

**MÉMOIRE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

**Soutenu publiquement le 8 mars 2013
Par Cécile Bassan**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de**

THÈSE EN VUE DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Mise au point technique d'une nouvelle méthode de
quantification des hématies contenant de
l'hémoglobine fœtale par cytométrie en flux.
Comparaison avec le test de Kleihauer**

Membres du jury :

Président DUTHILLEUL Patrick, PU-PH Faculté de Pharmacie de Lille-CH Valenciennes

Assesseurs ROSE Christian, PU-PH Université Catholique de Lille-CH St Vincent de Paul

LE BARON Fabienne, PH CH Valenciennes

DELGRANCHE Aline, PH CH St Vincent de Paul

CHARPENTIER Agnès, MCU-PH Université Catholique de Lille-CH St Philibert



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2
Droit et Santé

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président : Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents : Professeur Alain DUROCHER
Professeur Régis BORDET
Professeur Patrick PELAYO
Professeur Frédéric LOBEZ
Professeur Monique CAPRON
Professeur Salem KACET
Madame Stéphanie DAMAREY
Monsieur Pierre RAVAUX
Monsieur Larbi AIT-HENNANI
Monsieur Edouard DANJOU

Directeur Général des Services : Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen : Professeur Luc DUBREUIL
Vice-Doyen, 1^{er} assesseur : Professeur Damien CUNY
Assesseurs : Mme Nadine ROGER
Professeur Philippe CHAVATTE
Chef des services administratifs : Monsieur André GENY

Liste des Professeurs des Universités :

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BAILLEUL	François	Pharmacognosie
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mlle	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2

Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mlle	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	BRUNET	Claude	Pharmacologie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
M.	BEGHYN	Terence	Chimie Thérapeutique 3
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARATO	Pascal	Chimie Thérapeutique 2
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mlle	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mlle	CHARTON	Julie	Chimie Organique
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mlle	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Melle	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amury	Chimie Thérapeutique 2
Mlle	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique

Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mlle	LEONHARD	Julie	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	LORIN-LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MOUTON	Nicolas	Physique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Melle	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
Mme	THUILLIER	Pascale	Hématologie
Mme	VANHOUTTE	Geneviève	Biochimie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ABADIE	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique – Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique



Université Lille 2
Droit et Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

À mon Président du jury,

Monsieur le Professeur Patrick DUTHILLEUL

*Professeur des Universités, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques,
Université Lille 2*

*Praticien Hospitalier, Chef de service du Laboratoire d'Hématologie-Immunologie-
Cytogénétique, Responsable du Pôle Biologie-Hygiène, Centre Hospitalier de Valenciennes*

Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail et de votre aide pour mes ennuis administratifs.

Interne dans votre service, j'ai pu profiter de votre expérience pour approfondir mes connaissances et je vous en suis véritablement reconnaissante. Soyez certain que la découverte de sphérocytes entraînera toujours pour moi une pensée vers Valenciennes.

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Soyez assuré de mon profond respect.

À mes juges,

Monsieur le Professeur Christian ROSE

*Professeur des Universités, Faculté libre de Médecine, Université Catholique de Lille
Praticien Hospitalier, Chef de service d'Oncologie-Hématologie, Saint Vincent de Paul,
Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille*

Grâce à votre collaboration dès les prémices de ce projet, nous avons pu inclure des patients atteints d'hémoglobinopathie et je vous en remercie.

Vous avez également accepté avec gentillesse de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère considération.

Madame le Docteur Fabienne LE BARON

Praticien Hospitalier, Laboratoire d'Hématologie-Immunologie-Cytogénétique, Centre Hospitalier de Valenciennes

Je vous remercie de votre enthousiasme pour ce sujet et de votre contribution bibliographique.

En travaillant à vos côtés, j'ai pu apprécier votre pragmatisme et votre implication dans la formation des internes.

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury. Recevez ici le témoignage de ma vive gratitude.

Madame le Docteur Aline DELGRANCHE

*Praticien Hospitalier, Service de Gynécologie-Obstétrique, Saint Vincent de Paul,
Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille*

Je suis reconnaissante des éclaircissements que vous avez apportés sur la place du test de Kleihauer dans la pratique courante.

Soyez assurée de mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

À ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Agnès CHARPENTIER

Maitre de Conférences des Universités, Faculté libre de Médecine, Université Catholique de Lille

Praticien Hospitalier, Chef de service du Laboratoire d'Hématologie, Saint Philibert, Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille

Je vous remercie de m'avoir confié ce travail (après vous être battue pour obtenir les réactifs), de m'avoir guidée et encouragée tout au long de sa réalisation.

Interne dans votre service, j'ai acquis à votre contact de solides bases en cytologie et en cytométrie. J'ai également pu apprécier votre générosité et votre sensibilité culturelle.

Je vous fais part ici de ma chaleureuse estime.

À toutes les personnes qui ont contribué à ce travail,

Judith, qui m'a présenté le sujet (intéressant pour deux futures mamans...).

Philippe, pour ses connaissances en cytométrie et en anglais (le "vortex slowly" n'a plus de secret pour nous).

Les secrétaires et techniciens de St Phi, qui ont assuré le pré-analytique avec leur bonne humeur habituelle.

Les techniciens, les biologistes et Charlotte (ma co-interne à l'époque) **du CHV** pour leur participation à l'étude de reproductibilité et au recrutement des échantillons positifs.

Les techniciens et les biologistes du secteur de pathologie du globule rouge du CBP, qui ont réalisé les électrophorèses de l'hémoglobine et m'en ont expliqué le principe.

Anne-France, pour l'extraction des données informatiques.

Monsieur Forzy, pour son expertise statistique.

Les biologistes du labo d'Armentières, qui m'ont éclairé sur la validation de méthode et m'ont gentiment dégagé du temps pour achever la rédaction.

Mes co-internes (Stéphanie, Benjamin, Candice), qui surveillaient les frigos.

Terry, mon externe préféré, et les forums internet pour leur aide pour dompter Word.

Mes relecteurs pour leurs corrections et leurs remarques constructives.

À ma famille et mes amis,

Hugo, mon petit Poupinou chéri, qui embellit chaque jour de ma vie.

Nicolas, qui m'accepte comme je suis (certains jours mieux que d'autres), qui me supporte et me fait avancer.

Mes parents, qui me soutiennent et m'encouragent à chaque étape de ma vie. Merci pour mon enfance heureuse (entre séances de chatouilles et oreillers de combat).

Mes grands-parents, oncles, tantes, cousins, cousines pour les immenses moments de joie partagés et la solidarité dans les épreuves.

Ma belle-famille, pour son formidable accueil des pièces rapportées.

Emma, pour son imagination débordante et sa fidèle amitié.

Sophie, qui est sur la même longueur d'onde que moi et pour nos quatre années inoubliables de collocation montpelliéraine.

Thomas, gardois itinérant, pour les années en Pharma et la préparation de l'Internat.

Audrey, Flocon, les Bezé, les Nocons, pour être toujours à fond.

Vincent, pour ton calme et ta grande culture.

Antoine, Elsa, Thomas, Philippe, pour nous ouvrir de nouveaux horizons.

Audrey et Anthony, pour être de merveilleux voisins.

Toutes les personnes présentes à ma soutenance, pour votre patience et votre attention.

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : anticorps
Ag : antigène
AMF : allo-immunisation materno-fœtale
CHV : Centre Hospitalier de Valenciennes
CLHP : chromatographie liquide haute performance
CMF : cytométrie en flux
CNGOF : Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français
CV : coefficient de variation
EC : électrophorèse capillaire
EST : exsanguino-transfusion
ET : écart-type
FCS : fausse couche spontanée
FS : forward angle scatter
GEU : grossesse extra-utérine
GHICL : Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille
GR : globule rouge
Hb : hémoglobine
HFM : hémorragie fœto-maternelle
IEF : isoélectrofocalisation
IgG : immunoglobuline de type G
IgM : immunoglobuline de type M
IM : intra-musculaire
IMG : interruption médicale de grossesse
IP : iodure de propidium
IV : intra-veineux
IVG : interruption médicale de grossesse
m : moyenne
MAF : mouvements actifs fœtaux
MAP : menace d'accouchement prématuré
MFIU : mort fœtale *in utero*
NN : nouveau-né
pH : potentiel hydrogène
PHHF : persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale
pHi : potentiel hydrogène isoélectrique
PMT : photomultiplicateur
PSV-ACM : pic systolique de vélocité dans l'artère cérébrale moyenne
r : coefficient de corrélation
R² : coefficient de détermination
RAI : recherche d'agglutinines irrégulières
RH : rhésus
SA : semaines d'aménorrhée
SFBC : Société Française de Biologie Clinique
SS : right angle scatter
T° : température
TIU : transfusion *in utero*
TK : test de Kleihauer
v : valeur vraie ou valeur cible
VME : version par manœuvres externes

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Structure quaternaire de l'hémoglobine	17
Figure 2 : Disposition des gènes des chaînes de globine	17
Figure 3 : Synthèse des diverses chaînes de globine au cours de l'ontogenèse.....	18
Figure 4 : Schéma simplifié de la physiopathologie de la drépanocytose	19
Figure 5 : Interruption de la polymérisation de l'HbS en présence d'HbF.....	20
Figure 6 : Principe de l'électrophorèse capillaire.....	25
Figure 7 : Schéma simplifié de la CLHP	26
Figure 8 : Représentation de la migration en IEF des principales hémoglobines	26
Figure 9 : Valeurs décisionnelles du PSV-ACM.....	30
Figure 10 : Principe de la cytométrie en flux.....	35
Figure 11 : Analyse du fichier ListMode d'un échantillon contenant des hématies foetales en CMF	41
Figure 12 : Schéma de préparation du test de conservation	42
Figure 13 : Résultats des TK pour toutes les demandes du 20 juin au 12 décembre 2012 ...	46
Figure 14 : TK : Coloration de différents frottis sanguins.	48
Figure 15 : Résultats de l'étude de reproductibilité inter-individuelle pour les mélanges sang de nouveau-né et de témoin négatif	51
Figure 16 : Résultats de l'étude de reproductibilité inter-individuelle pour les mélanges sang de nouveau-né et de TK avec hématies intermédiaires	51
Figure 17 : Histogrammes monoparamétriques (fluorescence de l'Ac anti-HbF) obtenus en CMF	53
Figure 18 : Histogrammes monoparamétriques (HbF) du contrôle préparé à deux concentrations de glutaraldéhyde	54
Figure 19 : Histogrammes monoparamétriques (HbF) d'un témoin préparé à deux concentrations de glutaraldéhyde	54
Figure 20 : Histogrammes d'un témoin positif à J0 et J3.....	55
Figure 21 : Comparaison de la CMF avec le TK : équation de la droite de régression	59
Figure 22 : Résultats obtenus par le TK et la CMF pour les témoins positifs	60
Figure 23 : Profils de trois patientes présentant des hématies intermédiaires.....	61
Figure 24 : Comparaison des résultats de TK et de CMF de trois patientes atteintes de drépanocytose.....	62
Figure 25 : Corrélation entre le pourcentage de F-cells et la quantité d'HbF des drépanocytaires.....	63
Figure 26 : Histogrammes de mélanges de sang de drépanocytaires et de nouveau-né.....	64
Figure 27 : Comparaison des résultats de TK, CMF et EC de 3 patients thalassémiques. ...	65
Figure 28 : Stratégie de prise en charge des nouvelles demandes de TK	67

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différentes hémoglobines normales.....	18
Tableau 2 : Répartition des différentes hémoglobines chez les drépanocytaires	21
Tableau 3 : Récapitulatif des syndromes α -thalassémiques	22
Tableau 4 : Profils électrophorétiques des β -thalassémies	22
Tableau 5 : Recommandations pour la prévention de l'allo-immunisation anti-RH1 chez les femmes RH-1	29
Tableau 6 : Adaptation des doses de Rhophylac® en fonction du résultat du test de Kleihauer	32
Tableau 7: Valeurs fournisseur pour le contrôle FETALtrol™	37
Tableau 8 : Vérification initiale d'une méthode quantitative	43
Tableau 9 : Répartition des différents groupes d'échantillons	47
Tableau 10 : Caractéristiques des dix lectures des quatre frottis de TK.....	49
Tableau 11 : Valeurs de TK obtenues pour deux séries de dix lames colorées par différentes personnes mais lues par le même opérateur.....	50
Tableau 12 : Résumé de la lecture de huit frottis de TK par 18 opérateurs.....	51
Tableau 13 : Nombre d'hématies fœtales trouvées sur chaque préparation de l'étude de conservation.....	55
Tableau 14 : Résultats de dix passages successifs de trois échantillons.....	56
Tableau 15 : Résultats de neuf préparations du contrôle FETALtrol™ niveau 3	57

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	11
TABLE DES FIGURES	12
TABLE DES TABLEAUX	13
SOMMAIRE	14
INTRODUCTION	16
I. HÉMOGLOBINE	16
I.1. <i>Structure et fonctions</i>	16
I.2. <i>Génétique, biosynthèse et ontogénie</i>	17
I.3. <i>Hémoglobinopathies</i>	19
I.3.1. Drépanocytose	19
I.3.2. Thalassémies	21
I.3.3. Persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale	23
II. ÉLECTROPHORÈSE DE L'HÉMOGLOBINE	24
II.1. <i>Électrophorèse capillaire</i>	24
II.2. <i>Chromatographie liquide haute performance</i>	25
II.3. <i>Isoélectrofocalisation</i>	26
III. HÉMORRAGIE FŒTO-MATERNELLE	27
III.1. <i>Définition</i>	27
III.2. <i>Facteurs de risque</i>	27
III.3. <i>Conséquences</i>	27
III.3.1. Anémie fœtale et néonatale	27
III.3.2. Allo-immunisation maternelle	28
III.4. <i>Diagnostic</i>	30
III.5. <i>Prise en charge</i>	31
IV. DÉTECTION DES HÉMATIES FŒTALES	32
IV.1. <i>Test de Kleihauer</i>	32
IV.1.1. Principe	32
IV.1.2. Indications	33
IV.1.3. Limites	33
IV.2. <i>Cytométrie en flux</i>	34
IV.2.1. Principe de la cytométrie en flux	34
IV.2.2. Applications à la détection des hématies fœtales	35
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	36
MATÉRIEL ET MÉTHODE	37
I. POPULATIONS ÉTUDIÉES	37
I.1. <i>Patientes en contexte obstétrical</i>	37
I.2. <i>Témoins</i>	37
I.2.1. Commerciaux	37
I.2.2. Préparés au laboratoire	38
I.3. <i>Patients atteints d'hémoglobinopathie</i>	38
II. DÉTECTION DES HÉMATIES FŒTALES	38
II.1. <i>Test de Kleihauer</i>	38
II.2. <i>Cytométrie en flux</i>	39
II.2.1. Technique	39
II.2.2. Mise au point technique	42
II.3. <i>Vérification de méthode</i>	43
II.3.1. Fidélité	43
II.3.2. Justesse	44

II.3.3.	Estimation de l'incertitude	44
II.3.4.	Limite de détection (LD)	45
II.3.5.	Limite de quantification (LQ)	45
II.3.6.	Comparaison de méthodes	45
RÉSULTATS	46	
I.	POPULATION ÉTUDIÉE	46
I.1.	<i>Patientes en contexte obstétrical</i>	46
I.2.	<i>Témoins</i>	47
I.3.	<i>Patients atteints d'hémoglobinopathie</i>	47
II.	TEST DE KLEIHAUER	48
II.1.	<i>Coloration</i>	48
II.2.	<i>Évaluation de la technique du test de Kleihauer</i>	49
II.2.1.	Fidélité	49
II.2.2.	Justesse	52
III.	CYTOMÉTRIE EN FLUX	53
III.1.	<i>Histogrammes</i>	53
III.2.	<i>Mise au point de la méthode</i>	54
III.2.1.	Concentration de glutaraldéhyde	54
III.2.2.	Conservation	55
III.3.	<i>Vérification de la méthode de la cytométrie en flux</i>	56
III.3.1.	Fidélité	56
III.3.2.	Justesse	57
III.3.3.	Incertitude de mesure	57
III.3.4.	Limites de détection et de quantification	58
IV.	COMPARAISON DE LA CYTOMÉTRIE EN FLUX ET DU TEST DE KLEIHAUER ...	59
IV.1.	<i>Corrélation</i>	59
IV.2.	<i>Performances</i>	60
IV.3.	<i>Cas des hématies intermédiaires</i>	61
V.	APPORTS DE LA CYTOMÉTRIE POUR LES PATIENTS ATTEINTS D'HÉMOGLOBINOPATHIE	62
V.1.	<i>Drépanocytaires</i>	62
V.2.	<i>Thalassémiques</i>	65
DISCUSSION.....	66	
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	69	
BIBLIOGRAPHIE	70	

INTRODUCTION

I. HÉMOGLOBINE

1.1. Structure et fonctions

L'hémoglobine (Hb) constitue 33 pour cent du poids du globule rouge (GR). Sa fonction principale est de transporter l'oxygène (O_2) des poumons aux tissus, elle participe à l'élimination du dioxyde de carbone (CO_2) et joue un rôle dans le maintien du pH intra-érythrocytaire (1).

