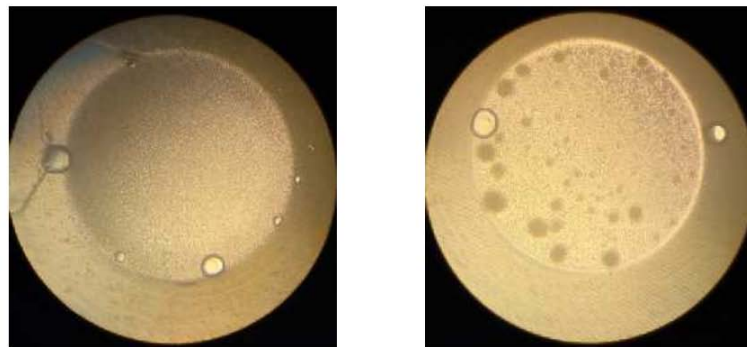
Fig 79 : Résultats du Granulocyte Immunofluorescence Test GIFT

a) : fluorescence fine et granuleuse typique des anticorps de classe HLA I, HNA-3 et HNA-4

b) : La fluorescence grossière et granuleuse typique des anticorps anti-HNA-1 et anti-HNA-2

c) : fluorescence mixte avec des neutrophiles positifs et négatifs à l'HNA-2 (349)

5.2 Granulocyte agglutination test (GAT) :



Granulocyte
aggregates

-

+

Fig 80 : Résultats du Granulocyte agglutination test (GAT)

Le GAT est la méthode de choix pour la détection des anticorps HNA-3a qui présentent une forte capacité d'agrégation, mais aussi HNA-1a, -1b, -1c, HNA-2, HNA-3b et anti HLA de classe II.

En cas de résultat positif, la spécificité de l'anticorps peut être déduite par un personnel expérimenté en fonction du typage de donneur et de la forme des agglutinats. (344)

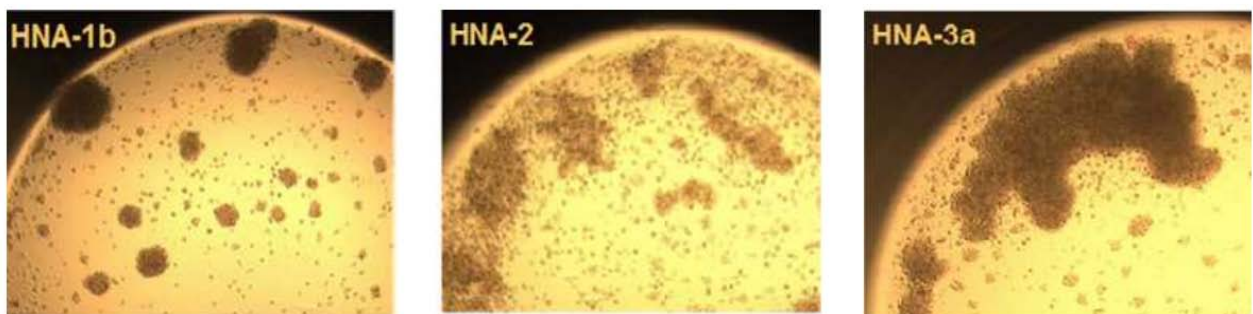
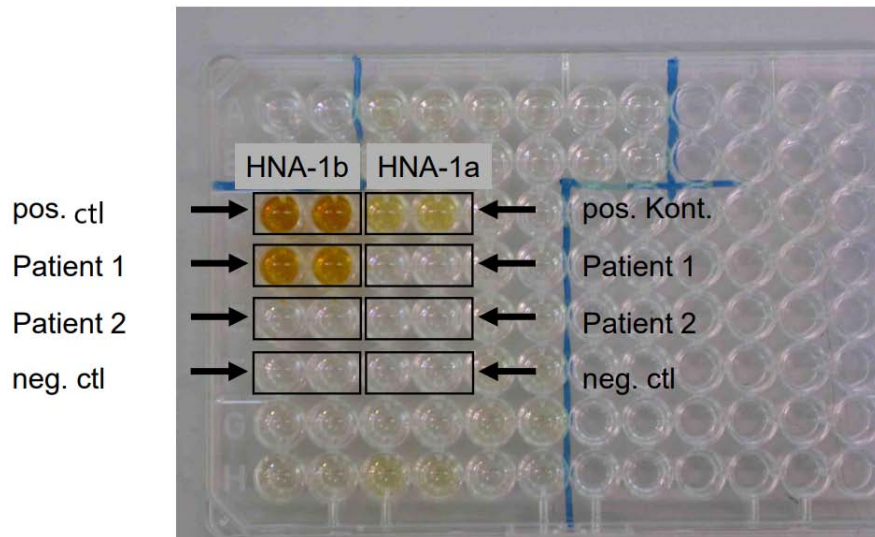


Fig 81 : Résultats du Granulocyte agglutination test (GAT) avec différents type d'anticorps.(344)

5.3 Le test Monoclonal Antibody-Specific Immobilization of Granulocyte Antigens, MAIGA:

Le test Monoclonal Antibody-Specific Immobilization of Granulocyte Antigens est essentiel pour l'identification des auto-anticorps circulants dirigés contre les glycoprotéines (tels que les anti-CD16 et anti-CD177) ainsi que des auto- et allo-anticorps dirigés contre les antigènes des antigènes neutrophiles humains (HNA) sauf HNA-3. (350)



patient 1: anti-HNA-1b; patient 2: negative

fig 82: Résultats du test MAIGA (351)

B – Recherche d'anticorps dirigés contre les plaquettes :

1 – Généralités :

Les anticorps anti-plaquettes peuvent être :

- Des auto-anticorps qui peuvent être présents soit fixés in vivo sur les plaquettes, soit en circulation, et ils ciblent spécifiquement les glycoprotéines de la membrane plaquettaire, principalement GpIIb/IIIa, ainsi que GpIbIX et GpIaIIa.
- Des allo-anticorps circulants qui sont des anticorps spécifiquement dirigés contre les antigènes de groupe plaquettaire (Human Platelet Antigens, HPA). Ces antigènes sont des polymorphismes des mêmes glycoprotéines et de la molécule CD109.

Vingt-neuf systèmes HPA ont été identifiés. Parmi eux, seuls les systèmes HPA-1, HPA-3, HPA-

5, et éventuellement HPA-2 et HPA-15 sont pertinents en termes de transfusion sanguine.

Une personne peut développer une réponse immunitaire contre un antigène étranger lors d'une transfusion sanguine, d'une grossesse ou d'une greffe.

- Des iso-anticorps (qui sont rares), tels que les anticorps circulants anti-GpIIb/IIIa observés dans la maladie de Glanzmann, ou les anticorps anti-CD36 (GpIV) chez des individus présentant un phénotype plaquettaire déficient en CD36. Ces patients peuvent développer une iso-immunisation après une transfusion sanguine ou une grossesse.

Actuellement, plusieurs techniques sont disponibles, mais la méthode considérée comme étant la référence (gold standard) est le MAIPA (Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigens).(352)

Cette fiche présente les techniques directe et indirecte du MAIPA, ainsi que l'interprétation des résultats obtenus avec cette dernière et des méthodes de détection globale.

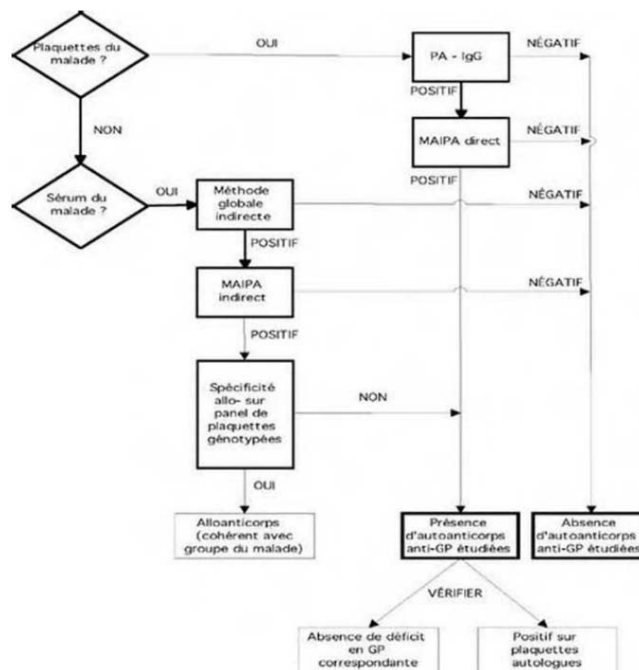


Fig 83 : Stratégie diagnostique. Ce logigramme résume les différentes étapes et les conclusions de la recherche d'autoanticorps antiplaquettes en fonction des prélèvements disponibles. Il est toujours préférable d'évaluer les plaquettes et le sérum du malade conjointement, afin de pouvoir interpréter les résultats correctement.(353)

2 – Indications :

– Détecter et identifier les allo-anticorps circulants dirigés contre les plaquettes dans divers contextes cliniques tels que :

- les thrombopénies foetales/néonatales causées par une allo-immunisation materno-fœtale.
- les cas de réfractaire aux transfusions plaquettaires
- les réactions post-transfusionnelles caractérisées par de la fièvre et des frissons
- les thrombopénies prolongées après une greffe de cellules souches hématopoïétiques, ou encore les suspicions de purpura post-transfusionnel.

– Lors de l'exploration d'une thrombopénie inexplicée chez un adulte ou un enfant, il est nécessaire de rechercher des auto-anticorps spécifiques dirigés contre les plaquettes, qu'ils soient fixés ou circulants.(354)

3 – Matériels :

• Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigens direct:

1. Échantillons de sérum ou de plasma du patient à partir d'un prélèvement sur tube EDTA.
2. Plaquettes sanguines : Les plaquettes sont isolées à partir du sang total du patient ou d'un donneur compatible. Elles servent de substrat pour l'immobilisation des antigènes plaquettaires.
3. Anticorps monoclonaux spécifiques : Ces anticorps sont utilisés pour identifier et détecter les antigènes plaquettaires spécifiques sur les plaquettes immobilisées. Les anticorps monoclonaux peuvent être marqués avec des enzymes, des fluorochromes ou des isotopes radioactifs pour faciliter leur détection ultérieure.
4. Réactifs de lavage et tampons : Ils sont utilisés pour préparer les plaquettes et pour effectuer les différentes étapes de lavage et d'incubation lors du test.
5. Substrat de révélation : Il s'agit d'un réactif chimique ou enzymatique qui, lorsqu'il est ajouté, génère un signal détectable en présence des anticorps spécifiques liés aux antigènes plaquettaires.
6. Plaques de microtitration ou autres supports : Ils sont utilisés pour immobiliser les plaquettes et effectuer les différentes réactions et incubations nécessaires.

• Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigens indirect:

1. Échantillons de sérum ou de plasma du patient à partir d'un prélèvement sur tube EDTA.
2. Plaquettes sanguines : Les plaquettes sont isolées à partir du sang total du patient ou d'un donneur compatible. Elles servent de substrat pour la détection des anticorps circulants.
3. Anticorps monoclonaux spécifiques : Ces anticorps sont utilisés pour détecter la présence des anticorps circulants dans le sérum du patient. Ils peuvent être marqués avec des enzymes, des fluorochromes ou des isotopes radioactifs pour faciliter leur détection ultérieure.
4. Réactifs de lavage et tampons : Ils sont utilisés pour préparer les plaquettes, effectuer les différentes étapes de lavage et d'incubation, ainsi que pour diluer les échantillons de sérum.
5. Réactif secondaire : Il s'agit d'un anticorps marqué qui se lie spécifiquement aux anticorps du patient présent sur les plaquettes immobilisées. Ce réactif permet de détecter la présence des anticorps circulants.
6. Substrat de révélation : Il s'agit d'un réactif chimique ou enzymatique qui, lorsqu'il est ajouté, génère un signal détectable en présence de l'anticorps secondaire lié aux anticorps du patient.
7. Plaques de microtitration ou autres supports : Ils sont utilisés pour immobiliser les plaquettes et effectuer les différentes réactions et incubations nécessaires.

4 – Mode opératoire :

• La technique MAIPA (« monoclonal antibody immobilization platelet antigen») direct :

Étant donné que les principales cibles antigéniques des anticorps antiplaquettaires sont connues et que des anticorps monoclonaux murins dirigés contre ces glycoprotéines sont disponibles, le test de MAIPA permet la capture des principales glycoprotéines plaquettaires ciblées par les anticorps humains. Cela est réalisé en utilisant des anticorps anti-souris adsorbés sur une plaque ELISA, où les anticorps monoclonaux murins se fixent aux glycoprotéines plaquettaires. Les anticorps humains ainsi immobilisés sont détectés en utilisant une antiglobuline conjuguée à une enzyme, selon le principe de l'ELISA.