Chez l'Homme, l'Hb est un hétérotétramère composé de deux types chaînes polypeptidiques de structure voisine : l'une de la famille α comportant 141 acides aminés, présentant une arginine à l'extrémité C-terminale, et l'autre de la famille β longue de 146 résidus se terminant par une histidine. Au centre de chaque chaîne de globine, dans une poche hydrophobe, se niche un groupement prosthétique : l'hème, au sein duquel peut se fixer l' O_2 sur un atome de fer (2).

Les chaînes de la famille α sont codées par des gènes localisés sur le chromosome 16 (3), tandis que celles de la famille β dépendent de gènes situés sur le chromosome 11 (4). La structure primaire des chaînes est homologue, elles diffèrent simplement par leur longueur et par l'enchaînement des acides aminés qui les constituent. La numérotation de ces derniers s'effectue à partir de l'extrémité N-terminale. Chaque chaîne s'arrange en huit hélices α repliées de façon identique, désignées par une lettre de A à H. Ceci produit une structure globulaire compacte ménageant au voisinage de sa surface une poche hydrophobe où se loge une molécule d'hème (5). L'hème est une protoporphyrine, c'est-à-dire un noyau formé de quatre cycles pyrroliques unis par des ponts méthényles et substitué par des groupements méthyl, propionate et vinyle selon la disposition caractéristique de type IX. Au centre de ce noyau se tient un atome de fer ferreux (Fe^{++}), qui reste sous sa forme réduite quel que soit l'état d'oxygénation de l'Hb (5). Les molécules d'hèmes servent à offrir la meilleure conformation possible à l' O_2 . L'affinité de l'Hb pour l' O_2 augmente quand les protons, le CO_2 , les ions chlorures, la température (T°) et le 2,3-diphosphoglycérate diminuent (6).

L'organisation finale en tétramère résulte de l'association de deux dimères fonctionnels $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_2$ (figure 1).

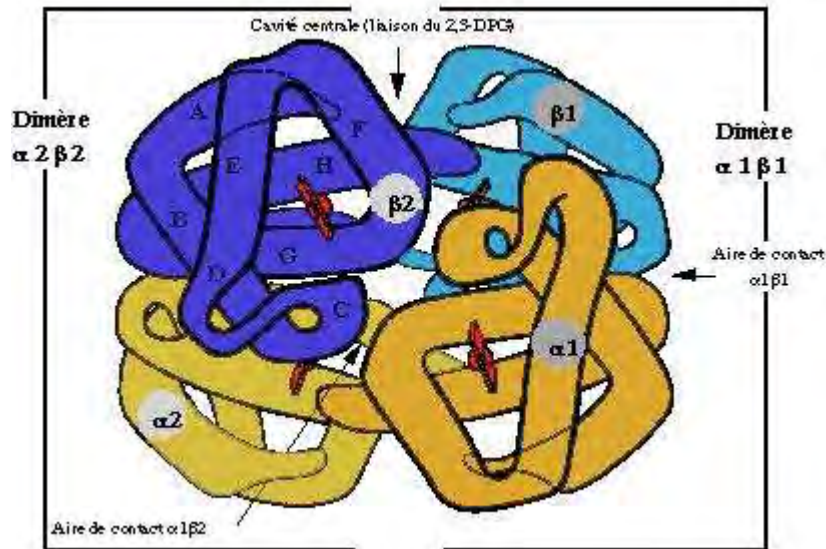


Figure 1 : Structure quaternaire de l'hémoglobine (7)

1.2. Génétique, biosynthèse et ontogénie

La famille des chaînes α comporte trois gènes fonctionnels : ζ , $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (8) ainsi qu'un gène $\theta 1$ codant pour une protéine non retrouvée chez l'Homme (9) et sont présents sur la partie terminale du bras court du chromosome 16. La famille des chaînes β est riche de cinq gènes fonctionnels : ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, β et δ (10) localisés à l'extrémité distale du bras court du chromosome 11. Les gènes sont activés au cours de la vie suivant leur ordre sur le chromosome (figure 2).

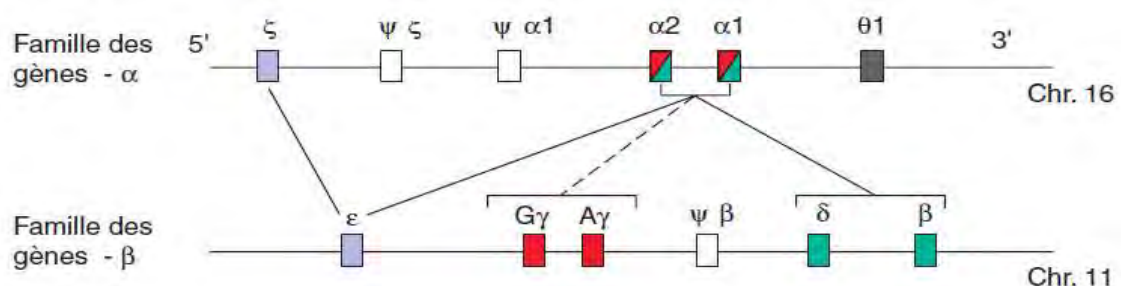


Figure 2 : Disposition des gènes des chaînes de globine. Adapté de (11)

Pendant l'ontogénie, deux commutations (switch) interviennent (figure 3). Elles correspondent à des changements de stade de développement du fœtus et de lieux d'érythropoïèse. La première commutation survient lors du passage de la vie embryonnaire à la vie fœtale et la seconde pour la transition de la vie fœtale à la vie adulte, c'est-à-dire au moment de la naissance (12). La régulation est telle que la quantité de chaînes α produite doit être équivalente à celle de chaînes non- α .

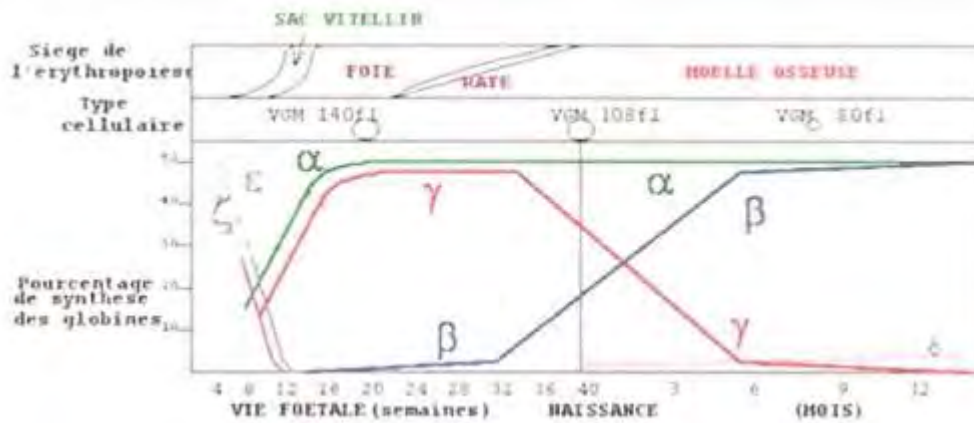


Figure 3 : Synthèse des diverses chaînes de globine au cours de l'ontogenèse. Adapté de (1)

Plusieurs types d'hémoglobines résultent de l'association des différentes chaînes de globine (tableau 1), elles se succèdent et se chevauchent au cours de la vie.

Tableau 1 : Les différentes hémoglobines normales (5)

Embryonnaires	Fœtale	Adultes
Hb Gower 1 ($\zeta^2\epsilon^2$)	Hb F ($\alpha^2\gamma^2$)	Hb A ($\alpha^2\beta^2$)
Hb Gower 2 ($\alpha^2\epsilon^2$)		Hb A ₂ ($\alpha^2\delta^2$)
Hb Portland ($\zeta^2\gamma^2$)		

Les hémoglobines embryonnaires (Gower 1, Gower 2 et Portland) sont produites dans le sac vitellin, l'érythropoïèse est donc extra-embryonnaire, et synthétisées pendant une brève période.

L'hémoglobine fœtale (HbF) est détectable dès la cinquième semaine de la vie embryonnaire. Entre la huitième et la dixième semaine, elle devient majoritaire jusqu'à la naissance et représente 90 pour cent de la totalité des Hb. L'affinité de l'HbF pour l'oxygène est supérieure à celle de l'hémoglobine adulte afin de faciliter son transfert de la mère au fœtus. La sous-unité fœtale γ est un mélange en proportions variables de deux espèces moléculaires très proches, produites par les gènes $A\gamma$ et $G\gamma$, puisqu'elles ne diffèrent que par l'acide aminé en position 136 : une alanine pour la première et un glycolle pour la seconde (13). Par ailleurs, il existe dans toutes les populations un polymorphisme en position 75 du gène $A\gamma$ où une thréonine peut remplacer l'isoleucine habituellement rencontrée (14).

Le profil électrophorétique caractéristique de l'adulte est observable dès l'âge de six mois : l'HbA constitue plus de 95 pour cent de la totalité des hémoglobines, l'HbA₂ représente environ 2,5 pour cent et l'HbF se retrouve à l'état de traces (moins de un pour cent). Chez l'adulte l'HbF se situe dans un à sept pour cent des globules rouges, nommés "F-cells" (15,16). Ce pourcentage est génétiquement déterminé par un gène situé sur le chromosome X (17,18). Cependant, dans certaines situations pathologiques la quantité d'HbF peut se voir augmentée : drépanocytose, β -thalassémie, persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale (PHHF) notamment ou lors de traitement par l'hydroxyurée (1). Plus

paradoxalement, on observe un nombre plus grand de F-cells (jusqu'à 17%) au cours de la grossesse, particulièrement entre 18 et 22 semaines d'aménorrhée (19,20).

1.3. Hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies sont un ensemble de pathologies résultant d'anomalies qualitatives ou quantitatives de la synthèse des chaînes de globine.

1.3.1. Drépanocytose

La drépanocytose est l'une des maladies génétiques les plus répandues dans le monde. Elle touche principalement l'Afrique intertropicale (une personne sur quatre est porteuse du gène muté) et les Antilles (une personne sur huit présente la mutation), mais aussi le pourtour méditerranéen, le Moyen-Orient et l'Inde (21). Cette répartition est due à la résistance partielle des hématies pathologiques à l'infection par *Plasmodium* spp.

La drépanocytose est caractérisée par la présence d'une hémoglobine anormale : l'HbS. Une mutation unique survient au niveau du gène de la β globine conduisant à la substitution du glutamate (chargé négativement) en position 6 par une valine (acide aminé neutre). La transmission s'effectue sur le mode autosomique récessif : les individus hétérozygotes, notés AS, sont sains et transmettent la maladie et les homozygotes, SS, sont symptomatiques.

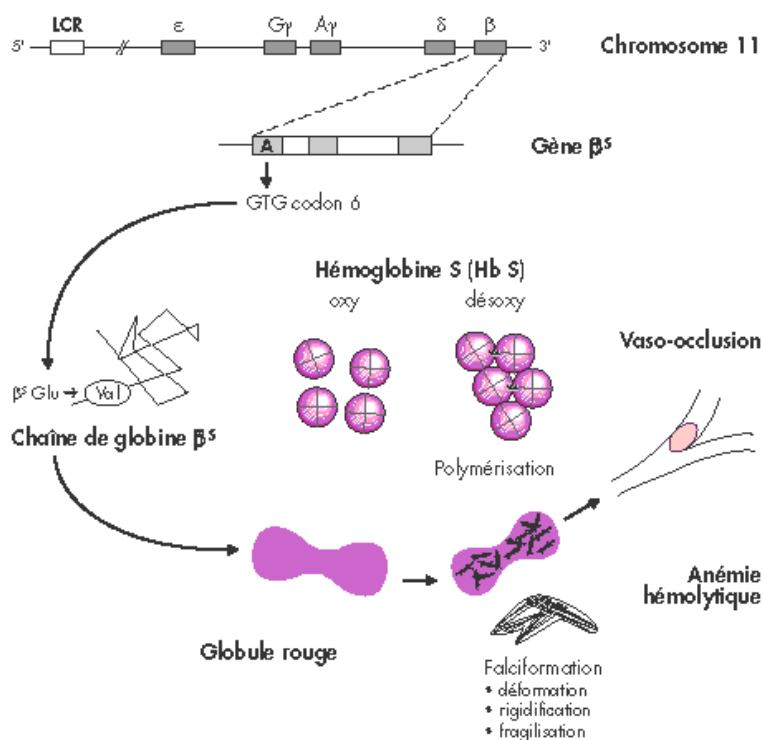


Figure 4 : Schéma simplifié de la physiopathologie de la drépanocytose (22)

L'HbS est reconnue pour sa mauvaise solubilité quand elle est désoxygénée. Ainsi, plusieurs molécules d'HbS polymérisent puis précipitent et se lient à la membrane du GR. Il existe une période de latence pendant laquelle l'hémoglobine peut se resolubiliser mais dans les situations défavorables telles que l'hyperthermie, l'acidose ou la déshydratation, le processus devient difficilement réversible. L'hématie est déformée par l'accumulation de formes polymérisées et prend l'aspect d'une faucille : c'est le drépanocyte. Par leur incapacité à se déformer dans la microcirculation et leur adhésion excessive à l'endothélium, les drépanocytes provoquent l'obstruction des capillaires sanguins (figure 4) (23). De plus, ils sont plus sujets à l'hémolyse et libèrent des molécules pro-inflammatoires et pro-coagulantes.

L'expression clinique de la maladie est très variable. Chez les patients homozygotes, les symptômes apparaissent quelques mois après la naissance quand les hématies contenant de l'HbS deviennent majoritaires. On observe principalement des crises vaso-occlusives douloureuses de localisations variées, des manifestations liées à l'anémie ainsi qu'une susceptibilité accrue aux infections à bactéries capsulées (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*...) surtout chez les sujets HLA DQB1*3. Suite aux accidents ischémiques aigus peuvent se développer des complications chroniques dans les organes altérés, notamment la rate ou le rein.

Des mécanismes modulateurs, laissant espérer une évolution moins sévère, ont été mis en évidence. La diminution de la concentration en hémoglobine dans l'hématie, chez les individus conjointement atteints d'une α thalassémie, réduit la polymérisation de l'HbS et donc la formation de drépanocytes. Il en est de même pour les patients dont la quantité d'HbF est augmentée puisque les chaînes γ ne s'intègrent pas aux polymères d'HbS (figure 5). De plus, l'augmentation de la synthèse d'HbF se fait au dépens de celle de l'HbS, aboutissant à une diminution de la quantité d'HbS (22).

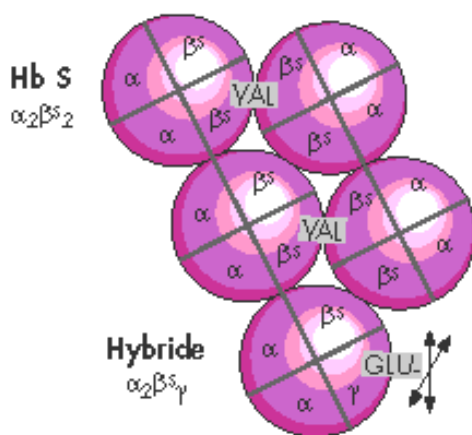


Figure 5 : Interruption de la polymérisation de l'HbS en présence d'HbF (22)

Chez les patients homozygotes, on relève des quantités d'HbF variables mais plus élevées que celles de la population normale (tableau 2).

Tableau 2 : Répartition des différentes hémoglobines chez les drépanocytaires (24)

Hémoglobine	Hétérozygote AS	Homozygote SS
S	40-45%	77-96%
A	55-60%	0
A ₂	2-3%	2-3%
F	<2%	2-20%

Le traitement est tout d'abord prophylactique en réduisant les circonstances favorisant les crises (bonne hydratation, bonne oxygénation : éviter tabagisme et altitude, absence de chocs thermiques). On peut également prendre en charge les symptômes : antalgiques, antibiotiques, supplémentation en folates ou échanges transfusionnels en cas d'anémie profonde mal tolérée. De nouvelles thérapeutiques sont proposées comme la 5-azacitidine, agent déméthylant qui active la synthèse d'HbF mais dont la carcinogénicité limite l'utilisation. Mais c'est l'hydroxyurée qui est la plus prescrite pour limiter les crises vaso-occlusives récidivantes ; elle apporte un bénéfice précoce et multifactoriel par diminution de l'adhésion des hématies à l'endothélium, leucopénie relative et accroissement de la quantité d'HbF. Le seul traitement curatif est l'allogreffe de moelle osseuse qui est réservée à un petit nombre de cas graves en raison du taux de mortalité important qui s'en suit. (22)

I.3.2. Thalassémies

La thalassémie est une maladie génétique de transmission autosomique récessive fréquemment retrouvée : elle atteint jusqu'à 20 pour cent de la population dans les zones d'endémie (25). Elle se caractérise par la diminution ou la suppression de synthèse d'une chaîne de globine qui aboutit à une insuffisance de production de l'hémoglobine normale. En outre, le déséquilibre du ratio entre chaînes α et non- α conduit à la présence de chaînes de globine excédentaires libres. Ces chaînes non-appariées s'associent entre elles, précipitent et altèrent la membrane du GR provoquant une hémolyse. Par ailleurs, le manque d'hémoglobine normale entraîne une surproduction médullaire qui se traduit par une dysérythropoïèse et une déformation des os plats. (26)

La classification est réalisée en fonction de la chaîne de globine touchée, on parle donc d' α -thalassémie et de β -thalassémie.

a) α -thalassémie

Cette pathologie se retrouve principalement en Afrique équatoriale et en Asie du Sud-Est. Il existe une grande hétérogénéité de présentation de la maladie en fonction du nombre de gènes délétés (quatre gènes au total : α_1 et α_2 sur chaque chromosome 16). Les chaînes

γ en excès se combinent en tétramères pour former l'Hb Bart's et les chaînes β donnent l'HbH. A l'âge adulte, on ne retrouve pas d'augmentation de l'HbF (tableau 3).

Tableau 3 : Récapitulatif des syndromes α -thalassémiques (26)

Gènes délétés	Dénomination génotypique	Dénomination phénotypique	Retentissement clinique	Électrophorèse hémoglobine
1	$-\alpha/\alpha$	α thalassémie de type 2	silencieux	NN : 1-2% Hb Bart's Adulte : 98% HbA, 2% HbA2
2	$--/\alpha\alpha = \alpha^0$ $-\alpha/-\alpha = \alpha^+$	α thalassémie de type 1	mineur	NN : 5-10% Hb Bart's Adulte : 98% HbA, 2% HbA2
3	$--/-\alpha$	α thal majeure = Hémoglobinose H	atteinte variable \pm sévère	NN : 10-30% HbH et Bart's Adulte : 1-30% HbH, 70% HbA, 3-6% HbA2
4	$--/--$	<i>Hydrops foetalis</i>	mort <i>in utero</i>	80-90% Hb Bart's 10% HbH 10% Hb Portland

b) β -thalassémie

Cette forme prédomine dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient, en Inde et en Asie du Sud-Est. Le gène β est présent en double exemplaire et on recense plus de 200 mutations qui expliquent l'hétérogénéité de la présentation clinique. En effet, chez les patients homozygotes, selon la localisation de la mutation, on observe une absence totale de synthèse de chaîne β : on parle de β^0 -thalassémie, ou une production résiduelle de ces chaînes : on est alors face à une β^+ -thalassémie. Les patients hétérozygotes présentent un trait β -thalassémique (27). Chacun de ces groupes possède des quantités différentes d'Hb A, F et A₂ (tableau 4).

Tableau 4 : Profils électrophorétiques des β -thalassémies (28)

	HbA	HbF	HbA ₂
β^0 -thalassémie	0	90 - 95%	3,5 - 7%
β^+ -thalassémie	5 - 45%	50 - 80%	3,5 - 7%
trait β -thalassémique	> 90%	> 2%	3,5 - 7%

On notera la persistance de l'expression des gènes codant pour les chaînes γ de globine et une augmentation de la quantité d'HbF pour compenser le déficit en HbA.

Chez les patients hétérozygotes, la clinique est peu évocatrice et peu exprimée. Parfois, une splénomégalie constitue un point d'appel. Biologiquement, on peut retrouver une anémie peu profonde associée à une microcytose, ou une augmentation de l'HbA₂ (parfois masquée par une carence martiale) (26).

Chez les homozygotes, on distingue des formes majeures, appelées maladie de Cooley, et des formes intermédiaires selon les manifestations cliniques. Dans le premier cas les signes surviennent dès la petite enfance : pâleur, ictère conjonctival, hépatosplénomégalie, hyperplasie des os plats. La tolérance est meilleure pour les formes intermédiaires ou à l'instauration précoce d'un traitement dès l'enfance. (29)

La prise en charge des formes majeures, en cas d'anémie profonde ou de présentation clinique sévère, fait intervenir des transfusions sanguines de culots globulaires déleucocytés phénotypés et compatibilisés. Malgré ces précautions, des complications existent : allo-immunisation, contaminations virales. Chaque culot apporte 200 mg de fer, afin de prévenir la survenue d'une insuffisance cardiaque congestive par surcharge martiale, on instaure systématiquement un traitement chélateur. Une splénectomie est parfois nécessaire vers six à huit ans, elle s'accompagne d'une prophylaxie antibiotique et vaccinale. Outre le traitement conventionnel, une greffe médullaire de donneur HLA compatible de la fratrie peut être une option curative. (29)

c) $\delta\beta$ -thalassémie

La présentation clinique des $\delta\beta$ -thalassémie est similaire à celle des β -thalassémies. La particularité de cette pathologie réside dans la synthèse d'Hb Lepore ($\delta\beta$) ou anti-Lepore ($\beta\delta$) suite à un crossing over inégal entre les gènes δ et β de globine. Le diagnostic est donné par l'électrophorèse de l'hémoglobine qui met en évidence les Hb Lepore et anti-Lepore et une absence d'HbA₂ (28).

I.3.3. Persistance héréditaire de l'hémoglobine foetale

Les personnes atteintes de persistance héréditaire de l'hémoglobine foetale (PHHF) sont cliniquement bien portantes et ne présentent pas d'anémie. On peut établir des similitudes avec les syndromes β -thalassémiques puisqu'il s'agit de délétions de taille et de localisations variables (plus de 50 connues) à l'origine d'une insuffisance de synthèse des chaînes β et δ de globine, compensée par une augmentation de production des chaînes γ . La quantité d'HbF peut atteindre jusqu'à 35% et sa répartition peut être pancellulaire (un peu dans toutes les hématies) ou hétérocellulaire (restreinte à certaines hématies) (30). La quantité d'HbA₂ reste normale, ce qui permet le diagnostic différentiel avec les β -thalassémies.

Comme toutes ces pathologies sont à transmission récessive et touchent les mêmes populations, il n'est pas rare de les trouver combinées chez un même individu offrant alors de nouvelles variations dans les présentations cliniques et biologiques.

II. ÉLECTROPHORÈSE DE L'HÉMOGLOBINE

Le diagnostic biologique des hémoglobinopathies, anomalies qualitatives ou quantitatives des chaînes de globine, repose sur les différences de migration entre les variants de l'hémoglobine. Comme toutes les protéines, cette dernière possède une structure propre qui dépend des acides aminés qui la composent et se déplace dans un champ électrique en fonction de sa taille et de sa charge, de la force ionique et du pH du tampon et du support de réaction (31).

Au Centre de Biologie Pathologie du Centre Hospitalier de Lille, selon les recommandations de la SFBC (Société Française de Biologie Clinique) (32), les différents variants sont mis en évidence par l'association de trois techniques électrophorétiques complémentaires : électrophorèse capillaire (EC), chromatographie liquide haute performance (CLHP) et isoélectrofocalisation (IEF) à partir d'un échantillon sanguin prélevé sur tube EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique).

II.1. Électrophorèse capillaire

Le tube de sang total est introduit directement dans l'automate (Capillarys™ 2 Flex Percing de Sebia). Un échantillon de prélèvement est dilué dans une solution hémolysante puis injecté à l'anode d'un tube en silice fondue de diamètre interne inférieur à 100 micromètres. Sous l'effet d'un champ électrique haute tension les hémoglobines migrent dans un tampon électrolytique alcalin (pH 9,4) et sont séparées en fonction de leur taille et de leur charge. Un détecteur, spectromètre d'absorbance à 415nm, placé à la cathode perçoit leur signal et le transforme en électrophorégramme. Ce profil, découpé en 15 zones, permet une analyse qualitative et quantitative des hémoglobines normales (A_1 , F et A_2) et des principales hémoglobines anormales (S, C, E et D) (figure 6).

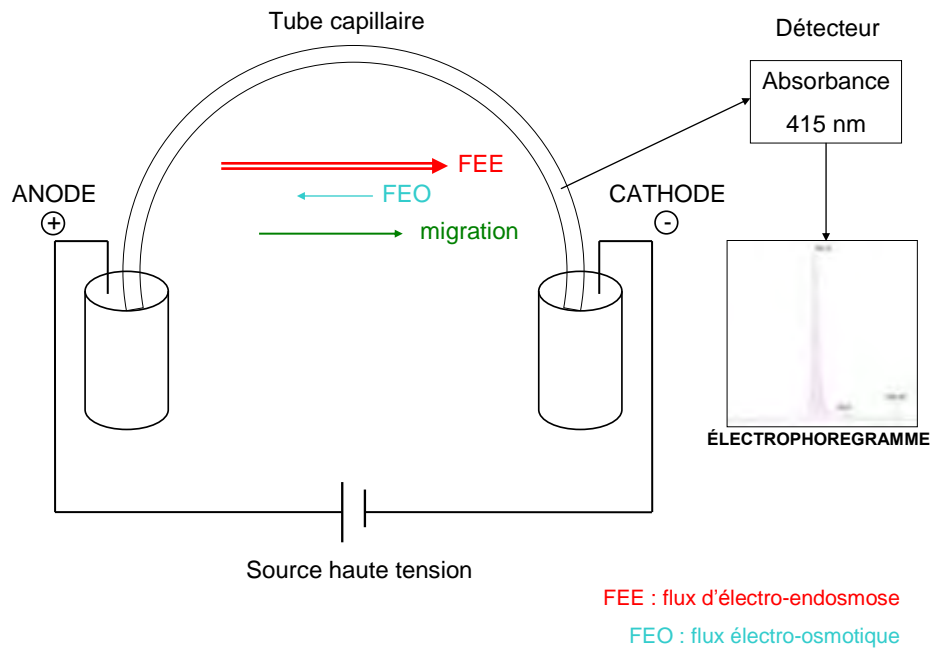


Figure 6 : Principe de l'électrophorèse capillaire

II.2. Chromatographie liquide haute performance

Un échantillon de sang hémolysé est injecté dans l'analyseur G8 de Tosoh Bioscience™ où il est entraîné dans une phase mobile (PM). Ce liquide est en fait un gradient d'élution constitué de trois tampons de concentrations salines différentes qui entraîne l'hémoglobine à travers une colonne remplie d'une phase stationnaire (PS). La séparation des HbF et A₂ dans la colonne échangeuse de cations se produit par leur différence de charges ioniques. En bout de colonne, un détecteur mesure l'absorbance à 415 nm et 690 nm. Le signal obtenu est transcrit en chromatogramme, le temps de rétention de chaque composé est caractéristique et permet d'associer un pic à un type d'hémoglobine (figure 7).

Cette technique permet une analyse quantitative précise (par intégration de l'aire sous la courbe) et rapide (six minutes) des HbF et A₂, ainsi qu'une identification présomptive de certains variants.