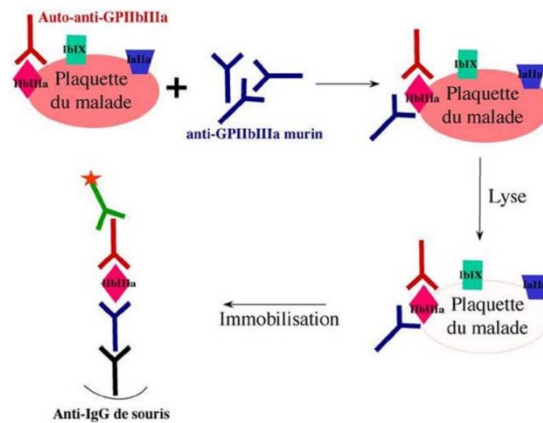


Fig 84 : Test de MAIPA. Identification des cibles antigéniques des anticorps antiplaquettes. Mise en évidence d'un autoanticorps anti-GPIIb/IIIa.

⇒ Les étapes :

Les plaquettes du patient, préalablement lavées, sont incubées avec les anticorps monoclonaux correspondants (environ 10^7 plaquettes par anticorps monoclonal, soit 3×10^7 plaquettes pour une identification classique). Les plaquettes, qui ont déjà été sensibilisées in vivo, sont ensuite lysées, entraînant la désorganisation des structures membranaires et la séparation des glycoprotéines (GP) dans le surnageant après centrifugation. Les complexes immuns tripartites, composés des anticorps du patient, des GP plaquettaires et des anticorps monoclonaux murins, sont immobilisés sur une plaque ELISA à l'aide d'anticorps anti-IgG de souris. Si des anticorps humains sont présents sur les GP, ils seront détectés grâce à une antiglobuline antihumaine conjuguée à une enzyme, la peroxydase, qui réagira avec son substrat, l'orthophénylènediamine (OPD), en présence d'eau oxygénée, produisant ainsi un changement de couleur.

• La technique MAIPA (« monoclonal antibody immobilization platelet antigen ») indirect :

Le test indirect de MAIPA(355) (356) est utilisé pour l'identification des anticorps circulants dirigés contre les glycoprotéines (GP) plaquettaires, en utilisant le même principe d'immunocapture des cibles antigéniques par des anticorps monoclonaux.

⇒ Les étapes :

Dans un premier temps, le sérum à tester est incubé avec des plaquettes témoins, et dans un second temps, les plaquettes sensibilisées et lavées sont incubées avec les anticorps monoclonaux. La suite est identique à la méthode directe, avec lyse des plaquettes et immobilisation sur plaque Elisa (comme mentionné précédemment).

5 – Résultats :

1) Expression la technique MAIPA « monoclonal antibody immobilization platelet antigen» direct :

Les résultats sont exprimés en unités de densité optique (DO). L'échelle des valeurs positives dépend de l'étalonnage propre au laboratoire. À titre d'exemple, un résultat est considéré comme positif quand la DO est supérieure à 0,2, avec un témoin négatif (plaquettes de référence) inférieur à 0,1 et un témoin positif (sérum contenant des anticorps antiplaquettes) supérieur à 1,5 par GP plaquettaire analysée.

2) Expression la technique MAIPA « monoclonal antibody immobilization platelet antigen» indirect :

L'expression des résultats est la même que pour le test MAIPA direct. Le témoin négatif est un sérum de donneur de sang de groupe sanguin AB dans le test MAIPA indirect.

3) Tableau récapitulatifs d'Interprétation des résultats de la technique MAIPA et la méthode de détection globale « Platelet Associated-IgG » [PA-IgG] .

PA-IgG	MAIPA direct	Conclusions
Négatif	nt	Absence d'IgG associées aux plaquettes
Positif +	nt	Élévation des IgG associées aux plaquettes ⁽¹⁾
Pos ++, +++ ou ++++	Négatif	Élévation des IgG associées aux plaquettes ; spécificité anticorps non identifiée
Pos ++, +++ ou ++++	Positif	Présence d'autoanticorps antiplaquettes anti-GPIIbIIIa, IbIX ou IaIIa
Méthode globale indirecte	MAIPA indirect	Conclusions
Négatif	nt	Absence d'anticorps sériques antiplaquettes
Positif	Négatif	Présence d'anticorps sériques réagissant avec les plaquettes autres que anti-IIbIIIa, IbIX et IaIIa ⁽²⁾
Positif	Positif	Présence d'anticorps sériques anti-GP plaquettaires sans préjuger de l'origine auto-immune ⁽³⁾

nt : non testé.

⁽¹⁾ le test de MAIPA direct n'est pas réalisé quand le test de PA-IgGs est positif +, car l'expérience a montré que le MAIPA direct n'identifie pas les anticorps associés aux plaquettes dans ces valeurs, probablement par un manque de sensibilité (ou par un manque de spécificité du test PA-IgGs).

⁽²⁾ ces anticorps peuvent être des anticorps anti-HLA ; à l'heure actuelle, un anticorps monoclonal anti-HLA est utilisé dans le test de MAIPA pour identifier ces anticorps.

⁽³⁾ pour s'assurer de l'origine auto-immune des anticorps identifiés, on peut : incuber le sérum du malade avec les plaquettes du malade si celles-ci sont disponibles en quantité suffisante ; éliminer l'hypothèse des alloanticorps en testant le sérum du malade sur un panel de plaquettes génotypées dans les principaux systèmes allogéniques. Si le sérum ne réagit qu'avec un allèle, vérifier le groupe plaquettaire du malade. Si le malade est homozygote pour l'allèle antithétique, conclure à un alloanticorps ; éliminer l'hypothèse d'isoanticorps en vérifiant que le malade n'est pas déficitaire en la GP cible des anticorps identifiés (exemple des thrombasthénies de Glanzmann avec immunisation anti-GPIIbIIIa).

fig 85 : Tableau récapitulatifs d'interprétation des résultats de la technique MAIPA et la méthode de détection globale « Platelet Associated-IgG » [PA-IgG] (348)



CONCLUSION



En conclusion, ce guide d'analyse biologique en hématologie propose une approche pratique et détaillée pour effectuer différentes analyses dans le domaine d'hématologie biologique. En couvrant des aspects essentiels tels que la cytologie, la cytométrie en flux, tests globaux et facteurs de coagulation et bien d'autres.

Ce guide offre aux étudiants en médecine, aux médecins généralistes et aux résidents une ressource précieuse pour interpréter et diagnostiquer les troubles hématologiques.

Ce guide met en évidence les différentes techniques et méthodes utilisées pour chaque analyse, en soulignant l'importance des réactifs et des équipements appropriés. Il fournit également des informations sur les valeurs normales de référence, les interprétations des résultats anormaux et les implications cliniques associées.

L'objectif principal de ce guide est d'aider à obtenir des résultats précis, fiables et interprétables, ce qui est crucial pour un diagnostic précis et une prise en charge efficace des patients.

Il convient de noter que ce guide est basé sur les connaissances et les pratiques actuelles en hématologie biologique, mais il est important de rester informé des avancées scientifiques et technologiques dans le domaine.

En somme, ce guide d'analyse biologique en hématologie offre une ressource complète et fiable, favorisant ainsi une meilleure compréhension et une interprétation précise des résultats hématologiques.



Recommandations



1. Utilisation responsable : Encouragez les lecteurs à utiliser ce guide de manière responsable et éthique, en veillant à respecter les protocoles et les réglementations en vigueur dans leur pratique professionnelle.
2. Formation continue : Soulignez l'importance de la formation continue pour les professionnels de santé et encouragez les lecteurs à poursuivre leur apprentissage en hématologie. Mettez en avant l'importance de rester à jour avec les dernières avancées et les meilleures pratiques dans le domaine.
3. Adaptation contextuelle : Rappeler aux lecteurs que les recommandations et les protocoles mentionnés dans le guide peuvent varier en fonction du contexte géographique, des ressources disponibles et des pratiques locales. Encouragez-les à tenir compte de ces facteurs lors de l'application des informations fournies.
4. Collaboration interdisciplinaire : Mettez en évidence l'importance de la collaboration interdisciplinaire en hématologie, en particulier entre les laboratoires d'analyses médicales, les médecins spécialistes en hématologie, les infirmiers et les autres professionnels de santé. Encouragez les lecteurs à favoriser cette collaboration pour une prise en charge optimale des patients.
5. Validation des résultats : Soulignez l'importance de la validation appropriée des résultats d'analyses biologiques en hématologie. Encouragez les lecteurs à suivre les bonnes pratiques de contrôle qualité et à s'assurer de la fiabilité des méthodes utilisées.
6. Sensibilisation aux patients : Encouragez les lecteurs à développer des compétences en communication et en éducation des patients. Mettez en avant l'importance d'expliquer aux patients les résultats des analyses de manière compréhensible, de répondre à leurs questions et de les soutenir tout au long de leur parcours de soins.
7. Évaluation et amélioration continue : Soulignez l'importance de l'évaluation régulière et de l'amélioration continue des pratiques d'analyse en hématologie. Encouragez les lecteurs à participer à des audits de qualité, à collecter des données sur les résultats des analyses et à identifier des pistes d'amélioration pour assurer une prestation de soins de qualité.



RESUMES

RESUME

Notre travail a consisté en l'élaboration d'un guide en hématologie destiné aux étudiants en médecine et aux résidents durant leurs parcours .

À travers ce guide, nous essayons d'apporter aux étudiants et aux résidents l'information essentielle en hématologie, qui leur sera utile et bénéfique au cours de leur formation médicale.

Le guide aborde de manière simplifiée le principe, les indications et le matériel, le mode opératoire et les résultats des analyses biologiques en hématologie .

En outre, le guide met l'accent sur les principales analyses de cytologie, cytométrie en flux, groupage sanguin et exploration de l'hémostase.

Il réduit aussi le fossé entre la théorie et la pratique chez les étudiants en médecine et les résidents en mettant des images de matériels de laboratoire et en expliquant le mode de déroulement des analyses biologiques en hématologie.

A la lumière de ce travail, une liste de recommandation a été proposée sous forme d'un guide pour tout praticien afin d'assurer une meilleure compréhension du déroulement et des indications des analyses biologiques en hématologie , devant les différentes situations envisagées lors de la pratique quotidienne, en se basant sur les données de littérature.

ABSTRACT :

Our work has involved the development of a hematology guide for medical students and residents during their training.

Through this guide, we aim to provide students and residents with essential information on hematology, which will be useful and beneficial to them during their medical training. The guide takes a simplified look at the principles, indications and equipment, operating procedures and results of biological analysis in hematology.

In addition, the guide focuses on the main cytology, flow cytometry, blood grouping and hemostasis analyses.

It also bridges the gap between theory and practice for medical students and residents by showing images of laboratory equipment and explaining how biological tests in hematology are carried out.

In the light of this work, a list of recommendations has been proposed in the form of a guide for every practitioner, to ensure a better understanding of the procedure and indications of biological analyses in hematology, in the face of the different situations envisaged in daily practice, based on literature data.

ملخص

تضمن عملنا تطوير دليل لأمراض الدم لطلاب الطب والمقيمين أثناء تدريبهم. من خلال هذا الدليل ، نهدف إلى تزويد الطلاب والمقيمين بالمعلومات الأساسية عن أمراض الدم ، والتي ستكون مفيدة لهم أثناء تدريبهم الطبي. يلقي الدليل نظرة مبسطة على المبادئ والمؤشرات والمعدات وإجراءات التشغيل ونتائج التحليل البيولوجي في أمراض الدم. بالإضافة إلى ذلك ، يركز الدليل على علم الخلايا الرئيسي وقياس التدفق الخلوي وتجميع الدم وتحليلات الإرقاء.

كما أنه يسد الفجوة بين النظرية والتطبيق لطلاب الطب والمقيمين من خلال عرض صور لمعدات المختبرات وشرح كيفية إجراء الاختبارات البيولوجية في أمراض الدم. في ضوء هذا العمل ، تم اقتراح قائمة من التوصيات في شكل دليل لكل ممارس ، لضمان فهم أفضل للإجراء ومؤشرات التحليلات البيولوجية في أمراض الدم ، في مواجهة المواقف المختلفة المتصورة في اليوم. الممارسة ، بناءً على بيانات الأدب.