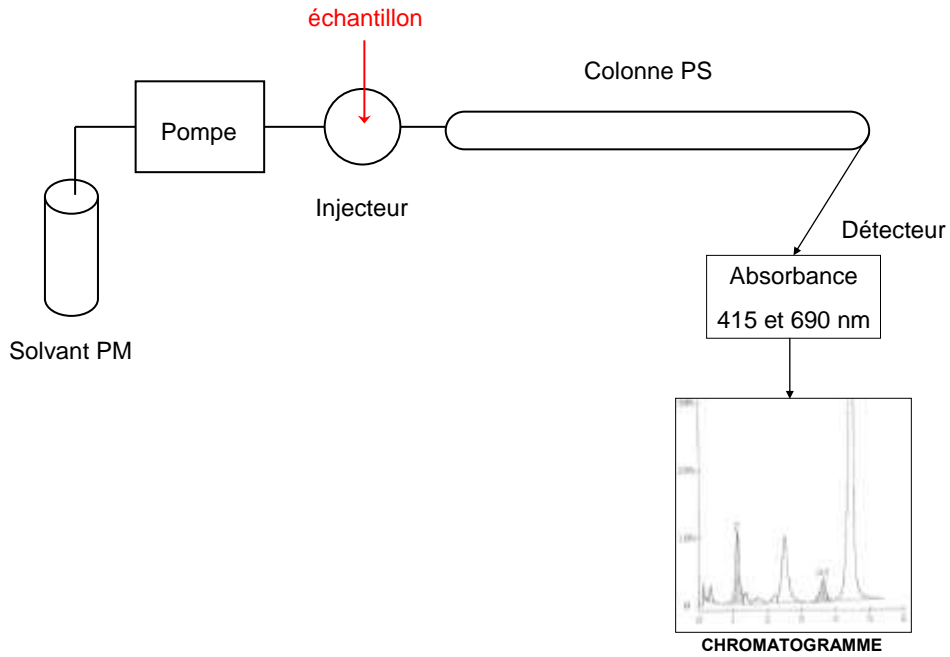


Figure 7 : Schéma simplifié de la CLHP

II.3. Isoélectrofocalisation

Sur un gel, on dépose les échantillons sanguins dilués au dixième dans une solution hémolysante et un contrôle de migration comprenant un mélange d'Hb A, F, S et C. La séparation des hémoglobines se fait, sous haute tension dans un gradient de pH 6 à 8, en fonction de leur pHi (pH auquel la charge globale de la molécule est nulle et auquel elle s'arrête de migrer). Les bandes sont ensuite révélées par du peroxyde d'hydrogène.

Cette technique uniquement qualitative, chronophage (une journée), mais très résolutive a été utilisée pour la première fois par... expérimenté mais cha

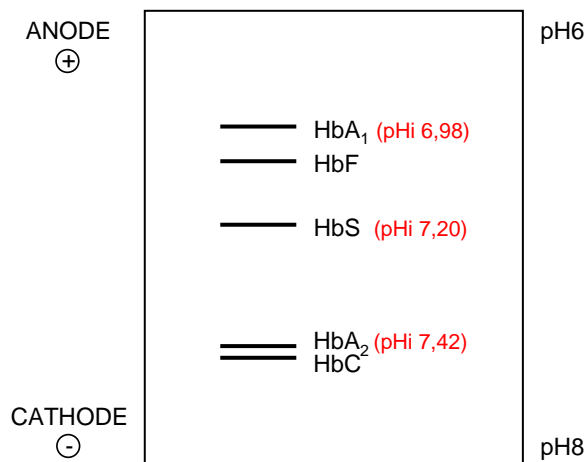


Figure 8 : Représentation de la migration en IEF des principales hémoglobines

III. HÉMORRAGIE FŒTO-MATERNELLE

III.1. Définition

L'hémorragie fœto-maternelle (HFM) correspond au passage anormal d'hématies fœtales dans la circulation sanguine maternelle. Le risque des HFM augmente avec le terme de la grossesse : seulement quatre pour cent au premier trimestre, puis 12 et 45 pour cent au deuxième et troisième trimestre et enfin 60 pour cent à l'accouchement (33). Il faut noter que des HFM surviennent au décours de toutes les grossesses, mais la plupart sont très faibles et ne sont pas détectées par les techniques usuelles de diagnostic (34). Le volume de sang transféré du fœtus à la mère permet une classification partielle des HFM : elles sont dites minimales quand le volume de sang perdu par le fœtus n'excède pas un millilitre (96% des cas) et majeures quand il dépasse 30 millilitres (0,3% des cas) (35). Toutefois, à ce jour aucun seuil consensuel du test de Kleihauer (TK) ou du volume de sang fœtal perdu n'est validé pour évoquer un retentissement fœtal car d'autres paramètres comme le stade de la grossesse, le poids du fœtus ou la rapidité d'installation de l'HFM entrent en compte (36).

III.2. Facteurs de risque

La physiopathologie de l'HFM est mal connue. L'hypothèse la plus souvent avancée est celle d'un shunt vasculaire fœto-maternel au niveau de la chambre intervillieuse expliquant les deux types de modalités de survenue clinique : aiguë pour un shunt à haut débit et chronique pour un shunt à bas débit. De plus, un processus de cicatrisation expliquerait le caractère transitoire de certaines HFM (36).

Huit HFM sur dix sont sans étiologie évidente (37). Autrement, on observe un risque accru lors d'un traumatisme abdominal (accident de la voie publique, chute, coup ou blessure) ou d'un contexte obstétrical particulier : grossesse molaire, grossesse extra-utérine (GEU), interruption de grossesse, fausse couche, mort fœtale *in utero* (MFIU), version par manoeuvres externes (VME), chirurgie abdominale ou pelvienne, amniocentèse, métrorragies, cerclage du col utérin, menace d'accouchement prématuré (MAP) ou encore lors de l'accouchement (38,39).

III.3. Conséquences

III.3.1. Anémie fœtale et néonatale

Le corollaire de la perte de sang par le fœtus est l'apparition d'une anémie.

Les phénomènes de compensation sont très actifs chez le fœtus qui peut supporter une réduction de son volume sanguin total allant jusqu'à 40 pour cent. Selon la profondeur et

la brutalité d'apparition de l'anémie, on peut observer une diminution des mouvements fœtaux actifs (MAF), des anomalies du rythme cardiaque, une anasarque fœto-placentaire (épanchement au niveau des séreuses, œdème cutané généralisé, hépato-splénomégalie, augmentation du diamètre de la veine ombilicale) voire une MFIU. Ces manifestations cliniques sont tardives et concernent des HFM massives (40,41).

Chez le nouveau-né (NN) les signes d'appel sont une pâleur, un cordon ombilical fin et exsangue, un choc hypovolémique, une détresse respiratoire qui peut se compliquer par une hypoxie ischémique cérébrale et mettre en jeu le devenir neurologique.

III.3.2. Allo-immunisation maternelle

Comme lors de toute introduction dans l'organisme de cellules du non soi, il existe un risque d'allo-immunisation si les hématies fœtales qui passent dans la circulation sanguine maternelle lors de l'HFM présentent des antigènes (Ag) érythrocytaires hérités du père différents de ceux de la mère. L'incompatibilité la plus souvent rencontrée concerne le système ABO mais les anticorps (Ac) naturels ne franchissent pas la barrière placentaire et sont donc sans risque pour le fœtus. L'allo-immunisation materno-fœtale (AMF) la plus fréquente et la plus grave survient dans le système Rhésus avec l'Ag RH1 (également nommé D). En 1971, avant la mise en place d'une immunoprophylaxie généralisée, elle touchait six à dix grossesses pour mille ; ce chiffre n'était plus que de 0,9 pour mille en 1995 (42).

Le premier contact avec les hématies fœtales incompatibles peut conduire à la synthèse d'immunoglobulines de type M (IgM) chez la mère. Cependant, la capacité à s'immuniser est variable selon les individus et selon la quantité d'Ag reçue : ainsi 20 femmes RH:-1 sur 100 ne produiront jamais d'Ac anti-RH1 malgré des contacts répétés avec l'Ag. Lors d'un nouveau contact avec l'Ag, au cours de la même grossesse ou lors d'une grossesse suivante, on observe une réactivation des immunoglobulines de type G (IgG) capables de passer le placenta. Ces IgG se fixent sur les hématies fœtales et provoquent une hémolyse par activation du système du complément (43). Ce phénomène renforce l'anémie fœtale due à l'HFM et s'accompagne d'une augmentation de la bilirubine chez le fœtus. Des manifestations cliniques graves, telles que celles observées lors d'une HFM simple, peuvent apparaître. Chez le nouveau-né, en plus des signes généraux de l'anémie se joignent ceux de l'hyperbilirubinémie. Il faut être particulièrement vigilant à la survenue d'un ictère nucléaire qui peut entraîner des séquelles psychomotrices importantes voire le décès.

Pour éviter l'AMF anti-RH1 et ses conséquences, le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF) suggère une stratégie de dépistage précoce en appréhendant le risque de chaque grossesse d'une femme RH:-1 : groupe sanguin phénotypé de la mère, et éventuellement du père, interrogatoire sur l'évolution des

grossesses précédentes, recherche d'agglutinines irrégulières (RAI), génotypage RH1 du fœtus (en cas d'immunisation anti-RH1 connue ou d'amniocentèse). Une prévention systématique par injection de Rhophylac® (immunoglobulines humaines anti-RH1 (44)) est proposée à toutes les femmes RH:-1 au deuxième trimestre et à l'accouchement, périodes les plus à risque d'HFM (tableau 5).

Tableau 5 : Recommandations pour la prévention de l'allo-immunisation anti-RH1 chez les femmes RH:-1. Adapté de (38)

Terme de la grossesse	< 15 SA	15 - 27 SA	27 - 29 SA	29 SA jusqu'à l'accouchement	Accouchement
Mesures générales	double détermination groupe sanguin + RAI génotypage fœtal sur sang maternel		RAI	RAI au 8e mois si absence de prévention systématique	groupe sanguin du bébé sur sang de cordon
Attitude	<i>Prévention ciblée si</i> - FCS - IVG ou IMG - Grossesse molaire - GEU - Métrorragies - Choriocentèse, amniocentèse - Réduction embryonnaire - Traumatisme abdominal - Cerclage cervical	<i>Prévention ciblée si</i> - Risque <u>important</u> d'HFM : IMG, FCS, MFIU, VME, traumatisme ou chirurgie abdominale ou pelvienne - Risque <u>modéré</u> d'HFM : métrorragies, cerclage cervical, MAP	Prévention systématique	<i>Prévention ciblée</i> - inutile si prévention systématique réalisée - pour risque d'HFM important (IMG, FCS ...)	Prévention systématique Abstention possible si : - < 3 sem après Rhophylac® - ET Kleihauer nég - ET Ac anti-RH1 > 6ng/ml
Test de Kleihauer	NON	OUI si risque important	NON	OUI si risque important	OUI dans les 30 min suivant la délivrance
Rhophylac®	200 µg IV (ou IM) dans les 72 heures	200 µg IV dans les 72 heures (ou + si nécessaire)	300 µg IM	200 µg IV dans les 72 heures (ou + si nécessaire)	200 µg IV dans les 72 heures rattrapage jusqu'à 30 jours

SA : semaines d'aménorrhée, RAI : recherche d'agglutinines irrégulières, FCS : fausse couche spontanée, IVG : interruption volontaire de grossesse, IMG : interruption médicale de grossesse, GEU : grossesse extra-utérine, HFM : hémorragie fœto-maternelle, MFIU : mort fœtale *in utero*, VME : versions par manœuvres externes, MAP : menace d'accouchement prématuré, Ac : anticorps, IV : intraveineux, IM : intramusculaire

III.4. Diagnostic

Dans les formes sévères d'HFM la clinique peut évoquer le diagnostic, mais il existe d'autres moyens pour attester une HFM :

- Écho-doppler :

En cas de suspicion sans signes à l'échographie, on peut profiter de cet examen pour réaliser un Doppler et visualiser le pic systolique de vélocité dans l'artère cérébrale moyenne (PSV-ACM). Cette mesure est effectivement directement liée à l'anémie : le PSV-ACM

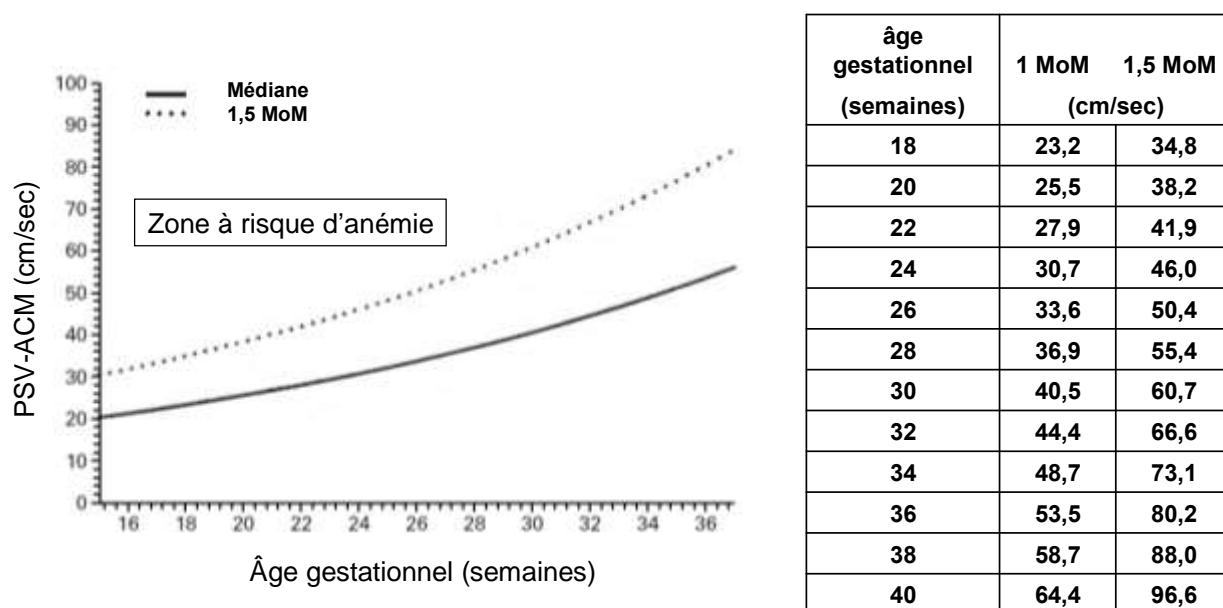


Figure 9 : Valeurs décisionnelles du PSV-ACM (45)

- Examens biologiques :

Recherche de la présence d'hématies fœtales, contenant une majorité d'HbF, dans le sang de la mère en pratiquant un test de Kleihauer (TK) ou par cytométrie en flux (CMF). On détecte alors des HFM à partir de 1 millilitre environ, soit bien plus précocement que par l'imagerie ou la clinique.

Parfois, un dosage d'alpha-fœtoprotéine (α FP), synthétisée par le tube digestif et le foie du fœtus et passant pour partie dans la circulation sanguine maternelle, est effectué. L' α FP est diminuée lors d'une souffrance fœtale mais on ne dispose pas de valeurs normales à tous les stades de la grossesse.

Dans les cas d'HFM de fœtus RH:1 et de mère RH:-1, quelques laboratoires disposent de tests d'agglutination par des Ac anti-RH1. (40)

Grâce au Doppler et aux tests biologiques, les gestes invasifs comme l'amniocentèse pour mesurer la bilirubine dans le liquide amniotique ou la ponction de sang fœtal pour le dosage de l'hémoglobine sont de moins en moins pratiqués.