BIBLIOGRAPHIE

1. Hedy S. Wald et al.

« Professional Identity Formation in Medical Education for Humanistic, Resilient Physicians: Pedagogic Strategies for Bridging Theory to Practice ».

Academic Medicine 90, n° 6 (juin 2015): 753-60

<https://doi.org/10.1097/ACM.0000000000000725>.

2. Stéphane Berthélémy.

« L'hémogramme ou numération-formule sanguine ».

Actualités Pharmaceutiques 53, n° 538 (septembre 2014): 53-55

<https://doi.org/10.1016/j.actpha.2014.06.011>.

3. Barbara J. Bain.

Blood cells: a practical guide.

3rd ed (Oxford ; Malden, MA: Blackwell Science, 2002).

4. P. Cart-Lamy et al.

« [Comparative and simultaneous evaluation of three automated counters in hematology: Coulter STKS, Sysmex NE 8000, Technicon H-2] ».

Annales De Biologie Clinique 51, n° 6 (1993): 627-35.

5. KV Vierordt.

« Zählungen der Blutkörperchen des Menschen ».

s. d., *Arch Physiol Heilkd* 1852;11:327-332.

6. S. M. Lewis.

« Automation in Haematology-Present and Future Trends ».

Pure and Applied Chemistry 54, n° 11 (1 janvier 1982): 2053-58.

<https://doi.org/10.1351/pac198254112053>.

7. M. Masse.

« Measurement of low numbers of leukocytes. How should it be done ».

Leucocyte depletion of blood components. VU University Press, Amsterdam, 1994, 77-86.

8. W. Stibbe, M. Weise, et D. Seidel.

« Automated platelet count in thrombocytopenic patients--a comparison of methods ».

Journal of Clinical Chemistry and Clinical biochemistry. Zeitschrift fur Klinische Chemie und Klinische Biochemie 23, n° 7 (1985): 399-404.

9. Alban Godon et al.

« Automated hematology analysers and spurious counts;Part 3. Haemoglobin, red blood cells, cell count and indices, reticulocytes ».

Annales de biologie clinique 70, n° 2 (mars 2012): 155-68.

<https://doi.org/10.1684/abc.2012.0685>.

10 Faculté de Médecine de Lille.

plateforme d'imagerie cellulaire et tissulaire

<https://bicel.univ-lille.fr/cytometrie-en-flux>

11. Imbert, Michèle & Jouault, Hélène.

Hémogramme : réalisation par un automate. EMC - Biologie Médicale, (2006).

1. 1-10. [10.1016/S2211-9698\(06\)76500-1](https://doi.org/10.1016/S2211-9698(06)76500-1).

12. Berthélémy.

« L'hémogramme ou numération-formule sanguine ».

Doi : 10.1016/j.actpha.2014.06.011

13. B. Bros et al.

« Lecture critique de l'hémogramme: valeurs seuils à reconnaître comme probablement pathologiques et principales variations non pathologiques ».

National Agency of Accreditation and Evaluation of Health (ANAES), 1997.

14. AS Adewoyin et B. Nwogoh.

« PERIPHERAL BLOOD FILM - A REVIEW ».

Annals of Ibadan Postgraduate Medicine 12, n° 2 (décembre 2014): 71-79.

15. Anne Tessier-Marteau et al.

« Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire », *Annales de biologie clinique* 68, n° 4 (juillet 2010): 393-407.

<https://doi.org/10.1684/abc.2010.0451>.

16. Gene Gulati et al.

« Purpose and Criteria for Blood Smear Scan, Blood Smear Examination, and Blood Smear Review ».

Annals of Laboratory Medicine 33, n° 1 (janvier 2013): 1-7.

<https://doi.org/10.3343/alm.2013.33.1.1>.

17. Shamila Fathima S, Packirisamy Meenatchi, et Ayyakkannu Purushothaman.

« Comparison of Manual Versus Automated Data Collection Method for Haematological Parameters »

Biomedical Journal of Scientific & Technical Research 15, n° 3 (1 mars 2019): 11372-76 ,

<https://doi.org/10.26717/BJSTR.2019.15.002702>.

18. Odile Fenneteau et Micheline Maier-Redelsperger.

« Apport de l'examen du frottis de sang pour le diagnostic de la pathologie constitutionnelle du globule rouge »

Revue Française des Laboratoires 2000, n° 324 (2000): 51-62

[https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(00\)80310-8](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(00)80310-8).

19. Françoise Wendling et William Vainchenker.

« La thrombopoïétine : un bilan des essais thérapeutiques »

Hématologie 5, n° 4 (12 octobre 1999): 289-94.

20. Hagop Kantarjian et al.

« The Incidence and Impact of Thrombocytopenia in Myelodysplastic Syndromes », *Cancer* 109, n° 9 (1 mai 2007): 1705-14, <https://doi.org/10.1002/cncr.22602>.

21. Amir A. Qamar et al.

« Incidence, Prevalence, and Clinical Significance of Abnormal Hematologic Indices in Compensated Cirrhosis »

Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association 7, n° 6 (juin 2009): 689-95

<https://doi.org/10.1016/j.cgh.2009.02.021>.

22. Nezam Afdhal et al.

« Thrombocytopenia Associated with Chronic Liver Disease »

Journal of Hepatology 48, n° 6 (juin 2008): 1000-1007

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.03.009>.

23. Danielle M. Townsley et al.

« Pathophysiology and Management of Thrombocytopenia in Bone Marrow Failure: Possible Clinical Applications of TPO Receptor Agonists in Aplastic Anemia and Myelodysplastic Syndromes »

International Journal of Hematology 98, n° 1 (1 juillet 2013): 48-55

<https://doi.org/10.1007/s12185-013-1352-6>.

24. Yasuo Hirayama et al.

« Concentrations of Thrombopoietin in Bone Marrow in Normal Subjects and in Patients With Idiopathic Thrombocytopenic Purpura, Aplastic Anemia, and Essential Thrombocythemia Correlate With Its mRNA Expression of Bone Marrow Stromal Cells »,

Blood 92, n° 1 (1 juillet 1998): 46-52.

https://doi.org/10.1182/blood.V92.1.46.413k44_46_52.

25. M. Cheminant et R. Delarue.

« Prise en charge diagnostique et thérapeutique d'un patient porteur d'une thrombocytose »

La Revue de Médecine Interne 34, n° 8 (2013): 465-71

<https://doi.org/10.1016/j.revmed.2013.02.020>.

26 Ercan Varol.

« Increased Thrombopoietin and Mean Platelet Volume in Patients With Ischemic Stroke »

Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis 19, n° 3 (1 juin 2013): 342-43

<https://doi.org/10.1177/1076029612459677>.

27. Tomoyuki Tahara et al.

« A Sensitive Sandwich ELISA for Measuring Thrombopoietin in Human Serum: Serum Thrombopoietin Levels in Healthy Volunteers and in Patients with Haemopoietic Disorders »

British Journal of Haematology 93, n° 4 (juin 1996): 783-88

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1741.x>.

28. Ercan Varol.

« Increased Thrombopoietin and Mean Platelet Volume in Patients With Ischemic Stroke ».

29 T. Tahara et al.

« A Sensitive Sandwich ELISA for Measuring Thrombopoietin in Human Serum: Serum Thrombopoietin Levels in Healthy Volunteers and in Patients with Haemopoietic Disorders »

British Journal of Haematology 93, n° 4 (juin 1996): 783-88

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1741.x>.

30. Rachel M. Gonzalez et al.

« Development and Validation of Sandwich ELISA Microarrays with Minimal Assay Interference »

Journal of Proteome Research 7, n° 6 (1 juin 2008): 2406-14

<https://doi.org/10.1021/pr700822t>.

31. Mandy Alhadj et Aisha Farhana.

« Enzyme Linked Immunosorbent Assay »

in *StatPearls* (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>.

32. Abhay Singh et al.

« Circulating thrombopoietin levels in normal healthy blood donors and in aplastic anemia patients in relation to disease severity »

Asian Journal of Transfusion Science 9, n° 1 (2015): 70-73

<https://doi.org/10.4103/0973-6247.150956>.

33. Jing GU et al.

« Plasma thrombopoietin levels in patients with aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura »

Chinese Medical Journal 115, n° 07 (juillet 2002): 983-86

<https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2002.07.105>.

34. Edoardo Giannini et al.

« Relationship between Thrombopoietin Serum Levels and Liver Function in Patients with Chronic Liver Disease Related to Hepatitis C Virus Infection »

The American Journal of Gastroenterology 98, n° 11 (1 novembre 2003): 2516-20

[https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(03\)01698-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(03)01698-8).

35. Hui-Chi Hsu et al.

« Circulating Levels of Thrombopoietic and Inflammatory Cytokines in Patients with Acute Myeloblastic Leukemia and Myelodysplastic Syndrome »

Oncology 63, n° 1 (2002): 64-69,

<https://doi.org/10.1159/000065722>.

36. Yoshiyuki Kurata et al.

« Diagnostic Value of Tests for Reticulated Platelets, Plasma Glycocalicin, and Thrombopoietin Levels for Discriminating Between Hyperdestructive and Hypoplastic Thrombocytopenia »

American Journal of Clinical Pathology 115, n° 5 (1 mai 2001): 656-64

<https://doi.org/10.1309/RAW2-OLQW-8YTX-941V>.

37 A. Cerutti et al.

« Thrombopoietin Levels in Patients with Primary and Reactive Thrombocytosis »

British Journal of Haematology 99, n° 2 (novembre 1997): 281-84,

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.3823196.x>.

38. I. Espanol et al.

« Patients with Thrombocytosis Have Normal or Slightly Elevated Thrombopoietin Levels »

Haematologica 84, n° 4 (1 janvier 1999): 312-16, <https://doi.org/10.3324/haem.1999.84.4.312>.

39. Marie-Christine Béné et al.

Guide des analyses en hématologie (Elsevier Health Sciences, 2018).

40. Mousa A. Al-Abbadi.

« Basics of cytology », *Avicenna Journal of Medicine* 1, n° 1 (2011): 18-28

<https://doi.org/10.4103/2231-0770.83719>.

41. Béné et al.

Guide des analyses en hématologie.

42. Safae EL MSARYB.

Apport du myélogramme dans le diagnostic des hémopathies malignes Expérience du service de l'hématologie de l'hôpital militaire Avicenne Marrakech. Faculté de médecine et de pharmacie de Marrakech ; 2020. 118

43. A. Charpentier.

« Myélogramme normal chez l'adulte »

EMC - Biologie médicale 7, n° 1 (mars 2012): 1-12

[https://doi.org/10.1016/S2211-9698\(12\)56837-8](https://doi.org/10.1016/S2211-9698(12)56837-8).

44. René Caquet

250 examens de laboratoire, 12e éd (Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson, 2015).

45. René Caquet.

250 examens de laboratoire, 12e éd (Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson, 2015).

46. Stefani Parmentier et al.

« Reevaluation of Reference Values for Bone Marrow Differential Counts in 236 Healthy Bone Marrow Donors »

Annals of Hematology 99, n° 12 (1 décembre 2020): 2723-29

<https://doi.org/10.1007/s00277-020-04255-4>.

47. Maylis Telle-Lamberton Khadim Ndiaye.

« Hémopathies malignes : évolutions et comparaisons en France et en Île-de-France », s. d.

48. Mary-Elizabeth Percival et al.

« Bone marrow evaluation for diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia »

Blood reviews 31, n° 4 (juillet 2017): 185-92

<https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.01.003>.

49. Kandice Kottke-Marchant et Bruce Davis.

Laboratory hematology practice (John Wiley & Sons, 2012).

50. Joaquín Madrenas, Paul Potter, et Ewa Cairns.

« Giving Credit Where Credit Is Due: John Hunter and the Discovery of Erythrocyte Sedimentation Rate »

Lancet (London, England) 366, n° 9503 (17 décembre 2005): 2140-41

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67337-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67337-0).

51. A. Hay-Lombardie.

« La vitesse de sédimentation est-elle obsolète »

Correspondances en Onco-Hématologie, 2020, 142-44.

52. C. M. Wise et al.

« Temporal Arteritis with Low Erythrocyte Sedimentation Rate: A Review of Five Cases »

Arthritis and Rheumatism 34, n° 12 (décembre 1991): 1571-74,

<https://doi.org/10.1002/art.1780341215>.

53. B. W. Goodman, « Temporal Arteritis », *The American Journal of Medicine* 67, n° 5 (novembre 1979): 839-52, [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(79\)90744-7](https://doi.org/10.1016/0002-9343(79)90744-7).

54. C. Saadeh.

« The Erythrocyte Sedimentation Rate: Old and New Clinical Applications »
Southern Medical Journal 91, n° 3 (mars 1998): 220-25.

55. H. C. Sox et M. H. Liang.

« The Erythrocyte Sedimentation Rate. Guidelines for Rational Use »,
Annals of Internal Medicine 104, n° 4 (avril 1986): 515-23
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-104-4-515>.

56 B. Ljungberg, K. Grankvist, et T. Rasmuson.

« Serum Acute Phase Reactants and Prognosis in Renal Cell Carcinoma »
Cancer 76, n° 8 (15 octobre 1995): 1435-39,
[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19951015\)76:8<1435::aid-cnrc2820760821>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19951015)76:8<1435::aid-cnrc2820760821>3.0.co;2-y).

57 M. Henry-Amar et al.

« Erythrocyte Sedimentation Rate Predicts Early Relapse and Survival in Early-Stage Hodgkin Disease. The EORTC Lymphoma Cooperative Group »
Annals of Internal Medicine 114, n° 5 (1 mars 1991): 361-65,
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-114-5-361>.

58. M. L. Brigden

« Iron Deficiency Anemia. Every Case Is Instructive »
Postgraduate Medicine 93, n° 4 (mars 1993): 181-82, 185-92
<https://doi.org/10.1080/00325481.1993.11701645>.

59. D. L. Witte et al.

« Predicting Bone Marrow Iron Stores in Anemic Patients in a Community Hospital Using Ferritin and Erythrocyte Sedimentation Rate »
American Journal of Clinical Pathology 90, n° 1 (juillet 1988): 85-87
<https://doi.org/10.1093/ajcp/90.1.85>.

60 Saadeh.

« The Erythrocyte Sedimentation Rate ».

61 Sox et Liang.

« The Erythrocyte Sedimentation Rate. Guidelines for Rational Use ».

62. E. M. Smith et S. Samadian.

« Use of the Erythrocyte Sedimentation Rate in the Elderly »
British Journal of Hospital Medicine 51, n° 8 (20 mai 1994): 394-97.

63. J. Stuart et J. T. Whicher.

« Tests for Detecting and Monitoring the Acute Phase Response »
Archives of Disease in Childhood 63, n° 2 (février 1988): 115-17
<https://doi.org/10.1136/adc.63.2.115>.

64. A. K. Miettinen et al.

« Test Performance of Erythrocyte Sedimentation Rate and C-Reactive Protein in Assessing the Severity of Acute Pelvic Inflammatory Disease »
American Journal of Obstetrics and Gynecology 169, n° 5 (novembre 1993): 1143-49,
[https://doi.org/10.1016/0002-9378\(93\)90271-j](https://doi.org/10.1016/0002-9378(93)90271-j).

65 B. Thorén et A. Wigren.

« Erythrocyte Sedimentation Rate in Infection of Total Hip Replacements »

Orthopedics 14, n° 4 (avril 1991): 495-97

<https://doi.org/10.3928/0147-7447-19910401-15>.

66 Smith et Samadian.

« Use of the Erythrocyte Sedimentation Rate in the Elderly ».

67. M. E. Tinetti, A. Schmidt, et J. Baum.

« Use of the Erythrocyte Sedimentation Rate in Chronically Ill, Elderly Patients with a Decline in Health Status »

The American Journal of Medicine 80, n° 5 (mai 1986): 844-48,

[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(86\)90626-1](https://doi.org/10.1016/0002-9343(86)90626-1).

68. HEMC, Hospital Equipment Manufacturing Company.

<https://www.hemcmedical.com/product/esr-stand-westergren-s-s/>

69. Christopher Bray et al.

« Erythrocyte Sedimentation Rate and C-Reactive Protein Measurements and Their Relevance in Clinical Medicine »,

WMJ: Official Publication of the State Medical Society of Wisconsin 115, n° 6 (décembre 2016): 317-21.

70. Saadeh.

« The Erythrocyte Sedimentation Rate ».

71. M. L. Brigden.

« Clinical Utility of the Erythrocyte Sedimentation Rate »,

American Family Physician 60, n° 5 (1 octobre 1999): 1443-50.

72. The McGill Physiology Virtual Lab.

Blood Laboratory, "Erythrocyte sedimentation rate (ESR)".

<https://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/bloodlab/ESR.htm>

73. Brigden, « Clinical Utility of the Erythrocyte Sedimentation Rate ».

« Clinical Utility of the Erythrocyte Sedimentation Rate »

American Family Physician 60, n° 5 (1 octobre 1999): 1443-50.

74. L. E. Böttiger et C. A. Svedberg.

« Normal Erythrocyte Sedimentation Rate and Age »

British Medical Journal 2, n° 5544 (8 avril 1967): 85-87

<https://doi.org/10.1136/bmj.2.5544.85>.

75. M. R. Al-Marri et M. B. Kirkpatrick.

« Erythrocyte Sedimentation Rate in Childhood Tuberculosis: Is It Still Worthwhile? »

The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease 4, n° 3 (mars 2000): 237-39.

76. Vanessa Alende-Castro et al.

« Factors Influencing Erythrocyte Sedimentation Rate in Adults: New Evidence for an Old Test »

Medicine 98, n° 34 (août 2019): e16816

<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016816>.

77. BAL C., Karakulak U., Gunduzoz M., Ercan M., Tutkun E., Yilmaz O. H.

« Evaluation of Subclinical Inflammation with Neutrophil Lymphocyte Ratio In Heavy Metal Exposure », *Annals of Clinical and Analytical Medicine* 07, n° 05 (2016)
<https://doi.org/10.4328/JCAM.4393>.

78. M. Brigden.

« The Erythrocyte Sedimentation Rate. Still a Helpful Test When Used Judiciously », *Postgraduate Medicine* 103, n° 5 (mai 1998): 257-62, 272 -74,
<https://doi.org/10.3810/pgm.1998.05.493>.

79. T. Dönmez et al.

, « Erythrocyte Sedimentation Rates in Patients with Renal Cell Carcinoma », *European Urology* 21 Suppl 1 (1992): 51-52, <https://doi.org/10.1159/000474890>.

80. R. Roseff et al.

« The Acute Phase Response in Gout », *The Journal of Rheumatology* 14, n° 5 (octobre 1987): 974-77.

81. Howard S An et J Alex Seldomridge.

« Spinal Infections: Diagnostic Tests and Imaging Studies », *Clinical Orthopaedics & Related Research* 444 (mars 2006): 27-33, <https://doi.org/10.1097/01.b b.0000203452.36522.97>.

82. Ari K. Miettinen et al.

« Test Performance of Erythrocyte Sedimentation Rate and C-Reactive Protein in Assessing the Severity of Acute Pelvic Inflammatory Disease »
American Journal of Obstetrics and Gynecology 169, n° 5 (novembre 1993): 1143-49
[https://doi.org/10.1016/0002-9378\(93\)90271-J](https://doi.org/10.1016/0002-9378(93)90271-J).

83. K. Sharma et al.

« Blood Viscosity Parameter Correlation with Types of Leukemia »
Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR 24, n° 2 (1992): 159-64.

84. Constantinos Koshiaris et al.

« Early Detection of Multiple Myeloma in Primary Care Using Blood Tests: A Case-Control Study in Primary Care »
The British Journal of General Practice: The Journal of the Royal College of General Practitioners 68, n° 674 (septembre 2018): e586-93
<https://doi.org/10.3399/bjgp18X698357>.

85. R. F. Gillum, M. E. Mussolino, et D. M. Makuc.

« Erythrocyte Sedimentation Rate and Coronary Heart Disease: The NHANES I Epidemiologic Follow-up Study »
Journal of Clinical Epidemiology 48, n° 3 (mars 1995): 353-61
[https://doi.org/10.1016/0895-4356\(94\)00156-k](https://doi.org/10.1016/0895-4356(94)00156-k).

86. R. M. Hopstaken et al.

« Contributions of Symptoms, Signs, Erythrocyte Sedimentation Rate, and C-Reactive Protein to a Diagnosis of Pneumonia in Acute Lower Respiratory Tract Infection »
The British Journal of General Practice: The Journal of the Royal College of General Practitioners 53, n° 490 (mai 2003): 358-64.

87. E. Suresh.

« Diagnosis of Early Rheumatoid Arthritis: What the Non-Specialist Needs to Know »

Journal of the Royal Society of Medicine 97, n° 9 (septembre 2004): 421-24 ,

<https://doi.org/10.1177/014107680409700903>.

88. W Fowler.

« The Erythrocyte Sedimentation Rate in Syphilis. », *Sexually Transmitted Infections* 52, n° 5 (1 octobre 1976): 309-12

<https://doi.org/10.1136/sti.52.5.309>.

89. H. L. Haber et al.

« The Erythrocyte Sedimentation Rate in Congestive Heart Failure »

The New England Journal of Medicine 324, n° 6 (7 février 1991): 353-58

<https://doi.org/10.1056/NEJM199102073240601>.

90. S. K. Ballas.

« The Sick Cell Painful Crisis in Adults: Phases and Objective Signs »

Hemoglobin 19, n° 6 (1995): 323-33

<https://doi.org/10.3109/03630269509005824>.

91. N. O. Akinola et al.

« Rheological Changes in the Prodromal and Established Phases of Sick Cell Vaso-Occlusive Crisis »

British Journal of Haematology 81, n° 4 (août 1992): 598-602

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1992.tb02998.x>.

92. C. Lawrence et M. E. Fabry.

« Erythrocyte Sedimentation Rate during Steady State and Painful Crisis in Sick Cell Anemia »

The American Journal of Medicine 81, n° 5 (novembre 1986): 801-8

[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(86\)90349-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(86)90349-9).

93. CRAIG, Fiona E. et FOON, Kenneth A.

Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2008, vol. 111, no 8, p. 3941-3967.

94. HÉLÈNE MERLE-BÉRAL et MAGALI LE GARFF-TAVERNIER.

« Cytométrie en flux: principes et applications cliniques », s. d.

95. MCCOY, J. Philip.

Basic principles of flow cytometry. *Hematology/Oncology Clinics*, 2002, vol. 16, no 2, p. 229-243.

96 Biowest.

<https://biowest.net/fr/solutions-salines/pbs-solution-saline-tamponnee-au-phosphate/>

97. Gwatkin.

« Practical Flow Cytometry, by H.M. Shapiro, Wiley-Liss, New York, 3rd Ed, 1994, 542 Pp».

98. SHAPIRO, Howard M.

Cell Measurement: Flow Cytometry. First Principles. Alice Longobardi Givan. Wiley-Liss, New York, 1992. xiv, 202 pp., illus. Paper, \$34.95. *Science*, 1993, vol. 260, no 5113, p. 1533-1533..

99. Ormerod mg.

“flow cytometry” 2nd edition new york: springer-verlag; 1999.

100. Radbruch A

"Flow cytometry and cell sorting" 2nd edition Berlin : Springer-Verlag; 1999.

101. Lauren Rigollet.

Immunophénotypage : technique et applications en biologie, département cytologie et immunophénotypage.

Biomnis. Focus 43.

102. . Chabannon Christian.

"Joyeux anniversaire, CD34 !" médecine/sciences, Volume 21 Numéro 5, 05/2005, p 503-506

103. Anne F. Eder, Haewon C. Kim.

Chapter 30 - Therapeutic Cytapheresis, "Handbook of Pediatric Transfusion Medicine", Academic Press, 2004, Pages 353-364, ISBN 9780123487766, <https://doi.org/10.1016/B978-012348776-6/50033-9>.

104. O. Hequet.

« Les différentes modalités de prélèvement des cellules souches hématopoïétiques », Transfusion Clinique et Biologique, Volume 18, Issue 2, 2011, Pages 230-234, <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2011.01.003>.

105. LATAILLADE, Jean-Jacques, PIERRE-LOUIS, Olivier, HASSELBALCH, Hans Carl, et al.

Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2008, vol. 112, no 8, p. 3026-3035

106. MURUGESAN, Mohandoss, NAIR, Chandran K., NAYANAR, Sangeetha K., et al.

Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem cells: A comparison between single-versus dual-platform methodology using the International Society of Hematotherapy and Graft Engineering protocol.

Asian Journal of Transfusion Science, 2019, vol. 13, no 1, p. 43.

107. FRITSCH, Gerhard, PRINTZ, Dieter, STIMPFL, Margit, et al.

Quantification of CD34+ cells: comparison of methods.