III.5. Prise en charge

La prise en charge des HFM n'est pas standardisée faute de données dans la littérature. Pourtant de nombreuses interrogations sont soulevées : poursuite ou interruption de la grossesse, type de surveillance et rythme de suivi, possibilité d'un accouchement par voie basse, indications de la transfusion *in utero* (TIU). Dans la pratique, la conduite à tenir est définie et adaptée selon le terme de la grossesse, la présence de signes cliniques et les résultats biologiques (36).

La prise en charge thérapeutique est mieux établie dans le cadre d'allo-immunisation materno-fœtale. En cas d'anémie fœtale sévère, la TIU peut être envisagée au-delà de 18 SA et réalisée toutes les deux à quatre semaines avec des culots globulaires de groupe O RH-1, de phénotype identique à la mère pour les antigènes les plus immunogènes, frais (moins de sept jours), irradiés, testés négatif pour le cytomégalovirus. L'accouchement, après corticothérapie pour développer le système pulmonaire, est envisageable dès 30 SA, et souvent pratiqué à partir de 34 SA (42). Après la naissance, une photothérapie est instaurée pour prévenir l'ictère néonatal. Si l'hyperbilirubinémie est massive une exsanguino-transfusion (EST) peut être conseillée en raison de son efficacité, mais le taux de mortalité suivant cet acte est de l'ordre de un pour cent. En alternative à l'EST, des immunoglobulines polyvalentes intraveineuses peuvent être administrées : par un mécanisme mal connu elles aident à diminuer l'hémolyse et améliorent le pronostic. On relate cependant des cas d'entérocolites ulcéro-nécrosantes consécutives à ce traitement. Dans tous les cas, la prise en charge du nouveau-né doit se faire dans une unité de réanimation par une équipe pluridisciplinaire (46).

Le pronostic de la mère est rarement péjoratif. La prise en charge consiste à éviter l'AMF RH1 lors d'HFM incompatibles par l'administration prophylactique de Rhophylac® selon le protocole décrit dans le tableau 6.

Tableau 6 : Adaptation des doses de Rhophylac® en fonction du résultat du test de Kleihauer (38)

Test de Kleihauer (pour 10000 GR)	Dose de 200 µg		Dose de 300 µg		Voie d'administration
	nb de doses	µg	nb de doses	µg	
0-4	1	200	1	300	IV directe
5-24	1	200	1	300	
25-44	2	400	1	300	
45-64	2	400	2	600	
65-84	3	600	2	600	Perfusion sur 4 heures dans 250 ml de NaCl 9 ‰
85-104	3	600	2	600	
105-124	4	800	3	900	
125-144	4	800	3	900	
145-164	5	1000	3	900	
165-184	5	1000	4	1200	
185-204	6	1200	4	1200	
205-224	6	1200	4	1200	
225-244	7	1400	5	1500	
245-264	7	1400	5	1500	
265-284	8	1600	5	1500	
285-304	8	1600	6	1800	

IV. DÉTECTION DES HÉMATIES FŒTALES

IV.1. Test de Kleihauer

IV.1.1. Principe

Le test de Kleihauer (TK) a pour vocation de mettre en évidence les hématies fœtales présentes dans la circulation sanguine maternelle. Il est fondé sur la différence de résistance des hémoglobines fœtales et adultes à l'éluion à pH acide (47). Depuis 1957 la technique a été peu modifiée et reste la référence malgré sa réalisation manuelle. Pour observer les hématies, on prépare un frottis fin à partir de sang prélevé sur tube EDTA séché à l'air libre et fixé à l'alcool. On élue ensuite l'hémoglobine adulte par l'hématoxyline acide avant de contre-colorer par l'éosine. Les frottis colorés sont regardés au microscope et les hématies fœtales éventuellement présentes, colorées en rose, sont décomptées par rapport au nombre d'hématies maternelles, qui apparaissent comme des "fantômes" (48). Pour valider la bonne réalisation des différentes étapes, on effectue en parallèle deux lames témoins (négatif et positif).

IV.1.2. Indications

Le TK est utilisé pour détecter les HFM et doit être prescrit dans toutes les situations à risque pendant la grossesse, déjà mentionnées précédemment, et lors de l'accouchement en cas de risque d'AMF anti-RH1 ou en cas de suspicion de saignement important. Le résultat rendu sert à affirmer ou infirmer l'HFM mais aussi à évaluer l'importance du saignement. En effet, il existe une relation entre la valeur du TK et le volume de sang perdu par le fœtus. Le volume sanguin perdu est déterminé par une équation qui tient compte du pourcentage d'HbF des hématies fœtales (90%), du volume globulaire moyen (120 μ l) d'une hématie fœtale, du volume globulaire de la mère (1800 ml) et de l'hématocrite (50%) (49).



Grâce à la formule simplifiée, on évalue rapidement le volume de l'HFM. Par exemple, un TK positif à 10/10000 correspond à une perte de sang fœtal de 5 ml.

Ce résultat est très important pour le clinicien puisqu'il détermine la prise en charge : surveillance accrue de la grossesse, adaptation des doses de Rhophylac®.

Le volume d'HFM doit être relativisé au volume sanguin total qui peut être estimé sachant qu'un nouveau-né possède 80 à 90 millilitres de sang par kilogramme (50).



Soit pour un nouveau-né à terme de 3 kg un volume sanguin total d'environ 250 ml.

IV.1.3. Limites

a) Avantages

Le TK est facile à mettre en place au laboratoire : sa réalisation est rapide et demande des réactifs peu coûteux. De plus le bénéfice pour le patient est grand puisque le prélèvement est peu invasif et le test plus sensible que la clinique.

b) Inconvénients

Malheureusement, le TK nécessite un opérateur expérimenté puisqu'il faut estimer correctement le nombre d'hématies observées sur chaque champ au microscope, et parfois faire la différence entre des dégradés de coloration rose. Ainsi le TK souffre de son manque de reproductibilité (51) qui peut être partiellement corrigé par un système de lecture automatisé réservé à des laboratoires ayant un recrutement très important (52). Outre la variabilité analytique, ce test peut rendre des résultats faussement négatifs : incompatibilité materno-fœtale, injection d'immunoglobulines qui augmentent la rapidité de destruction des hématies fœtales, ou encore prélèvement précoce au cours d'une HFM débutante. Cependant le problème majoritairement rencontré est l'interférence de l'HbF des hématies maternelles induisant des résultats faussement positifs (53–55). En effet, c'est la quantité d'HbF dans les hématies qui donne une couleur plus ou moins rose. En cas normal, les F-

cells de la mère ont une coloration pâle dite "intermédiaire" aisément distinguable par un lecteur expérimenté. En revanche, en cas d'hémoglobinopathie les hématies de la mère ont plus d'HbF et donc une coloration plus intense : il est impossible de les différencier des globules rouges fœtaux.

IV.2. Cytométrie en flux

IV.2.1. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) permet d'évaluer individuellement et simultanément plusieurs paramètres sur chaque élément présent dans une suspension, préalablement marqué par des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes. En hématologie, elle est particulièrement employée pour étudier les populations leucocytaires mais son utilisation se développe pour caractériser les hématies : diagnostic des hémoglobinuries paroxystiques nocturnes ou des infections palustres notamment (56). (57)

La CMF fait appel à différentes technologies : fluïdique, optique et électronique (figure 10). Une suspension cellulaire est introduite par une pompe au centre d'une gaine pressurisée. Les cellules sont hémodynamiquement contraintes par un flux liquidien de s'aligner et de défiler une à une dans la zone d'analyse, devant une ou plusieurs sources d'excitation lumineuse (laser). Des informations morphologiques sont apportées par deux paramètres indépendants de la fluorescence : la taille est donnée par la mesure de la lumière diffractée à 180 degrés (forward angle scatter, FS) et la granularité est indiquée par la mesure de la lumière émise à 90 degrés (right angle scatter, SS). Les fluorochromes sont capables d'absorber l'énergie lumineuse provenant du laser à une longueur d'onde proche de leur maximum d'absorption, puis de la libérer par émission de photons de longueur d'onde supérieure. Les fluorochromes les plus utilisés sont l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et la phycoérythrine (PE). Les photons émis sont focalisés puis séparés par une alternance de miroirs dichroïques, qui transmettent les longueurs d'onde non réfléchies, et de filtres, qui ont une bande passante sélective. Les signaux optiques détectés sont transformés en signaux électroniques proportionnels par des photomultiplicateurs (PMT) et digitalisés pour être représentés informatiquement sous forme d'histogrammes. Sur chaque population sélectionnée on peut alors obtenir des informations statistiques quantitatives et qualitatives : nombre de cellules, intensité de fluorescence, etc. (58)

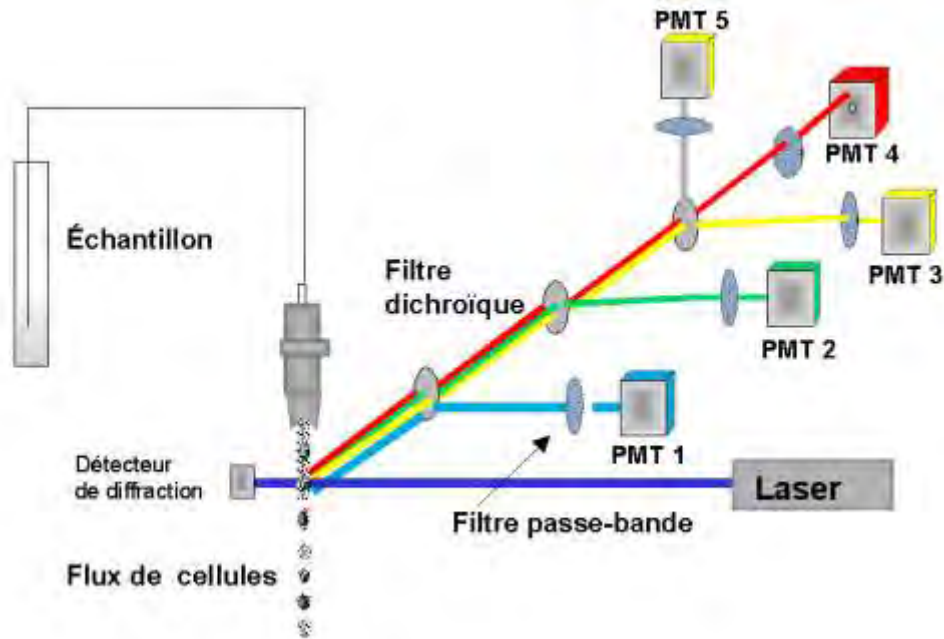


Figure 10 : Principe de la cytométrie en flux (59)

IV.2.2. Applications à la détection des hématies fœtales

Depuis quelques années, différents anticorps ont été utilisés pour caractériser les hématies fœtales au sein d'une population maternelle. Les premiers essais employaient des anticorps monoclonaux anti-RH1 (60), les antigènes rhésus étant présents à la surface des hématies dès la sixième semaine de gestation (61). Les applications se réduisaient donc au diagnostic des HFM de fœtus RH:1 et de mère RH:-1 et à l'adaptation des doses d'immunoglobulines administrées pour éviter l'allo-immunisation maternelle. Puis, rapidement, l'utilisation d'anticorps anti-HbF s'est développée (62–65) pour identifier les hématies fœtales par leur quantité d'HbF supérieure à celle de la mère.

Selon les protocoles, des doubles marquages sont proposés pour mieux distinguer les populations maternelles et fœtales : Ac anti-RH1 et Ac anti-HbF (66), Ac anti-HbF et Ac anti-anhydrase carbonique (67) normalement uniquement présente dans les hématies adultes. Les protocoles sont semblables : recueil de sang sur tube EDTA, fixation des hématies par le glutaraldéhyde, perméabilisation si nécessaire par du Triton X-100, marquage par les Ac couplés à un fluorochrome, acquisition de 50000 ou 100000 cellules sur le cytomètre et exploitation des résultats sur des histogrammes mono ou biparamétriques.

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Le test de Kleihauer (TK) est une technique manuelle dont l'interprétation peut être compliquée en présence d'hématies intermédiaires et dont le décompte est peu reproductible en cas de positivité. Pour ces raisons, nous avons souhaité évaluer un nouveau kit de cytométrie en flux (CMF) permettant de détecter les hématies fœtales présentes dans la circulation sanguine maternelle grâce à un anticorps monoclonal anti-HbF.

Ce travail a tout d'abord consisté à mettre au point la technique sur le cytomètre du laboratoire, puis d'évaluer les résultats ainsi obtenus en les comparant à ceux du TK. Notre objectif était de répondre à plusieurs questions : les résultats de CMF sont-ils corrélés à ceux du TK, la précision de la CMF est-elle satisfaisante, la CMF peut-elle aider à la détection des hématies fœtales dans les cas d'interprétation difficile (présence d'hématies intermédiaires) ? Nous voulions également évaluer la faisabilité de la CMF (conservation du prélèvement, délai de réalisation, qualification du personnel) afin d'établir une stratégie de prise en charge des recherches d'hématies fœtales au laboratoire. En effet, nous avons essayé de montrer si une technique était meilleure que l'autre ou si les deux devaient coexister dans un arbre décisionnel en prenant en compte les avantages et les inconvénients de chacune des deux techniques.

En parallèle, nous nous sommes intéressés aux patients atteints d'hémoglobinopathie, dont la clinique et le traitement reposent sur l'augmentation de l'HbF dans les hématies, afin d'évaluer l'apport de la CMF pour différencier les hématies fœtales des hématies adultes riches en HbF. Conventionnellement, le suivi de ces patients est réalisé en pratiquant des électrophorèses de l'hémoglobine, qui mesurent la quantité d'HbF totale présente dans les hématies, alors que certaines études montrent que la réponse est fonction de la répartition de l'HbF dans les hématies (68,69), donnée qui pourrait être apportée par la CMF.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

I. POPULATIONS ÉTUDIÉES

1.1. Patientes en contexte obstétrical

Du 20 juin au 12 décembre 2012, les demandes de test de Kleihauer (TK) enregistrées au laboratoire de l'hôpital Saint Philibert, du Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille (GHICL), étaient traitées de façon à pouvoir être incluses dans notre protocole. Les échantillons sanguins, prélevés sur tube EDTA, étaient homogénéisés et séparés dans deux tubes : les aliquotes, étaient placées au réfrigérateur (4°C) en l'attente de leur éventuelle prise en charge en CMF, tandis que les tubes primaires suivaient la voie normale de réalisation du TK.

Sur l'ensemble de cette période, seules certaines demandes de TK ont été recrutées pour notre étude. Dans un premier temps toutes les demandes ont fait l'objet d'un passage en parallèle avec chaque technique (microscopie et CMF). Puis, après obtention d'un nombre suffisant de résultats négatifs, nous nous sommes concentrés sur les résultats de TK positifs ou d'interprétation difficile. Lors de cette deuxième phase, nous avons bénéficié de la collaboration du laboratoire du Centre Hospitalier de Valenciennes (CHV) et ainsi pu augmenter notre recrutement.

Pour chaque patiente, nous avons recueilli les renseignements démographiques et cliniques (âge, service demandeur, groupe sanguin, indication).

1.2. Témoins

1.2.1. Commerciaux

Afin d'évaluer notre technique de CMF, la société Beckman Coulter a mis à notre disposition un kit de contrôle de détection des hématies fœtales comprenant trois niveaux de valeurs d'hématies fœtales comme indiqué dans le tableau 7.