Transfusion, 1997, vol. 37, no 8, p. 775-784.

108. EXBIO Antibodies

<https://www.exbio.cz/clinical-products/hematology/kits/cd34-quantiflowex-kit>.

109. LEMOS, Natália Emerim, FARIAS, Mariela Granero, KUBASKI, Francyne, et al.

Quantification of peripheral blood CD34+ cells prior to stem cell harvesting by leukapheresis: a single center experience. *Hematology, transfusion and cell therapy*, 2018, vol. 40, p. 213-218.

110. H. ELLEUCH.

Centre Régional du Transfusion sanguine. J.I. M. Sfax Vol.1 N°5/6 ;. Dec03/Mars 04 : 1-7

111. LOSCHI, Michaël, DE LATOUR, Régis Peffault, et SOCIÉ, Gérard.

L'hémoglobininurie paroxystique nocturne. *Hématologie*, 2013, vol. 19, no 5, p. 319-330.

112. Borowitz MJ, Craig FE, Diguseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, Wittwer CT, Richards SJ. Clinical Cytometry Society. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010 Jul;78(4):211-30. doi: 10.1002/cyto.b.20525. PMID: 20533382.

113 Béné et al.,

Guide des analyses en hématologie.

114 Béné et al.

Guide des analyses en hématologie

115 Peffault de Latour R., Socié G.

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne. *Encyclopédie Orphanet.* Avril 2007

116 Crissman, H. A. and Hirons, G. T.

(1994) Staining of DNA in live and fixed cells. *Meth. Cell Biol.* 41, 196–209.

117 Darzynkiewicz, Z., Gong, J., Juan, G., Ardelt, B., and Traganos, F.

(1996) Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry* 25, 1–13.

118 Endl, E., Hollmann, C., and Gerdes, J.

(2001) Antibodies against the Ki-67 protein: assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis. *Meth. Cell Biol.* 63, 399–418.

119 . Larsen , J. K., Landberg, G., and Roos, G.

(2001) Detection of proliferating cell nuclear antigen. *Meth. Cell Biol.* 63, 419–431.

120 Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., and Kimmel, M.

(1987) Assay of cell cycle kinetics by multivariate flow cytometry using the principle of stathmokinosis. In: *Techniques in Cell Cycle Analysis* (Gray, J. W. and Darzynkiewicz, Z., eds). Humana, Totowa, NJ: pp. 291–336.

121 Poot, M., Silber, J. R., and Rabinovitch, P. S.

(2002) A novel flow cytometric technique for drug cytotoxicity gives results comparable to colony-forming assays.

Cytometry 48, 1–5.

122 Dolbeare, F. and Selden, J. L.

(1994) Immunochemical quantitation of bromodeoxyuridine: application to cell kinetics. *Meth. Cell Biol.* 41, 298–316.

123 Terry, N. H. A. and White, R. A.

(2001) Cell cycle kinetics estimated by analysis of bromodeoxyuridine incorporation. *Meth. Cell Biol.* 63, 355–374.

124 POZAROWSKI, Piotr et DARZYNKIEWICZ, Zbigniew.

Analysis of cell cycle by flow cytometry.

Checkpoint Controls and Cancer: Volume 2: Activation and Regulation Protocols, 2004, p. 301-311.

125 JAYAT, Chantal et RATINAUD, Marie-Hélène.

Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications.

Biology of the Cell, 1993, vol. 78, no 1-2, p. 15-25.

126 NAIR, Anusree et MANOHAR, Sonal M.

A flow cytometric journey into cell cycle analysis.
Bioanalysis, 2021, vol. 13, no 21, p. 1627-1644.

127 Béné et al.

, *Guide des analyses en hématologie*.

128 BASSAN, C. et CHARPENTIER, A.

Test de Kleihauer par technique cytochimique.
EMC-Biol Médicale, 2014, vol. 9, p. 1-8.

129 Hillyer, Christopher D. Westhoff, Connie M.

American Association of Blood Banks. Technical Manual. 18th ed. Bethesda, Md: AABB Press; 2014, Chapter 19: Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia, section 19.2.2: Indications for RhIG Administration.

130 GIRIDHARAN, Jeevaraj, PRAMILA, R., et SARADA, V.

Importance of Von Kleihauer Betke Test Assay in Estimating Fetomaternal Hemorrhage. 2020.

131 Woodfield, G., Davis, K., Francis, A.

(2002). Guidelines for laboratory assessment of fetomaternal haemorrhage, 1st ed. Sidney: ANZBT.

132 Mollison, P.L., Engelfriet, C.P., Contreras, M.

(2005). Blood Transfusion in clinical medicine, 11 Ed, 498- 545.

133 Conte, R., Tassi, C., Malferrari, F., Giannotti, G. A., Barbieri, P., Donzelli, C., & Londero, D.

(1999). Valutazione comparativa fra ID-FMH DiaMed e il test di eluizione acida di KleihauerBetke. Studio multicentrico. *Trasfusione del Sangue*, 44(3), 141-146.

134 Leonova, J. Y., Kazanetz, E. G., Smetanina, N. S., Adekile, A. D., Efremov, G. D., & Huisman, T. H.

(1996). Variability in the fetal hemoglobin level of the normal adult. *American journal of hematology*, 53(2), 59-65.

135 HUGUET-JACQUOT, S., TOLY-NDOUR, C., DELABY, H., et al.

Test de Kleihauer. *Revue de Biologie Médicale/N*, 2022, vol. 365, no 1.

136 Khalid Usman.

« Osmotic Fragility of Erythrocytes: Reference Range, Interpretation, Collection and Panels », 30 septembre 2020, Medscape

137 LOUSTAU, Valentine, GUILLAUD, Constance, GARCON, Loïc, et al.

Anémie hémolytique chez l'adulte: principales causes et démarche diagnostique. *La Presse Médicale*, 2011, vol. 40, no 5, p. 470-485.

138 Lewis SM, Bain BJ, Bates I.

Dacie and Lewis Practical Haematology. 12th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2017. Chapter 12 :Investigation of the Hereditary Haemolytic Anaemias: Membrane and Enzyme Abnormalities, p: 229

139 Julie-Anne Rouvière.

Diagnostic de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux. *Sciences pharmaceutiques*. 2008. fhal-01738976f page 60

140 Cyril Truchard.

Synthèse sur les pathologies du globule rouge destinée à la médecine générale : travail préparatoire en vue de l'élaboration de fiches synthétiques par pathologie. Médecine humaine et pathologie. 2022. ffdumas-03853260f

141 OREN FINKELSTEIN, Arie Eric.

Conception et évaluation d'un nouvel outil de diagnostic utilisant l'Ektacytométrie à gradient osmolaire. 2017. Thèse de doctorat. Paris Est.

142 Lydie Da Costa et al.

« Hereditary Spherocytosis, Elliptocytosis, and Other Red Cell Membrane Disorders », *Blood Reviews* 27, n° 4 (1 juillet 2013): 167-78, <https://doi.org/10.1016/j.blre.2013.04.003>.

143. Da Costa L, Suner L, Galimand J, Bonnel A, Pascreau T, Couque N, Fenneteau O, Mohandas N.

Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer, French Society of Hematology (SFH).

144 Clark MR, Mohandas N, Shohet SB.

Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. *Blood.* 1983; 61:899-910.

145 E. Llaudet-Planas et al.

« Osmotic Gradient Ektacytometry: A Valuable Screening Test for Hereditary Spherocytosis and Other Red Blood Cell Membrane Disorders », *International Journal of Laboratory Hematology* 40, n° 1 (2018): 94-102, <https://doi.org/10.1111/ijh.12746>.

146 Cincinnati children's

rubrique erythrocyte diagnostique lab

<https://www.cincinnatichildrens.org/service/c/cancer-blood/hcp/clinical-laboratories/erythrocyte-diagnostic-lab/ektacytometry>

147 Erslev AJ.

Erythropoietin. *N Engl J Med* 1991; 324: 1339-44

148 Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, Nagao M, Sasaki R.

Tissue regulation of erythropoietin in the murine kidney, brain and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: 1242-8

149 KLEIN, E., GEORGES, A., BROSSAUD, J., et al.

Erythropoietin: indications and measurement. In : *Annales de Biologie Clinique.* 2009. p. 505-515.

150 Karine de Bosredon et al.

, « Érythropoïétine : comparaison de trois trousse de dosage », *Revue Française des Laboratoires* 2001, n° 333 (1 mai 2001): 53-55, [https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(01\)80165-7](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(01)80165-7).

151 Georges Elhomsy.

« Erythropoietin: Reference Range, Interpretation, Collection and Panels », 3 avril 2021, Medscape.

152 Bishnu Prasad Devkota.

« Ferritin: Reference Range, Interpretation, Collection and Panels », 18 mars 2022, <https://emedicine.medscape.com/article/2085454-overview>.

153 Sonia Bouri et John Martin.

« Investigation of iron deficiency anaemia », *Clinical Medicine* 18, n° 3 (juin 2018): 242-44, <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-3-242>.

154 Mark Worwood et James D. Cook.

« Serum Ferritin », *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 10, n° 2 (janvier 1979): 171-204, <https://doi.org/10.3109/10408367909147133>.

155 A. Jacobs et al.

« Ferritin in the Serum of Normal Subjects and Patients with Iron Deficiency and Iron Overload », *BMJ* 4, n° 5834 (28 octobre 1972): 206-8, <https://doi.org/10.1136/bmj.4.5834.206>.

156 Mohammad Rasel et Sohail K. Mahboobi.

« Transfusion Iron Overload », in *StatPearls* (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562146/>.

157 FAUTREL, Bruno, LE MOËL, GISÈLE, SAINT-MARCOUX, BERNADETTE, et al.

Diagnostic value of ferritin and glycosylated ferritin in adult onset Still's disease. *The Journal of rheumatology*, 2001, vol. 28, no 2, p. 322-329.

158 A. Pradalier et al.

« Syndrome d'activation macrophagique (syndrome d'hémophagocytose) » *Pathologie Biologie* 52, n° 7 (septembre 2004): 407-14, <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2003.12.001>.

159 J.-S. Allain et al.

« Une anémie microcytaire sidéroblastique carencielle traitée efficacement par de la vitamine B6 »

La Revue de Médecine Interne 40, n° 7 (juillet 2019): 462-66, <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2019.05.009>.

160 D. T. Dexter et al.

« ALTERATIONS IN THE LEVELS OF IRON, FERRITIN AND OTHER TRACE METALS IN PARKINSON'S DISEASE AND OTHER NEURODEGENERATIVE DISEASES AFFECTING THE BASAL GANGLIA », *Brain* 114, n° 4 (1991): 1953-60, <https://doi.org/10.1093/brain/114.4.1953>.

161 John Burn et Patrick F. Chinnery.

« Neuroferritinopathy », *Seminars in Pediatric Neurology* 13, n° 3 (septembre 2006): 176-81, <https://doi.org/10.1016/j.spen.2006.08.006>.

162 Ali Pourmoghaddas et al.

« The Relation between Body Iron Store and Ferritin, and Coronary Artery Disease », *ARYA Atherosclerosis* 10, n° 1 (janvier 2014): 32-36.

163 REVENANT, M. C., CHARLIER, Corinne, PLOMTEUX, Guy, et al.

La ferritine sérique dans les tumeurs solides. Résultats comparatifs à partir de quatre trousseaux du commerce. *ISB*, 1990, vol. 16, no 5.

164 Béné et al.

Guide des analyses en hématologie.

165 Pagana KD, Pagana TJ, Pagana TN.

Mosby's Diagnostic & Laboratory Test Reference. 14th ed. St. Louis, Mo: Elsevier; 2019.

166 Williamson MA, Snyder LM, Wallach JB.

Wallach's interpretation of diagnostic tests. 9th ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia; 2011.

167 Rapport HAS 2011.

« Choix des examens du métabolisme du fer en cas de suspicion de carence en fer ». www.has.fr.

168 D.B. Kell, E. Pretorius.

Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells, *Metallomics* 6 (4) (2014) 748–773.

169 CROWNOVER, Brian K. et COVEY, Carlton.

Hereditary hemochromatosis. *American family physician*, 2013, vol. 87, no 3, p. 183-190.

170 IRON PANEL OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY.

Revised recommendations for the measurements of the serum iron in human blood. *British Journal of Haematology*, 1990, vol. 75, no 4, p. 615-616.

171 Bothwell TH, Charlton RW, Cook JD, et al.

Iron metabolism in man. Oxford: Blackwell Scientific; 1979.