Tableau 7: Valeurs fournisseur pour le contrôle FETALtrol™

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Valeur attendue (pour 10000GR)	0-3	10-22	118-178

I.2.2. Préparés au laboratoire

Les témoins négatifs utilisés sont des sangs de patientes ayant un TK négatif.

Pour simuler une hémorragie foeto-maternelle, nous devons disposer d'échantillons positifs à taux connus et pertinents : pour cela, nous avons préparé des mélanges de sang de nouveau-né de moins de trois jours avec du sang de témoin négatif à 5, 10, 20, 25, 40, 50 et 100 hématies fœtales pour 10000 hématies adultes.

Pour étudier la capacité de la technique de cytométrie de mettre en évidence des hématies fœtales en présence d'hématies intermédiaires de la mère, nous avons également procédé à des mélanges de sang de nouveau-né avec du sang de patients possédant des hématies intermédiaires au TK.

I.3. Patients atteints d'hémoglobinopathie

En plus des patientes enceintes pouvant présenter une augmentation d'HbF, nous avons souhaité inclure dans notre étude des patients pouvant avoir une franche augmentation d'HbF. En effet, nous avons voulu tester la capacité de la technique de CMF à détecter les hématies contenant de l'HbF et étudier si la CMF était capable de distinguer les hématies fœtales des hématies adultes contenant de l'HbF. Grâce au concours de Monsieur le Professeur Rose (Hôpital Saint Vincent de Paul, GHICL) et du laboratoire du Centre Hospitalier de Valenciennes, nous avons obtenu des prélèvements sanguins de patients drépanocytaires ou thalassémiques. Nous réalisons alors un TK, une quantification par CMF et une électrophorèse de l'hémoglobine (analyse envoyée au Centre de Biologie Pathologie du Centre Hospitalier et Universitaire de Lille).

II. DÉTECTION DES HÉMATIES FŒTALES

II.1. Test de Kleihauer

Le TK est une technique de mise en évidence des hématies fœtales sur un frottis sanguin coloré de façon appropriée.

Le tube EDTA est conservé à température ambiante jusqu'à 72 heures suivant le prélèvement et réalisation du protocole suivant :

- faire un frottis fin sur une lame identifiée
- laisser sécher à l'air
- fixer par de l'éthanol à 80% pendant 5 minutes
- ôter l'alcool et laisser sécher 10 minutes minimum

- recouvrir la lame avec une solution d'hématoxyline pendant 20 à 25 secondes. Cette solution est préparée extemporanément comme suit :
 - o 2 ml de solution 1 (0,75 g d'hématoxyline poudre - 100 ml d'éthanol absolu)
 - o 1 ml de solution 2 (2,4 g de chlorure ferrique - 2 ml d'acide chlorhydrique à 25% - eau distillée en quantité suffisante pour un volume final de 100 ml)
 - o 1 ml d'éthanol à 80%
- rincer à l'eau courante
- contre-colorer avec une solution d'éosine à 0,5% pendant 5 minutes
- rincer à l'eau courante
- laisser sécher verticalement
- lecture au microscope à l'objectif 50 ou 100 à immersion au niveau de la zone où les hématies sont contiguës et non chevauchantes

La technique est validée par l'observation des lames témoins, préalablement étalées, fixées à l'éthanol et conservées au réfrigérateur (4°C), colorées en parallèle. On choisit comme témoin négatif le sang d'une patiente dont le TK est négatif : les hématies apparaissent translucides, telles des fantômes. Le témoin positif est confectionné avec un mélange de sang adulte sain (9 gouttes) et un sang de nouveau-né (1 goutte) : on observe alors des hématies roses laquées (celles du bébé) en plus des hématies translucides majoritaires.

Le résultat est rendu négatif, soit inférieur à 1 hématie foetale pour dix mille hématies maternelles (<1/10000) si on visualise uniquement des hématies translucides. En revanche, si on détecte des hématies roses laquées, il faut procéder à un décompte précis des hématies foetales. On regarde dix mille hématies soit vingt champs de 500 cellules à l'objectif 50 ou cinquante champs de 200 cellules à l'objectif 100 et on rend le TK positif accompagné du nombre d'hématies foetales observées. Il faut noter que les hématies dites intermédiaires c'est-à-dire présentant une coloration rose pâle, un halo clair ou des bulles, ne doivent pas entrer dans le compte des hématies foetales.

II.2. Cytométrie en flux

II.2.1. Technique

Le principe de la technique de CMF consiste à mettre en évidence les hématies foetales à partir d'une suspension cellulaire. Nous avons travaillé sur le kit FMH QuikQuant™ de Trillium : l'iodure de propidium, colorant qui intègre l'ADN, permet d'identifier les éléments nucléés tandis que les globules rouges sont perméabilisés et marqués par un anticorps monoclonal anti-HbF.

a) Préparation de l'échantillon

Le tube EDTA peut être conservé à température ambiante s'il est techniqué dans les quatre heures suivant le prélèvement. Dans le cas contraire, il est placé au réfrigérateur (4°C) jusqu'à sa prise en charge qui doit intervenir dans les 72 heures. Le protocole de préparation est le suivant :

- diluer au 1/20 le sang à tester dans la solution de travail tampon FMH QuikQuant™
 - o 5 µl de sang prélevé sur EDTA
 - o 95 µl de solution de travail tampon FMH QuikQuant™
- vortexer 5 secondes
- déposer 10 µl de cette dilution dans un nouveau tube à hémolyse
- ajouter 750 µl de solution de glutaraldéhyde à 0,03% préparée extemporanément
- vortexer immédiatement 5 secondes
- boucher et incuber sur l'agitateur 10 minutes
- ajouter 1500 µl de solution de perméabilisation Trillium Intra-Cell™
- boucher et vortexer 5 secondes exactement
- incuber sur l'agitateur 10 minutes
- centrifuger à 600 g (2000 tr/min) 5 minutes
- enlever le surnageant par retournement
- vortexer 15 secondes pour remettre les hématies en suspension
- ajouter 10 µl d'anticorps monoclonal anti-HbF et d'iodure de propidium Trillium FMH QuikQuant™, puis 40 µl de solution de travail tampon FMH QuikQuant™
- vortexer 5 secondes
- incuber à l'obscurité 10 minutes (éviter le contact avec la lumière à partir de cette étape)
- ajouter 1000 µl de solution de travail tampon FMH QuikQuant™
- vortexer doucement
- ajouter 1000 µl de solution de travail tampon FMH QuikQuant™
- vortexer doucement
- incuber à l'obscurité 30 secondes
- centrifuger à 600 g (2000 tr/min) 5 minutes
- enlever le surnageant par retournement
- ajouter 1000 µl de solution de travail tampon FMH QuikQuant™

b) Passage sur le cytomètre

L'échantillon marqué, remis en suspension, est passé sur le cytomètre FC 500 de Beckman Coulter dans le protocole intitulé KLEIHAUER. L'acquisition porte sur 50000 hématies. Après intégration des données dans le logiciel CXT™ Cytometer en fichiers ListMode on obtient différents histogrammes (figure 11).

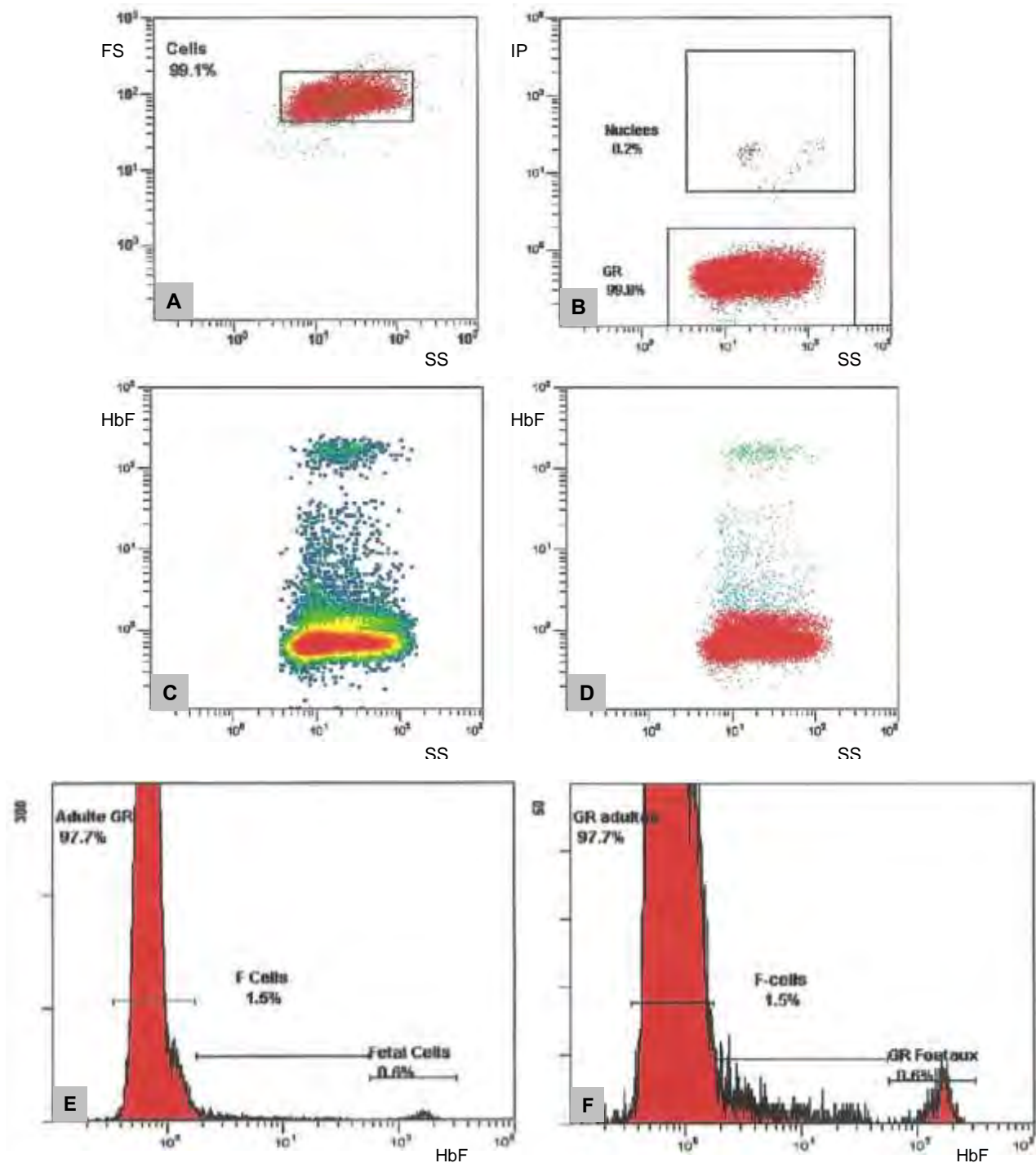


Figure 11 : Analyse du fichier ListMode d'un échantillon contenant des hématies foétales en CMF

A : l'histogramme taille (FS) / structure (SS) permet de cibler l'ensemble des cellules à analyser qui sont sélectionnées dans une fenêtre nommée "Cells".

B : l'histogramme iodure de propidium (IP) / structure est utilisé pour sélectionner les hématies ("GR") dans la population "Cells". En effet, l'IP est un colorant qui s'intègre à l'ADN et qui permet de discriminer les éléments nucléés de la préparation afin de les éliminer. Tous les histogrammes suivants sont réalisés à partir de la population "GR".

C : cet histogramme HbF / structure visualise les intensités de fluorescence : en rouge pour les maximums et en bleu pour les minimums.

D : cet histogramme HbF / structure montre les trois populations définies sur les graphiques suivants par des couleurs différentes : GR adultes en rouge, "F-cells" en bleu et GR foétales en vert.

E et F : ces deux histogrammes monoparamétriques représentent le nombre d'hématies observées selon deux échelles. A l'échelle maximale 300 (figure E) on a une vue d'ensemble des trois pics : les hématies adultes dépourvues d'HbF sont non fluorescentes, les hématies foétales contenant près de 100% d'HbF sont les plus fluorescentes et les hématies intermédiaires contenant un peu d'HbF (F-cells) se situent entre les deux. A l'échelle 50 (figure F) on observe mieux la vallée entre les hématies intermédiaires (F-cells) et foétales qu'on souhaite dénombrer.

II.2.2. Mise au point technique

a) Concentration de glutaraldéhyde

La concentration de glutaraldéhyde de la préparation est essentielle pour l'interprétation des résultats. En effet c'est elle qui détermine la résolution (séparation et finesse des pics). Nous avons donc procédé à différents essais de concentration (0,015%, 0,02%, 0,025% et 0,03%) pour nous assurer que la recommandation du fournisseur d'utiliser le glutaraldéhyde à 0,03% était la plus appropriée.

b) Conservation des prélèvements

La société Trillium indique que les échantillons sanguins doivent être prélevés sur tube EDTA et techniqués dans les quatre heures suivant leur recueil, ou conservés au réfrigérateur (4°C) pendant 72 heures maximum avant la réalisation du test. Nous avons voulu confirmer cette affirmation et évaluer l'impact d'un mode de conservation différent. Pour cela, nous avons pris un témoin négatif et deux témoins positifs : mélanges de sang de nouveau-né avec un témoin négatif de valeurs attendues à 5/10000 et 20/10000. Les trois échantillons ont été techniqués à J0, puis aliquotés pour les conserver en parallèle à température ambiante et au réfrigérateur (4°C). Chaque aliquote était préparée de nouveau à J1, J2 et J3 et passée sur le cytomètre dans la foulée, nous donnant alors sept valeurs pour un même prélèvement.

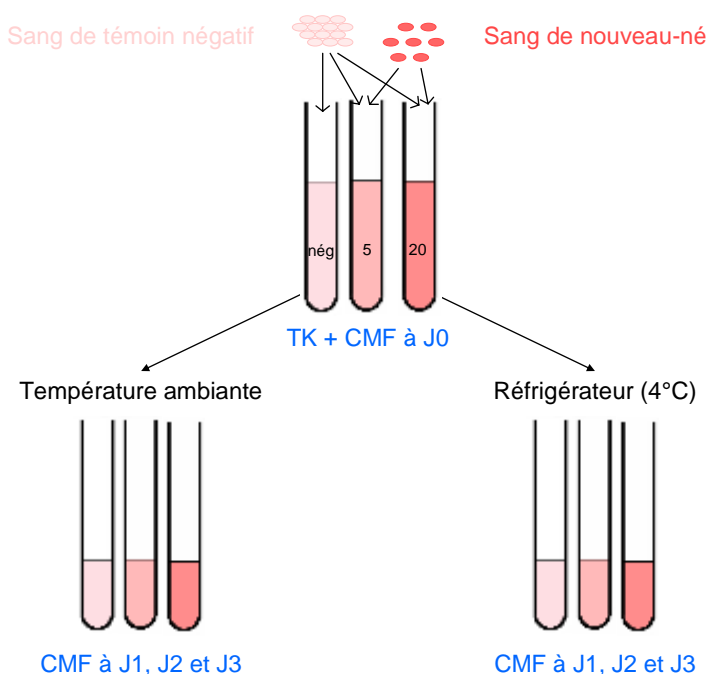


Figure 12 : Schéma de préparation du test de conservation

II.3. Vérification de méthode

Dans le cadre de l'accréditation, selon les recommandations du COFRAC (COMité FRançais d'ACcréditation), lors de la mise en place d'une nouvelle méthode ou d'une modification de méthode, il faut procéder à sa validation ou à sa vérification en évaluant différents critères reportés dans le tableau 8 (70).