172 Béné et al.

Guide des analyses en hématologie.

173 Shalini Paruthi.

« Transferrin Saturation: Reference Range, Interpretation, Collection and Panels », 9 mars 2022, <https://emedicine.medscape.com/article/2087960-overview#a2>.

174 Gomella LG HS.

Laboratory Diagnosis: Chemistry, Immunology, Serology. Gomella LG HS, ed. Clinician's Pocket Reference: The Scut Monkey. 11 ed. New York: McGraw-Hill; 2007.

175 Williamson MA, Snyder LM, Wallach JB.

Wallach's interpretation of diagnostic tests. 9th ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia; 2011.

176 Beutler E.

Disorders of Iron Metabolism. Prchal JT KK, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U, ed. Williams Hematology. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2010.

177 Andrew P. Levy et al.

« Haptoglobin: Basic and Clinical Aspects », *Antioxidants & Redox Signaling* 12, n° 2 (15 janvier 2010): 293-304, <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2793>.

178 Shilpi Gupta et al.

« Clinical Usefulness of Haptoglobin Levels to Evaluate Hemolysis in Recently Transfused Patients », *Advances in Hematology* 2011 (26 juin 2011): e389854, <https://doi.org/10.1155/2011/389854>.

179 W. Barcellini et B. Fattizzo.

« Clinical Applications of Hemolytic Markers in the Differential Diagnosis and Management of Hemolytic Anemia », *Disease Markers* 2015 (27 décembre 2015): e635670, <https://doi.org/10.1155/2015/635670>.

180 Cory Wilczynski.

« Haptoglobin: Reference Range, Interpretation, Collection and Panels », 29 avril 2021, <https://emedicine.medscape.com/article/2085592-overview#a1>.

181 Wallach, J. B.

(2005). Interpretation of diagnostic tests. (8 ed., p. 422). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

182 McClatchey, K. D.

(2002). The Plasma Proteins. *Clinical laboratory medicine*. (2nd ed., p. 272). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

183 ZOU, Jie, HUANG, Shuodan, XI, Hui, et al.

Application of an optimized interpretation model in capillary hemoglobin electrophoresis for newborn thalassemia screening. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2022, vol. 44, no 1, p. 223-228.

184. Kim Smith-Whitley et Alexis A. Thompson.

« Indications and Complications of Transfusions in Sickle Cell Disease », *Pediatric Blood & Cancer* 59, n° 2 (2012): 358-64, <https://doi.org/10.1002/pbc.24179>.

185 Henny H. Billett.

« Hemoglobin and Hematocrit », in *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, éd. par H. Kenneth Walker, W. Dallas Hall, et J. Willis Hurst, 3rd éd. (Boston: Butterworths, 1990), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK259/>.

186 Barbara J. Wild et Barbara J. Bain.

« 14 - Investigation of Variant Haemoglobins and Thalassaemias », page 292 in *Dacie and Lewis Practical Haematology (Twelfth Edition)*, éd. par Barbara J. Bain, Imelda Bates, et Michael A. Laffan (Elsevier, 2017), 282-311, <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6696-2.00014-X>.

187 ClarkeGM et Higgins T.

Laboratory Investigation of hemoglobinopathies and thalasseмииs: review and update. *ClinChem*, 46: 1284-90 (2000)

188 Bishnu Prasad Devkota.

« Hemoglobin Electrophoresis: Reference Range, Interpretation, Collection and Panels », 18 mars 2022, <https://emedicine.medscape.com/article/2085637-overview#a2>.

189 . F.Kaddari, K Moradkhani.

Hémoglobinopathie du phénotype à la génétique de 44 colloque national des biologistes des hôpitaux.

22-23 septembre 2015 Nantes

190 RAJAOFERA Thierry.

INTERET DU TEST DE FALCIFORMATION D'EMMEL POUR LE DEPISTAGE DE LA DREPANOCYTOSE A MADAGASCAR, UNIVERSITE D'ANTANANARIVO FACULTE DE MEDECINE, page 12, 2010

191 Carrell RW.

The hemoglobinopathies: methods of determining hemoglobin instability (unstable hemoglobins). *Methods in Haematol* 1986;15:109-24.

192 Carrell RW, Kay R.

A simple method for the detection of unstable haemoglobins. *Br J Haematol* 1972;23:615-9.

193 John Old et al.

« HAEMATOLOGICAL METHODS », in *Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders: Volume 2: Laboratory Protocols [Internet]. 2nd Edition* (Thalassaemia International Federation, 2012), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190583/>.

194 R. W. Carrell

« Hemoglobin Stability Tests », *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 5, n° 1 (janvier 1974): 62-69, <https://doi.org/10.3109/10408367409107629>.

195 Couque N. De Montalembert M.

Diagnostic d'une hémoglobinopathie. *Feuillets de Biologie* 2013; LIV(311):5-17.

196 Béné et al.

Guide des analyses en hématologie.

197 Bcncsch. R. and Benesch, R. H.

The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 26: 162-167 (1967).

198 Benesch, R. and Benesch, R. H.

Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by hemoglobin. *Nature, Lond.* 221: 618-622 (1969).

199 Benesch, R.; Benesch, R. H and Yu, C.

Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. *Biochemistry, N. Y.* 59: 526-532 (1968).

200 Lenfant, C.; Torrance, .1.; English, E.; Finch, C. A.; Reynafarje, C.; Ramos, J.. and Faura, J.

Effect of altitude on oxygen binding by hemoglobin and on organic phosphate levels. *J. clin. Invest.* 47: 2652-2656 (1968).

201 Joseph Barcroft et Mario Camis.

« The dissociation curve of blood », *The Journal of Physiology* 39, n° 2 (26 août 1909): 118-42.

202 Zongtang Chu et al.

« The P50 value detected by the oxygenation-dissociation analyser and blood gas analyser », *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 48, n° 1 (1 janvier 2020): 867-74, <https://doi.org/10.1080/21691401.2020.1770272>.

203 Corentin Orvain et al.

« Diagnostic approach to hemoglobins with high oxygen affinity: experience from France and Belgium and review of the literature », *Annales de biologie clinique* 75, n° 1 (janvier 2017): 39-51, <https://doi.org/10.1684/abc.2016.1204>.

204 : Orvain C, Joly P, Pissard S, Badiou S, Badens C, Bonello-Palot N, Couque N, Gulbis B, Aguilar-Martinez P.

Évaluation de la démarche diagnostique des hémoglobines hyperaffines : expérience franco-belge et revue de la littérature. *Ann Biol Clin* 2017 ; 75(1) : 39-51 doi:10.1684/abc.2016.1204

205 Derek L Vanhille et al.

« Best Practices for Use of the HEMOX Analyzer in the Clinical Laboratory: Quality Control Determination and Choice of Anticoagulant », *Laboratory Hematology* 18, n° 3 (1 septembre 2012): 17-19, <https://doi.org/10.1532/h96.12001>.

- 206 GUARNONE, Roberta, CENTENARA, Esther, et BAROSI, Giovanni.**
TCS Scientific's Hemox Analyzer.
- 207 Karen L. Wood,** Mesure des échanges gazeux, "oxygénation, courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine" le manuel msd 2022
- 208 HOOLEY, Julia. The oxyhemoglobin dissociation curve.**
Am Nurse Today, 2015, vol. 10, p. 18-22.
- 209 Souza CF, Schwartz IV, Giugliani R. Triagem**
neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2002;7:129-37.
- 210 Brasil. Ministério da Saúde.**
Secretaria de Assistência à Saúde. Manual de normas técnicas e rotinas operacionais do programa nacional de triagem neonatal. Série A. Normas e manuais técnicos. 2nd ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
- 211 Leão LL, Aguiar MJ.**
Triagem neonatal: o que os pediatras deveriam saber. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84:80-90.
- 212 BACHIR, Dora.**
La drépanocytose. *Revue française des laboratoires*, 2000, vol. 2000, no 324, p. 29-35.
- 213 René Caquet.**
2010. 250 examens de laboratoire Prescription et interprétation. Edition Masson, Belgique, 384 p.
- 214 Samuel Amintas.**
Étude de stabilité des marqueurs du dépistage néonatal sur tâche de sang séché sur papier buvard. Sciences pharmaceutiques. 2018. ffdumas-01876510f
- 215 Raffaella Colombatti et al.**
« Results of a Multicenter Universal Newborn Screening Program for Sickle Cell Disease in Italy: A Call to Action », *Pediatric Blood & Cancer* 66, n° 5 (mai 2019): e27657,
<https://doi.org/10.1002/pbc.27657>.
- 216 Gilles Renom et al.**
« Potential of the Sebia Capillarys® Neonat Fast Automated System for Neonatal Screening of Sickle Cell Disease », *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 47, n° 11 (1 novembre 2009): 1423-32, <https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.315>.
- 217 David Cheillan.**
« Les principaux outils biologiques appliqués au dépistage néonatal - État des lieux et perspectives d'avenir », *médecine/sciences* 37, n° 5 (1 mai 2021): 461-67 ,
<https://doi.org/10.1051/medsci/2021062>.
- 218 Béné et al**
Guide des analyses en hématologie.
- 219 Sherilyn Alvaran Tuazon.**
« Prothrombin Time: Reference Range, Interpretation, Collection and Panels », 11 août 2021, Medscape
- 220 Caquet. 250 examens de laboratoire.**

221 HAFIAN, Hilal, FURON, Vincent, et MAUPRIVEZ, Cédric.

Orientation diagnostique devant les anomalies du temps de saignement, du temps de céphaline activé, du temps de Quick et de l'international normalized ratio. *Médecine Buccale Chirurgie Buccale*, 2003, vol. 9, no 3, p. 185-190.

222 B. Kemkes-Matthes et al.

« [Hemorrhagic disorders] », *Der Internist* 53, no 7 (juillet 2012): 833-42; qu iz843, <https://doi.org/10.1007/s00108-012-3034-5>.

223 LEVY, Jerrold H., SZLAM, Fania, WOLBERG, Alisa S., et al.

Clinical use of the activated partial thromboplastin time and prothrombin time for screening: a review of the literature and current guidelines for testing. *Clinics in Laboratory Medicine*, 2014, vol. 34, no 3, p. 453-477.

224 Steven Kitchen et Francis Eric Preston.

« Standardization of Prothrombin Time for Laboratory Control of Oral Anticoagulant Therapy », *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 25, n° 1 (février 1999): 17-25, <https://doi.org/10.1055/s-2007-996419>.

225 J K Limdi et G M Hyde.

« Evaluation of Abnormal Liver Function Tests », *Postgraduate Medical Journal* 79, n° 932 (1 juin 2003): 307-12, <https://doi.org/10.1136/pm.j79.932.307>.

226 P Sié.

« Que faire face au risque hémorragique des hypovitaminoses K et des traitements par les antivitamines K ? », *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 17 (1 janvier 1998): 14s-17s, [https://doi.org/10.1016/S0750-7658\(98\)80100-7](https://doi.org/10.1016/S0750-7658(98)80100-7).

227 M Levi et al.

« Guidelines for the Diagnosis and Management of Disseminated Intravascular Coagulation », *British Journal of Haematology* 145, n° 1 (2009): 24-33, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07600.x>.

228 Michael A. Laffan, Richard A. Manning.

18 - Investigation of Haemostasis, Editor(s): Barbara J. Bain, Imelda Bates, Michael A. Laffan, Dacie and Lewis Practical Haematology (Twelfth Edition), Elsevier, 2017, Page 381, ISBN 9780702066962, <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6696-2.00018-7>.

229 Sophie Yavordios.

« Les nouveaux anticoagulants oraux directs : rôle du laboratoire d'hémostase », *Revue Francophone des Laboratoires*, Hémostase, 2014, n° 463 (1 juin 2014): 37-51, [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(14\)72523-7](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(14)72523-7).

230 Meyer Michel Samama et al.

« Assessment of Laboratory Assays to Measure Rivaroxaban – an Oral, Direct Factor Xa Inhibitor », *Thrombosis and Haemostasis* 103, n° 4 (2010): 815-20, <https://doi.org/10.1160/TH09-03-0176>.

231 Varnika Rai et al.

« Haemostatic Profile of Patients with Chronic Liver Disease- its Correlation with Severity and Outcome », *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR* 11, n° 8 (août 2017): EC24-26, <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/24975.10451>.

232 ETIM, E. A., AKPOTUZOR, J. O., COLLINS, A. O., et al.

Evaluation of Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time among Patients with Obstructive Jaundice in Federal Medical Center Yola, Nigeria. *Int J Med Biomed Res*, 2017, vol. 6, no 3, p. 136-141.

233 G. V. Ramesh Prasad et al.

« Vitamin K Deficiency with Hemorrhage after Kidney and Combined Kidney–Pancreas Transplantation », *American Journal of Kidney Diseases* 33, n° 5 (1 mai 1999): 963-65, [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(99\)70433-6](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(99)70433-6).

234 N. Lerolle, D. Borgel, et J. -L. Diehl.

« Approche critique des critères diagnostiques de coagulation intravasculaire disséminée », *Réanimation* 17, n° 4 (1 juin 2008): 348-54, <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2008.03.014>.

235 F. Bonhomme et al.

« Déficits rares de la coagulation et gestes invasifs », *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 32, n° 3 (1 mars 2013): 198-205 <https://doi.org/10.1016/j.annfar.2013.01.019>.

236 Mikhail Roshal, Morayma Reyes Gil.

Chapter 129 - Activated Partial Thromboplastin Time, *Transfusion Medicine and Hemostasis (Third Edition)*, Elsevier, 2019, Pages 779-781, ISBN 9780128137260, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813726-0.00129-X>.

237 CHAKOUR, M., MESSAOUDI, N., TAGAJDID, M., et al.

Conduite à tenir devant un syndrome hémorragique. *Maroc Médical*, 2008, vol. 30, no 2.

238 Anthony L. Suchman.

« How Well Does the Activated Partial Thromboplastin Time Predict Postoperative Hemorrhage? », *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 256, n° 6 (8 août 1986): 750, <https://doi.org/10.1001/jama.1986.03380060076029>.

239 Denis Massignon.

« Surveillance biologique des malades sous héparine ou sous fondaparinux », *Revue Francophone des Laboratoires*, Hémostase, 2014, n° 463 (1 juin 2014): 29-35, [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(14\)72522-5](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(14)72522-5).

240 Michael A. Laffan, Richard A. Manning,

18 - Investigation of Haemostasis, Editor(s): Barbara J. Bain, Imelda Bates, Michael A. Laffan, Dacie and Lewis Practical Haematology (Twelfth Edition), Elsevier, 2017, Page 382, ISBN 9780702066962, <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6696-2.00018-7>.

241 C. Frere A. Henneuse.

« Fibrinogène », Vol 11, Num 1, pp 1-7 EMC- *Biologie médicale*, 2016,
[http://dx.doi.org/10.1016/S2211-9698\(15\)69407-9](http://dx.doi.org/10.1016/S2211-9698(15)69407-9).

242 Mikhail Roshal et Morayma Reyes Gil

« Chapter 133 - Thrombin Time and Fibrinogen Evaluation », in *Transfusion Medicine and Hemostasis (Third Edition)*, éd. par Beth H. Shaz, Christopher D. Hillyer, et Morayma Reyes Gil (Elsevier, 2019), 793-98, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813726-0.00133-1>.

243 Béné et al.

Guide des analyses en hématologie.

244 C. Emile, M.M. Samama

chapitre IV : « exploration d'un syndrome hémorragique » page 88 Le Cahier BIOFORMA N° 20, Hémostase et thrombose, 2000 , ISSN 978-2-294-70481-9, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-2-294-70481-9.50026-9>

245 M. W. Oswald, H. H. Hunt, et J. Lazarchick.

« Normal Range of Plasma Fibrinogen », *The American Journal of Medical Technology* 49, n° 1 (1 janvier 1983): 57-59.

246 Caquet.

"fibrinogène" p 143-144

250 examens de laboratoire.

247 Bezeaud A, Guillin MC.

Physiologie de la coagulation.

EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Hématologie, 13-019-A-20 2001:7p

248 Aillaud M-F.

Facteur II : prothrombine. EMC - Biol Médicale. 2012 Mar;7(1):1-4.

249 Bezeaud A, Guillin MC.

Exploration de la coagulation. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Hématologie, 13-019-A-25 2001:3p

250 Bezeaud A, Vidaud D, Guillin MC.

Les déficits constitutionnels en prothrombine et les informations qu'ils peuvent nous apporter sur la structure et les fonctions de la prothrombine. *Hématologie* 2005;11:397-407

251 Denninger MH, Huisse MG.

Affections hémorragiques par anomalie congénitale ou acquise de la coagulation (en dehors de l'hémophilie et de la maladie de Willebrand). EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). Hématologie, 13-021-C-10, 1997:12p.

252 Bezeaud A, Guillin MC.

Physiologie de la coagulation. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Hématologie, 13-019-A-20, 2001: 7p.

253 Mann KG, Kalafatis M.

Factor V a combination of Dr Jekyll et Mr Hyde. *Blood* 2003;101:20-30.

254 Segers K, Dahlbäck B, Nicolaes GAF.

Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. *Thromb Haemost* 2007;98:530-42.

255 Béné et al.

Guide des analyses en hématologie.

256 Aillaud M-F.

Facteur V : Proaccélélerine. EMC Biologie médicale 2012;7(1):1-4 Doi : 10.1016/S2211-9698(12)56851-2

257 Bezeaud A, Guillin MC.

Exploration de la coagulation. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). Hématologie, 13-019-A-25, 2001:3p

258 Denninger MH, Huisse MG.

Affections hémorragiques par anomalie congénitale ou acquise de la coagulation (en dehors de l'hémophilie et de la maladie de Willebrand). EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). Hématologie, 13-021-C-10, 1997:12p.

259 Bezeaud A, Guillin MC.

Physiologie de la coagulation. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Hématologie, 13-019-A-20, 2001:7p.

260 Aillaud M-F.

Facteur VII : proconvertine. EMC Biologie médicale 2012;7(1):1-4 Doi : 10.1016/S2211-9698(12)56852-4

261 Bezeaud A, Guillin MC.

Exploration de la coagulation. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). Hématologie, 13-019-A-25, 2001: 3p.

262 Denninger MH, Huisse MG.

Affections hémorragiques par anomalie congénitale ou acquise de la coagulation (en dehors de l'hémophilie et de la maladie de Willebrand). EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). Hématologie, 13-021-C-10, 1997: 12p

263 Giansily-Blaizot M, Schved JF.

Les déficits constitutionnels en facteur VII. Hematologie 2000;6:266–71.

264 Giansily-Blaizot M.

Déficit constitutionnel en facteur VII. Encyclopédie Orphanet, 2003.

265 Giansily-Blaizot M, Schved JF.

Potential predictors of bleeding risk in inherited factor VII deficiency. Clinical, biological and molecular criteria. Thromb Haemost 2005;94:901–6.

266 Bezeaud A, Guillin MC.

Physiologie de la coagulation. In: Hématologie. Paris: Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS; 2001. p. 1–7. Encycl Méd Chir, 13-019-A-20.

267 Béné et al.,

Guide des analyses en hématologie.

268 Aillaud MF.

Facteur X : Stuart. EMC - Biologie médicale 2006;1(1):1-4 [Article 90-20-0055]. DOI:10.1016/S2211-9698(06)76159-3

269 Bezeaud A, Guillin MC.

Exploration de la coagulation. In: Hématologie. Paris: Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS; 2001. p. 1–3. Encycl Méd Chir, 13-019-A-25.

270 Goudemand J.

Hémophilies. In: Hématologie. Paris: Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS; 1997. p. 1–18. Encycl Méd Chir, 13-021-B-10.

271 : Aillaud MF.

Facteur VIII : antihémophilique A. EMC - Biologie médicale 2006;1(1):1-4 [Article 90-20-0045]
DOI:10.1016/S2211-9698(06)76157-X

272 Béné et al.,

Guide des analyses en hématologie.

273 Schved JF.

Les variables préanalytiques en hémostase. Sang Thromb Vaiss 1998;10(n °spécial):1–40, et membres du GEHT.

274 Bezeaud A, Guillin MC.

Exploration de la coagulation. In: Hématologie. Paris: Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS; 2001. p. 1–3. Encycl Méd Chir, 13-019-A-25.

275 Goudemand J.

Hémophilies. In: Hématologie. Paris: Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS; 1997. p. 1–18. Encycl Méd Chir, 13-021-B-10.

276 Bezeaud A, Guillin MC.

Physiologie de la coagulation. In: Hématologie. Paris: Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS; 2001. p. 1–7. Encycl Méd Chir, 13-019-A-20

277 Béné et al.

Guide des analyses en hématologie.

278 Bezeaud A, Guillin MC.

Exploration de la coagulation. In: Hématologie. Paris: Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS; 2001. p. 1–3. Encycl Méd Chir, 13-019-A-25.

279 Aillaud MF.

Facteur IX : antihémophilique B. EMC - Biologie médicale 2006;1(1):1-3 [Article 90-20-0050].
DOI : 10.1016/S2211-9698(06)76158-1

280 Schved JF.

Les variables préanalytiques en hémostase. Sang Thromb Vaiss 1998;10(n °spécial):1–40, et membres du GEHT.

281 Goudemand J.

Hémophilies. In: Hématologie. Paris: Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS; 1997. p. 1–18. Encycl Méd Chir, 13-021-B-10.

282 Gilles Pernod, Marie-Elisabeth Briquel.

Déficits en facteur XI : aspects théoriques et pratiques. Sang Thrombose Vaisseaux. 2001;13(3):94-101.

283 Béné et al.

Guide des analyses en hématologie.

284 Aillaud M.-F.

Facteur XI : plasma thromboplastin antécédent (PTA) ou facteur Rosenthal. EMC - Biologie médicale 2006;1(1):1-3 [Article 90-20-0060].

285 Schved JF.

Les variables préanalytiques en hémostase. Sang Thromb Vaiss 1998;10(n °spécial):1-40, et membres du GEHT.

286 Bezeaud A, Guillin MC.

Exploration de la coagulation. In: Hématologie. Paris: Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS; 2001. p. 1-3. Encycl Méd Chir, 13-019-A-25.

287 Denninger MH, Huisse MG.

Affections hémorragiques par anomalie congénitale ou acquise de la coagulation (en dehors de l'hémophilie et de la maladie de Willebrand). In: Hématologie. Paris: Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS; 1997. p. 1-12. Encycl Méd Chir, 13-021-C-10.

288 DIAGNOSTIC, ET DE SOINS PNDS. PROTOCOLE NATIONAL DE DIAGNOSTIC ET DE SOINS (PNDS) DEFICITS RARES EN PROTEINES DE LA COAGULATION, HAS-SANTE.FR

289 Béné et al.,

Guide des analyses en hématologie.

290 Aillaud MF.

Facteur XII : Hageman. EMC - Biologie médicale 2006;1(1):1-3 [Article 90-20-0065].

DOI : 10.1016/S2211-9698(06)76161-1

291 Bezeaud A, Guillin MC.

Exploration de la coagulation. In: Hématologie. Paris: Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS; 2001. p. 1-3. Encycl Méd Chir, 13-019-A-25.

292 Denninger MH, Huisse MG.

Affections hémorragiques par anomalie congénitale ou acquise de la coagulation (en dehors de l'hémophilie et de la maladie de Willebrand). In: Hématologie. Paris: Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS; 1997. p. 1-12. Encycl Méd Chir, 13-021-C-10.

293 SKALLI Sara.

Le bilan immuno-hématologique pré-transfusionnel.

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, 2018.Thèse:N°:347. P:24.

294 Biomnis –

PRÉCIS DE BIOPATHOLOGIE ANALYSES MÉDICALES SPÉCIALISÉES « GROUPE ABO RHESUS », 2012

295 Béné et al.,

Guide des analyses en hématologie.

296. Chantal Muller.

Chapitre 1 – Groupes sanguins

« Détermination des groupes sanguins du système ABO », Livret 4 d'activités technologiques.

Immuno-hématologie, 2012, P : 13

297 Chantal Muller.

Chapitre 1 – Groupes sanguins

« Détermination des groupes sanguins du système ABO », Livret 4 d'activités technologiques. Immuno-hématologie, 2012, P : 14

298 Chantal Muller.

Chapitre 1 – Groupes sanguins

« Groupage Rhésus standard », Livret 4 d'activités technologiques. Immuno-hématologie, 2012, P : 24 - 26

299 M. AIT AMEUR, Khouloud Mezzat .

« Les Examens immunohématologiques au centre de transfusion sanguine: Expérience de l'Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech » faculté de médecine et de pharmacie, Marrakech, 2020, p 29

300 Dean L.

Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. Chapter 8, The Kell blood group.