Tableau 8 : Vérification initiale d'une méthode quantitative

Paramètres à vérifier et/ou à connaître	Bibliographie	Vérification sur site
Spécificité	Oui	Non
Fidélité	Oui	Oui
Justesse (approche de la)	Oui	Oui, dès que possible
Intervalle de mesure (LQ et limites de linéarité)	Oui	Si nécessaire
Incertitudes	Oui	Oui
Contamination (entre échantillons)	Oui	Oui, pour les paramètres sensibles
Stabilité réactifs	Oui	Non
Robustesse	Non	Non
Interférences	Oui	Si nécessaire
Intervalle de référence	Oui	Dès que possible, si justifié
Comparaison avec une méthode de référence	Oui (si existe)	Non
Comparaison avec une méthode déjà utilisée au laboratoire	Oui (si existe)	Oui (si possible)
Analyse des discordances	Oui	Oui

II.3.1. Fidélité

Il s'agit de l'étroitesse d'accord entre les différentes valeurs mesurées. Elle reflète l'erreur aléatoire.

a) Répétabilité

C'est la caractérisation de la meilleure performance possible dans les conditions optimales et la vérification du bon fonctionnement du système pour le paramètre concerné. On analyse un même échantillon dans des conditions standardisées : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage, dans une même série pour les niveaux bas, moyen et haut et dans un délai le plus court possible. Il est recommandé d'utiliser au minimum deux niveaux de valeurs judicieusement choisies et de réaliser 30 essais pour une interprétation statistique optimale. Cependant, comme pour toutes les autres rubriques, on peut décider de pratiquer moins de mesures en argumentant ce choix, notamment le coût de l'analyse.

L'exploitation des résultats consiste à calculer :

- la moyenne (m) : $m = \frac{\sum x_i}{N}$

- l'écart-type (ET) : $ET = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (x_i - m)^2}$

- et le coefficient de variation (CV) : $CV = \frac{ET}{m} \times 100$

des valeurs expérimentales de chaque série et à les comparer aux limites d'acceptabilité définies au préalable par le laboratoire (fournisseur, SFBC, Ricos,...).

b) Reproductibilité ou fidélité intermédiaire

On analyse un même échantillon, classiquement les contrôles internes de qualité, dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : opérateur, temps, lot de réactifs, étalonnage... Idéalement elle est établie sur au moins 15 jours avec 30 déterminations de deux niveaux minimum.

Comme pour la répétabilité, on calcule la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation qui sera comparé au coefficient de variation limite préalablement fixé.

II.3.2. Justesse

C'est l'écart d'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et la "valeur vraie". Elle reflète l'erreur systématique.

On compare sur différents dosages l'écart entre la moyenne trouvée pour la reproductibilité et la valeur cible (v), qui en biologie s'approche le plus de la valeur vraie. On

calcule le biais, exprimé en pourcentage de la valeur cible : $\text{biais} = \frac{m - v}{v} \times 100$

II.3.3. Estimation de l'incertitude

L'incertitude est un résultat combiné de différentes composantes : incertitude due à la fidélité et incertitude liée à la justesse auxquelles peut s'ajouter l'incertitude due à l'étalonnage ou à tout autre facteur de variabilité propre à la méthode.

Incertitude due à la fidélité : $u_1 = ET_{\text{reproductibilité}}$

Incertitude due à la justesse : $u_2 = \frac{\text{biais}}{\sqrt{3}}$

Incertitude combinée : $u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2}$

On calcule enfin l'incertitude élargie : $U=2\times u_c$

On peut alors exprimer le résultat comme $R = \text{valeur mesurée} \pm U$. Dans le cas d'une distribution gaussienne, l'intervalle compris contiendra la valeur vraie à 95%.

II.3.4. Limite de détection (LD)

C'est le plus petit signal exprimé en quantité ou en concentration qui peut être distingué avec une probabilité donnée d'un blanc de réaction réalisé dans les mêmes conditions. Pour l'estimer, on effectue 30 mesures répétées des blancs dans une même série et on calcule la moyenne et l'écart-type, puis la limite de détection selon la formule :

$$LD = 3 \times ET .$$

II.3.5. Limite de quantification (LQ)

C'est la plus petite valeur exprimée en quantité ou en concentration qui peut être rendue avec un niveau de confiance acceptable et une incertitude connue. On peut la calculer à partir de la série de résultats précédents selon la formule : $LQ = 10 \times ET$.

II.3.6. Comparaison de méthodes

Après vérification de la répétabilité, de la reproductibilité, de la justesse, des limites de détection et de quantification et des limites de linéarité, on peut envisager de comparer la nouvelle méthode (Y) à l'ancienne méthode ou à la méthode de référence (X).

Les échantillons sont analysés en simple avec chacune des méthodes dans le délai le plus court possible. On essaie de choisir 30 échantillons de patients couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré.

On nomme x_i les valeurs obtenues avec la méthode X et y_i celles de la méthode Y. Pour chaque couple, on calcule les différences $d_i = x_i - y_i$ et les rapports $q_i = y_i/x_i$. Puis on trace les graphiques $d_i = f(x_i)$ et $q_i = f(x_i)$. En cas de discordances on en analyse les causes.

Des données pertinentes peuvent être apportées par l'équation de la droite de régression dont la pente (idéalement égale à 1) et l'ordonnée à l'origine (idéalement égale à 0) expriment la similitude des méthodes comparées.

RÉSULTATS

I. POPULATION ÉTUDIÉE

1.1. Patientes en contexte obstétrical

Du 20 juin 2012 au 12 décembre 2012, 383 demandes de TK ont été formulées au laboratoire du GHICL : 169 en provenance de la maternité, 123 des urgences obstétriques, 87 des consultations d'obstétrique et 4 d'autres services. En moyenne, près de 13,5% des

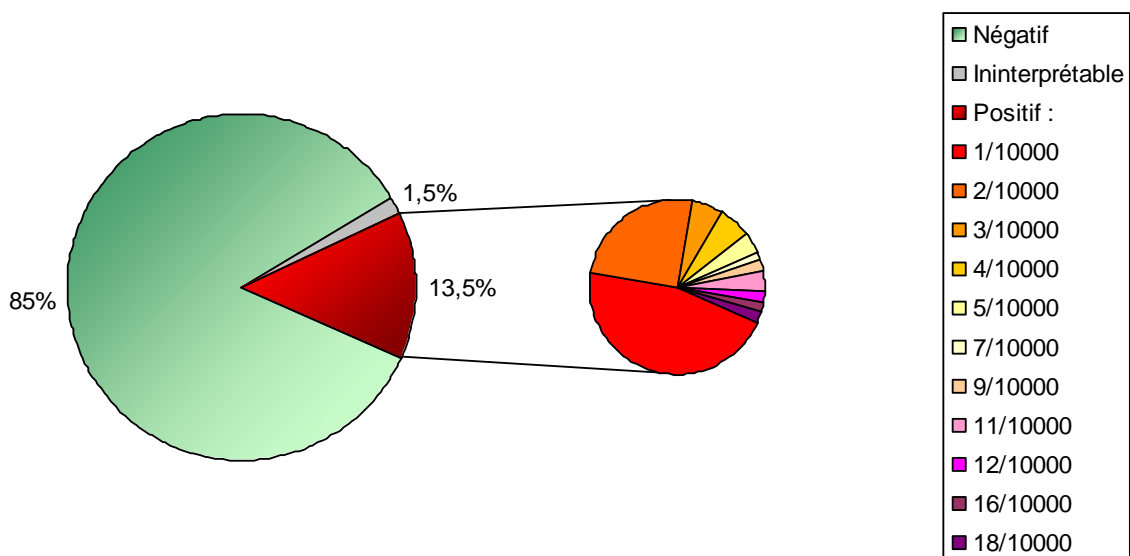


Figure 13 : Résultats des TK pour toutes les demandes du 20 juin au 12 décembre 2012

Notre étude a porté sur une sélection de 78 patientes âgées de 19 à 42 ans. Soixante-douze prélèvements ont été inclus à partir des échantillons du laboratoire Saint Philibert : 42 négatifs, 9 avec des hématies intermédiaires et 21 positifs. Sur les 21 demandes positives, 12 provenaient de la maternité pour des patientes RH:-1 venant d'accoucher, les autres émanaient des consultations obstétricales (six) et des urgences obstétricales (trois) : la plupart dans des contextes de métrorragies, menace d'accouchement prématuré ou de traumatisme abdominal.

De plus, six prélèvements positifs du Centre Hospitalier de Valenciennes sont venus enrichir notre sélection : deux, fortement positifs, issus de la maternité dans le cadre de la prévention de l'allo-immunisation materno-fœtale et quatre autres pour deux patientes enceintes consultant à la suite d'un traumatisme abdominal (coups ou chute).

1.2. Témoins

En plus du contrôle commercial stabilisé (FETALtrol™ niveau 3), nous avons utilisé deux témoins négatifs et confectionné douze témoins positifs : mélanges de sang de nouveau-né et de témoin négatif, de valeurs attendues comprises entre 5/10000 et 100/10000.

Nous avons également réalisé un mélange de sang de nouveau-né (à trois concentrations : 5/10000, 10/10000 et 25/10000) avec du sang d'une patiente dont le TK comportait des hématies intermédiaires. Enfin, nous avons effectué un mélange de sang de nouveau-né avec du sang d'une autre patiente possédant des hématies intermédiaires à 20/10000.

1.3. Patients atteints d'hémoglobinopathie

Nous avons recueilli les échantillons sanguins de treize patients souffrant d'hémoglobinopathie : sept drépanocytaires et six thalassémiques. Dix patients sont suivis au GHICL et trois proviennent du CHV.

Nous avons aussi préparé deux mélanges au dixième de sang de nouveau-né avec du sang de deux drépanocytaires afin de voir si la CMF permettait de faire la différence entre les populations d'hématies adultes contenant beaucoup d'HbF et d'hématies fœtales.

Au total, ce sont 110 échantillons différents qui ont été inclus dans cette étude (tableau 9).

Tableau 9 : Répartition des différents groupes d'échantillons

	POPULATION	NOMBRE
Patientes	TK négatif	42
	TK positif	27
	TK avec GR intermédiaires	9
Hémoglobinopathie	Drépanocytose	7
	Thalassémie	6
Mélanges	Témoins positifs (TK nég + NN)	12
	TK avec GR intermédiaires + NN	4
	Drépanocytose + NN	2
	Contrôle FETALtrol™	1

II. TEST DE KLEIHAUER

II.1. Coloration

La figure 14 rappelle les différents aspects que peuvent prendre les hématies. Les hématies translucides sont des hématies adultes, les hématies rose laqué sont des hématies fœtales, et les autres sont dites intermédiaires.

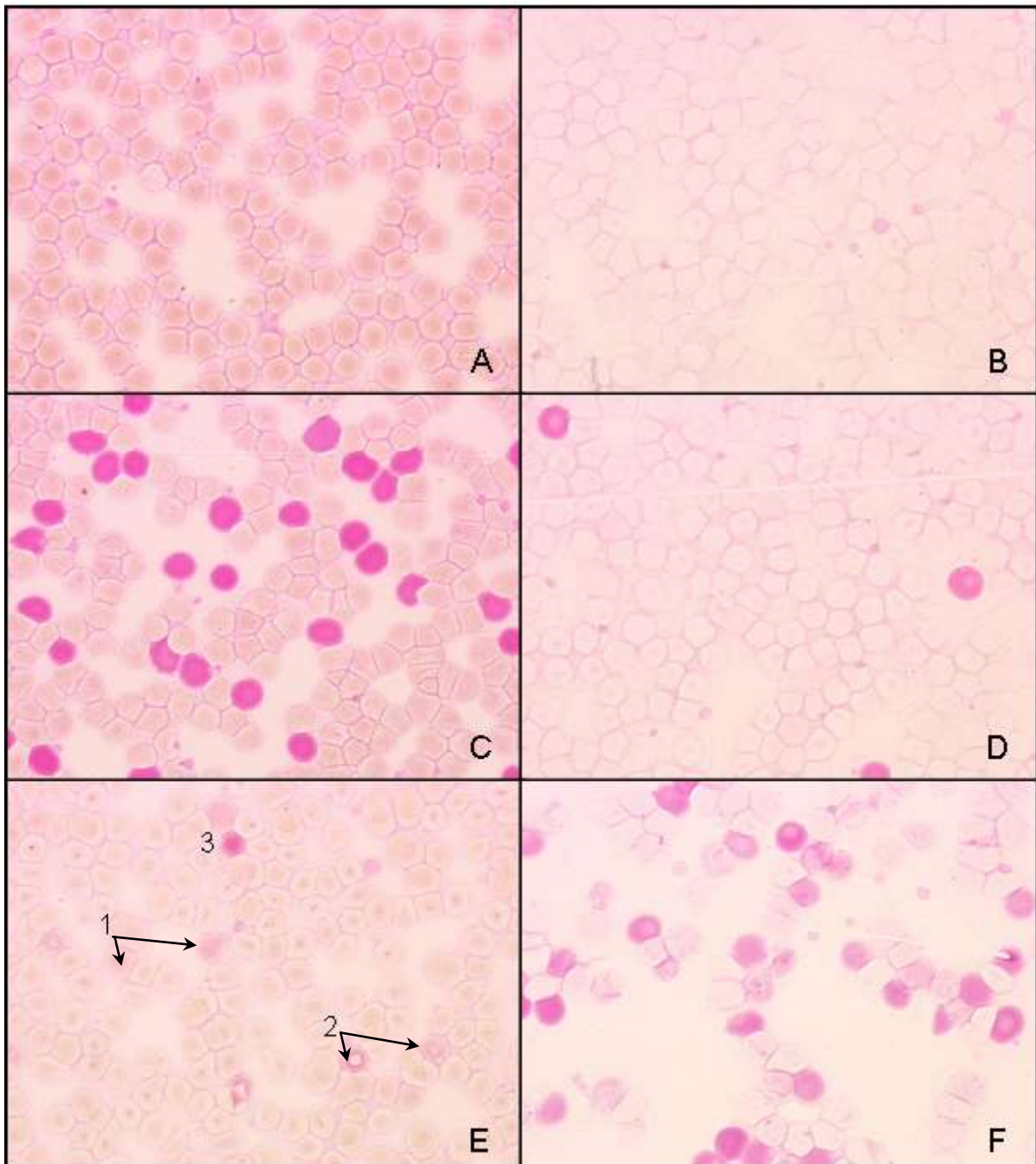


Figure 14 : TK : Coloration de différents frottis sanguins. **A** et **B** : TK négatifs ; **C** : Témoin positif ; **D** : TK positif ; **E** et **F** : présence d'hématies intermédiaires (1 : rose pâle, 2 : bulles, 3 : halo clair)

II.2. Évaluation de la technique du test de Kleihauer

II.2.1. Fidélité

a) Répétabilité

A partir de trois témoins positifs (à 5/10000, 20/10000 et 50/10000) et d'un témoin négatif, nous avons réalisé des frottis colorés selon le protocole classique. Ces quatre frottis ont été lus successivement dix fois par le même opérateur le même jour. Nous avons ainsi pu calculer la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation pour chaque série de données qui sont les paramètres permettant d'évaluer la répétabilité.