301 "Transfusions de globules rouges homologues : produits indications, alternatives"

haute autorité de santé , 2014 has-santé.fr

302 L Mannessier.

Suivi de l'allo-immunisation fœto-maternelle, Transfusion Clinique et Biologique, Volume 10, Issue 3, **2003**, Pages 258-262, ISSN 1246-7820, [https://doi.org/10.1016/S1246-7820\(03\)00054-5](https://doi.org/10.1016/S1246-7820(03)00054-5).

303 Stéphan Cohen-Bacrie, Patrick Joubaud, Claire Krausé, Pascal Morel.

La recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI) : un examen au cœur de la réforme de la biologie médicale, Revue Francophone des Laboratoires, Volume 2014, Issue 467, 2014, Pages 37-44, ISSN 1773-035X, [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(14\)72747-9](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(14)72747-9).

304 M. AIT AMEUR, Khouloud Mezzat .

« Les Examens immunohématologiques au centre de transfusion sanguine: Expérience de l'Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech » faculté de médecine et de pharmacie, Marrakech, 2020, p 39-41

305 FERRERA, Virginie et ROUBINET, Francis.

Phénotype étendu. *Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques*, 2011, p. 59.

306 Muller Chantall.

Phénotype étendu. Livret 4 d'activités technologiques. Immuno-hématologie, 2012. P: 41.

307 Guide de Bonne Exécution des Analyses.

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

308 Recommandation Afssaps.

Transfusion de globules rouges homologues, août 2002.

309 Lefrère JJ, Schved JF.

La transfusion en hématologie. Paris: John Libbey Eurotext, 2010.

310 Arrêté du 15 mai 2018 fixant les conditions de réalisation des examens de biologie médicale d'immuno-hématologie érythrocytaire.

Journal officiel, 2018 15 Mai.

311 Jacques C, Francis R, Pascal B.

Phénotype étendu. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext; 2011. 343 p. P: 60.

312 M. AIT AMEUR, Khouloud Mezzat.

« Les Examens immunohématologiques au centre de transfusion sanguine: Expérience de l'Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech » faculté de médecine et de pharmacie, Marrakech, 2020, p 64-65

313 EL KHABOUS Saida.

La prévalence des phénotypes des systèmes ABO, RH et KELL chez 10000 donneurs au CTS HMIM-5 Rabat (Maroc). Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, 2018.Thèse:N°:06. P:20

314 Caquet.

250 examens de laboratoire « Recherche d'anticorps irréguliers antiérythrocytaires, recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) » page 313

315 Docteur Mahdi.TAZEROUT

MANUEL D'AIDE A LA FORMATION EN TRANSFUSION SANGUINE Direction Régionale des Affaires Sanitaires et Sociales Midi-Pyrénées

316 Leblanc R-M.

Les examens d'immuno-hématologie de la femme enceinte. Option/Bio, 2016; 27:553–554. P:21-26

317 MIQUEL E., CAVALIER B., BONNEAU J.C., ROUGER P.

Incompatibilité foeto-maternelles érythrocytaires : de la surveillance immuno-hématologique des femmes enceintes à la maladie hémolytique du nouveau-né. Transfus. Clin. Biol., 2005;12:45–55.

318 Muller Chantall.

La recherche des agglutinines irrégulières. Livret 4 d'activités technologiques. Immuno-hématologie, 2012. P: 66.

319 Muller Chantall.

Ag érythrocytaires. Livret 4 d'activités technologiques. Immuno-hématologie, 2012. P: 67.

320 LOUKIL, T., AMOR, IBEN, MNIF, H., et al.

TITRAGE DE L'ANTICORPS ANTI-RH1 CHEZ LA FEMME ENCEINTE: COMPARAISON DE DEUX TECHNIQUES TITRATION OF ANTI-RH1 ANTIBODY IN PREGNANCY: COMPARISON OF TWO METHODS.

321 Cécile TOLY-NDOUR1 , Jenny BEAUD1 .

« Score des titrages anti-D (RH1) et anti-c (RH4) en carte-gel sur l'automate IH-500 (Bio-Rad®) : corrélation avec les résultats du dosage pondéral »

322 C. TOLY-NDOUR1*, S. HUGUET-JACQUOT1, H. DELABY

« Quantification des anticorps anti-érythrocytaires chez la femme enceinte » Revue de Biologie Médicale/N° 347 - MARS 2019.

323 Brossard Y, Gosset M.

Dosage pondéral des anticorps IgG anti-D. Feuillet de Biologie 1988 ; XXIX : 17-26.

324 Toly-Ndour C, Mourtada H, Huguet-Jacquot S, Maisonneuve E, Friszer S, Pernot F, et al.

Clinical input of anti-D quantitation by continuous-flow analysis on autoanalyzer in the management of high-titer anti-D maternal alloimmunization. *Transfusion* 2018 ; 58 (2) : 294-305.

325 Jacques C, Francis R, Pascal B.

Epreuve de compatibilité directe au laboratoire. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext; 2011. 343 p. P: 111.

326 Jacques C, Francis R, Pascal B.

Les grandes étapes de l'ECDL. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext; 2011. 343 p. P: 102.

327 M. AIT AMEUR, Khouloud Mezzat.

« Les Examens immunohématologiques au centre de transfusion sanguine: Expérience de l'Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech » faculté de médecine et de pharmacie, Marrakech, 2020, p 56

328 Jacques C, Francis R, Pascal B.

Interprétation des résultats de l'ECDL. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext; 2011. 343 p. P: 110

329 Theis SR, Hashmi MF.

Coombs Test. [Updated 2022 Sep 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547707/>

330 Chantal Muller.

Chapitre 2 – Anticorps irréguliers

« test direct à l'antiglobuline (TDA) », Livret 4 d'activités technologiques. Immuno-hématologie, 2012, P : 62 - 64

331 Theis SR, Hashmi MF.

Coombs Test. [Updated 2022 Sep 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-.

332 Parker V, Tormey CA.

The Direct Antiglobulin Test: Indications, Interpretation, and Pitfalls. *Arch Pathol Lab Med.* 2017 Feb;141(2):305-310.

333 MICHEL, M., GODEAU, B., ALADJIDI, N., et al. Protocole national de diagnostic et de soins (PNDS) Anémie Hémolytique Auto-Immune. 2018.

334 Chen F, Owen I, Savage D, et al.

Late onset haemolysis and red cell autoimmunization after allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant* 1997;19:491-5.

335 Sanz J, Arriaga F, Montesinos P, et al.

Autoimmune hemolytic anemia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients. *Bone Marrow Transplant* 2007;39:555-61.

336 Dacie J, Worlledge S.

Auto-immune hemolytic anaemias. *Prog Hematol* 1969;6:82-120.

337 Sokol R, Hewitt S, Stamps B.

Autoimmune haemolysis: mixed warm and cold antibody type. *Acta Haematol* 1983;**69**:266–74.

338 Habibi B.

Drug-induced immune haemolytic anaemias. *Baillières Clin Immunol Allergy* 1987;**1**:343–56.

339 Habibi B.

Drug induced red blood cell autoantibodies co-developed with drug specific antibodies causing haemolytic anaemias. *Br J Haematol* 1985;**61**:139–43.

340 Béné et al.

Guide des analyses en hématologie.

341 Dacie and Lewis

“Practical Haematology” page 266

342 Khouloud Mezzat , Pr M. AIT AMEUR

« Les Examens immunohématologiques au centre de transfusion sanguine: Expérience de l’Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech » page 103 faculté de médecine et de pharmacie de Marrakech 2020

343 Jacques C, Francis R, Pascal B.

Etapes de réalisation d'adsorption. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext, 2011. 343 p. P: 284.

344 Chiaroni J, Gouvitsos J, Dettori I, Ferrera V.

How do we Evaluate panagglutinating sera. *Transfusion*, 2009 ; 49 : 1540-5.

345 Khouloud Mezzat , Pr M. AIT AMEUR

« Les Examens immunohématologiques au centre de transfusion sanguine: Expérience de l’Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech » page 105 – 106 faculté de médecine et de pharmacie de Marrakech 2020

346 Khouloud Mezzat , Pr M. AIT AMEUR

« Les Examens immunohématologiques au centre de transfusion sanguine: Expérience de l’Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech » page 96 – 97 faculté de médecine et de pharmacie de Marrakech 2020

347 Caquet, Reil A, Bux J.

Geno- and phenotyping of human neutrophil antigens. *Methods Mol Biol.* 2015;1310:193-203. doi: 10.1007/978-1-4939-2690-9_16. PMID: 26024636.

348 Société internationale de transfusion sanguine.

<https://www.isbtweb.org/asset/0E6FBCF2-C3B9-4E9E-82E9F3A20373077C/>

349 Fleisch, Brigitte.

(2019). Work-up in the case of granulocyte antibodies. *ISBT Science Series.* Page : 1-11 DOI: 15.10.1111/voxs.12504.

350 Bux J, Kober B, Kiefel V, et al.

Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens. *Transfus Med* 1993; 3:157–162

351 Ulrich J.

Sachs Monoclonal antibody immobilization of granulocyte specific antigens (MAIGA) assay
Institute for Clinical Immunology and Transfusion Medicine Justus Liebig University, Giessen,
Germany.

352 Béné et al.

Guide des analyses en hématologie.

353 Valentin, Nathalie & Muller, Jean-Yves.

(2006). Autoanticorps antiplaquettes. EMC - Biologie Médicale. 1. 1-6.
DOI :10.1016/S2211-9698(06)76206-9.

354 Ajzenberg N, Dreyfus M, Kaplan C, Yvart J, Weill B, Tchernia G.

Pregnancy-associated thrombocytopenia revisited : assessment and follow-up of 50 cases. *Blood* 1998;92:4573–80.

355 Kiefel V.

The MAIPA assay and its applications in immuno-haematology. *Transf Med* 1992;2:181–8.

356 Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C.

Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet- reactive antibodies. *Blood* 1987;70:1722–6.

قسم الطبیبج

أقسِم بِاللّهِ الْعَظِيمِ

أَن أَرَأِبَ اللّهِ فِي مِهْنَتِي.

وَأَن أَصُونَ حَيَاةَ الْإِنْسَانِ فِي كَافَّةِ أَطْوَارِهَا فِي كُلِّ الظُّرُوفِ
وَالْأَحْوَالِ بَادِلًا وَسَعِي فِي إِنْقَاذِهَا مِنَ الْهَلَاكِ وَالْمَرَضِ
وَالْأَلَمِ وَالْقَلْقِ.

وَأَن أَحْفَظَ لِلنَّاسِ كِرَامَتَهُمْ، وَأَسْتُرَ عَوْرَتَهُمْ، وَأَكْتَمَ سِرَّهُمْ.
وَأَن أَكُونَ عَلَى الدَّوَامِ مِنْ وَسَائِلِ رَحْمَةِ اللّهِ، بَادِلًا رِعَايَتِي الطَّبِيبَةَ لِلْقَرِيبِ وَالْبَعِيدِ،
لِلصَّالِحِ وَالطَّالِحِ، وَالصَّدِيقِ وَالْعَدُوِّ.

وَأَن أَثَابِرَ عَلَى طَلْبِ الْعِلْمِ، وَأَسَخَّرَهُ لِنَفْعِ الْإِنْسَانِ لَا لِأَدَاهِ.
وَأَن أُوقِّرَ مَنْ عَلَّمَنِي، وَأُعَلِّمَ مَنْ يَصْغُرَنِي، وَأَكُونَ أَخًا لِكُلِّ زَمِيلٍ فِي الْمِهْنَةِ الطَّبِيبَةِ
مُتَعَاوِنِينَ عَلَى الْبِرِّ وَالتَّقْوَى.

وَأَن تَكُونَ حَيَاتِي مِصْدَاقَ إِيمَانِي فِي سِرِّي وَعَلَانِيَتِي،
نَقِيَّةً مِمَّا يُشِينُهَا تَجَاهَ اللّهِ وَرَسُولِهِ وَالْمُؤْمِنِينَ.

وَاللّهُ عَلَى مَا أَقُولُ شَهِيدًا



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

أطروحة رقم 238

سنة 2023

دليل التحليل البيولوجي في أمراض الدم الأطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم 2023/07/07
من طرف

السيد أيوب أنتفي

المزداد في 22 نونبر 1995 بخنيفرة

لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات الأساسية:

أمراض الدم البيولوجية - دليل - طالب - مقيم.

اللجنة

الرئيس

م. شكور

السيد

أستاذ في أمراض الدم البيولوجية

المشرف

م. أيت عامر

السيد

الحكم

أستاذ في أمراض الدم البيولوجية

س. ساياغ

السيدة

أستاذة مبرزة في أمراض الدم