Tableau 10 : Caractéristiques des dix lectures des quatre frottis de TK

Valeur attendue (pour 10000 GR)	0	5	20	50
Résultats des dix lectures de TK	0	6	75	106
	0	7	55	134
	0	10	68	108
	0	15	57	132
	0	3	57	120
	0	8	61	123
	0	7	55	134
	0	10	42	136
	0	12	49	99
	0	8	66	136
Minimum	0	3	42	99
Maximum	0	15	75	136
Moyenne	0	8,6	58,5	122,8
Écart type	0	3,3	9,5	14,0
Coefficient de variation (%)	0	38,8	16,3	11,4
Biais (%)	0	72,0	192,5	145,6

Nous n'avons jamais constaté de faux positifs ni de faux négatifs. En revanche, on observe un coefficient de variation élevé pour les faibles valeurs, mais qui diminue pour des taux de positivité plus importants.

b) Reproductibilité

Nous avons testé la reproductibilité de la coloration : à partir du témoin positif à 50/10000 et du témoin négatif. Nous avons réalisé dix frottis qui ont été colorés, dans la routine des TK, par des techniciens différents, mais lus par le même opérateur (tableau 11). Nous avons alors pu calculer la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation pour chaque série de données qui sont les paramètres permettant d'évaluer la reproductibilité.

Tableau 11 : Valeurs de TK obtenues pour deux séries de dix lames colorées par différentes personnes mais lues par le même opérateur

Valeur attendue (pour 10000 GR)	0	50
Résultats des dix lectures de TK	0	125
	0	137
	0	126
	0	125
	0	130
	0	115
	0	128
	0	119
	0	160
	0	107
Minimum	0	107
Maximum	0	160
Moyenne	0	127,2
Écart type	0	14,2
Coefficient de variation (%)	0	11,2
Biais (%)	0	154,4

Le coefficient de variation calculé pour cette série est similaire à celui obtenu pour la même valeur théorique dans l'épreuve de répétabilité.

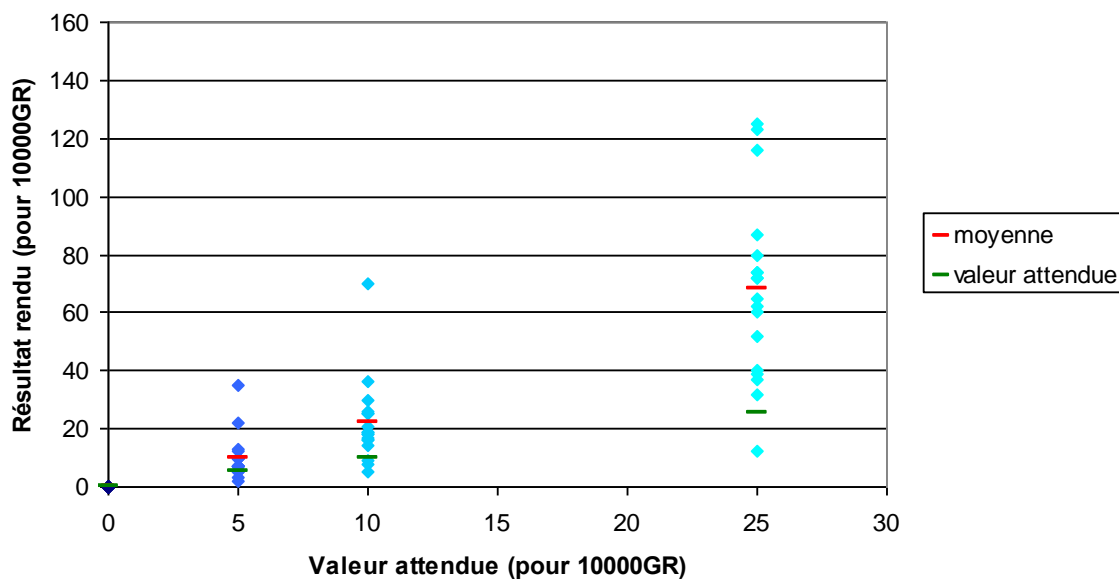
Nous avons ensuite testé la reproductibilité inter-individuelle : deux groupes de quatre lames (comprenant chacun un témoin négatif et trois témoins positifs à 5/10000, 10/10000 et 25/10000 avec dans un cas en plus des hématies intermédiaires) ont été données à lire à dix-huit personnes expérimentées. Puis, nous avons calculé la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation (CV) pour chaque série de données (tableau 12).

Tableau 12 : Résumé de la lecture de huit frottis de TK par 18 opérateurs

Valeur attendue (pour 10000 GR)	Sans hématies intermédiaires				Avec hématies intermédiaires			
	Négatif	5	10	25	Négatif	5	10	25
Minimum	0	2	5	12	0	1	6	28
Maximum	0	35	70	125	35	50	65	155
Médiane	0	7	18,5	68,5	2	15,5	29,5	59
Moyenne	0	9,7	21,8	67,9	5,0	18,8	59,0	67,6
Écart type		7,7	14,3	31,2	8,3	11,5	14,6	32,5
CV (%)		80,1	65,5	46,0	165,1	61,0	47,6	48,1
Biais (%)		93,3	117,8	171,6		276,7	207,2	170,2

Le coefficient de variabilité est très élevé, notamment pour les valeurs basses.

TK sans hématies intermédiaires



TK avec hématies intermédiaires

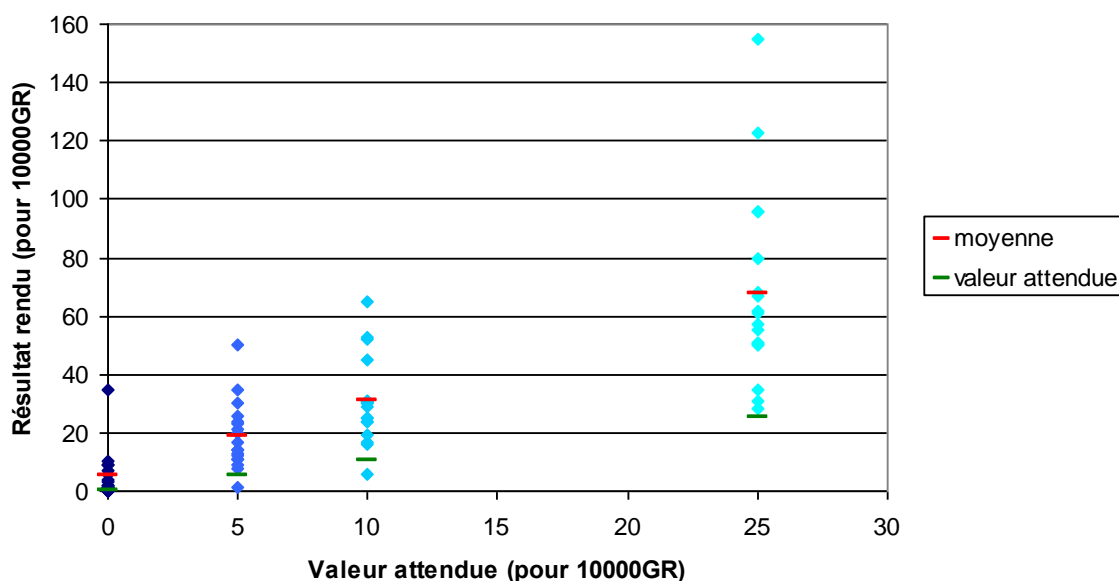


Figure 16 : Résultats de l'étude de reproductibilité inter-individuelle pour les mélanges sang de nouveau-né et de TK avec hématies intermédiaires

On peut observer qu'en présence d'hématies intermédiaires les résultats sont plus dispersés quand le TK est négatif, témoignant de la difficulté à apprécier les hématies intermédiaires.

II.2.2. Justesse

En partant du principe que les témoins utilisés pour les étapes précédentes ont des valeurs connues et considérées comme vraies, nous avons calculé le biais observé sur la technique. Les valeurs sont notées dans les tableaux 10, 11 et 12.

Tous les biais calculés, compris entre 72 et 277%, montrent une surestimation majeure du TK par rapport à la réalité.

Il faut noter que dans les divers tests les TK négatifs sont toujours rendus négatifs : on ne met en évidence aucun faux positif. Les différences surviennent en présence d'hématies intermédiaires ou fœtales.

III. CYTOMÉTRIE EN FLUX

III.1. Histogrammes

La figure 17 montre les histogrammes obtenus en CMF en fonction du résultat du TK selon deux échelles (300 à gauche et 50 à droite).

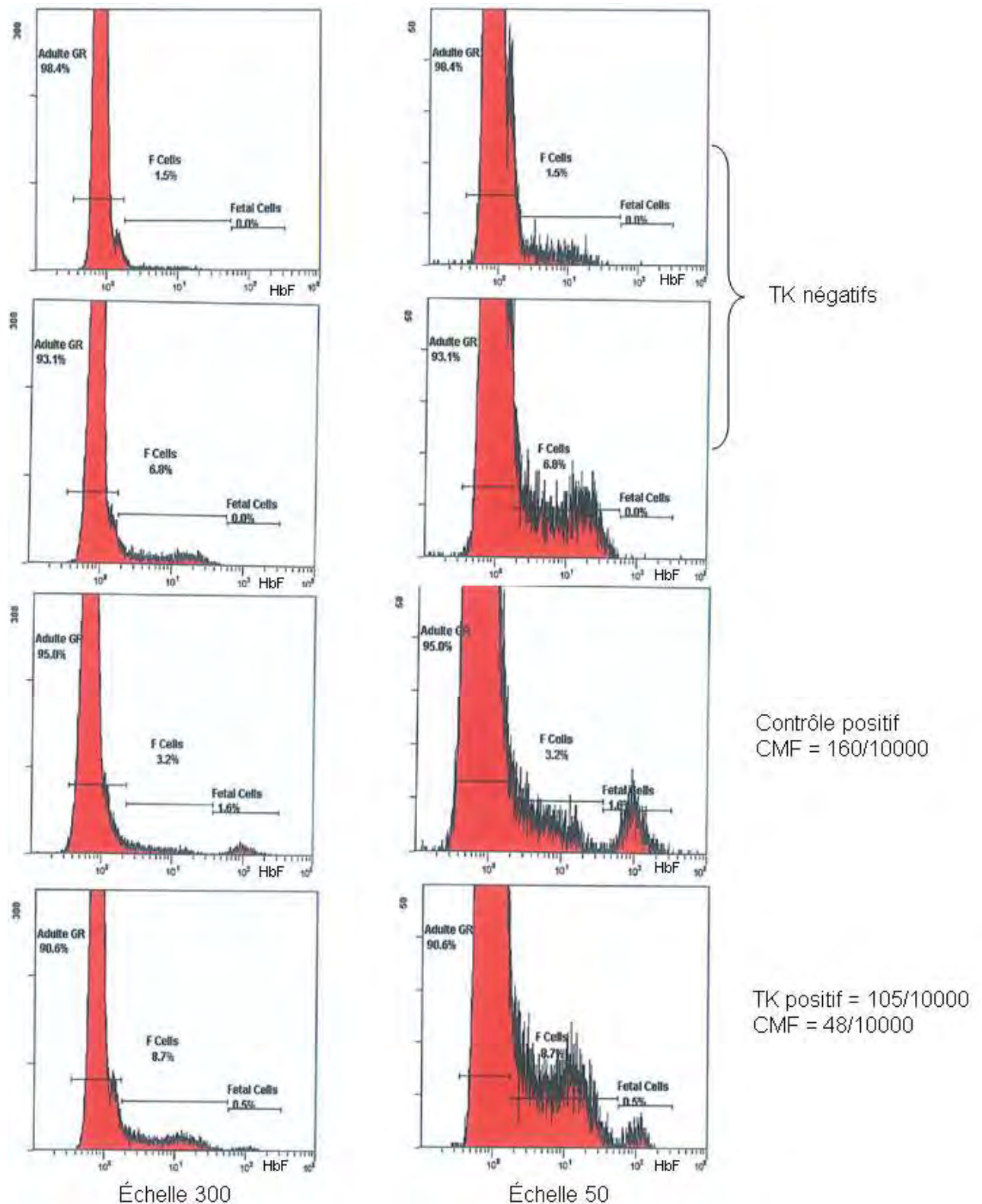


Figure 17 : Histogrammes monoparamétriques (fluorescence de l'Ac anti-HbF) obtenus en CMF

III.2. Mise au point de la méthode de cytométrie en flux

III.2.1. Concentration de glutaraldéhyde

Lors des essais préliminaires, sur le contrôle FETALtrol™ niveau 3, nous avons effectué des préparations avec du glutaraldéhyde à 0,015%, 0,02%, 0,025% et 0,03%.

Nous avons cherché à écarter les trois pics d'hématies au maximum. La concentration de glutaraldéhyde à 0,03% semblait la meilleure pour y parvenir (figure 18).

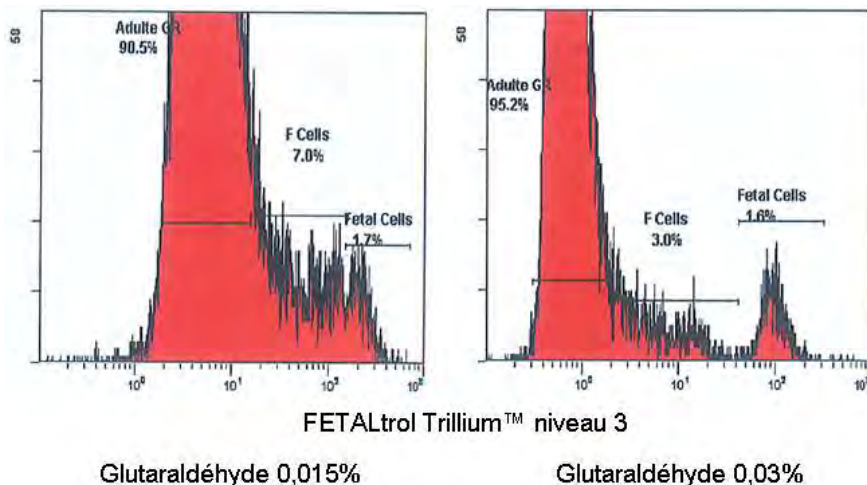


Figure 18 : Histogrammes monoparamétriques (HbF) du contrôle préparé à deux concentrations de glutaraldéhyde

Dans un second temps, nous avons passé trois témoins positifs (mélanges de sang de NN avec un témoin négatif de valeurs attendues à 20/10000, 50/10000 et 100/10000) ainsi qu'une patiente ayant un TK positif, préparés en parallèle avec du glutaraldéhyde à 0,03% et 0,04%. En effet, les recommandations du fournisseur stipulent une concentration à 0,03% alors que l'équipe de Rennes qui a testé le même kit préconise une concentration à 0,04% (71) (figure 19).

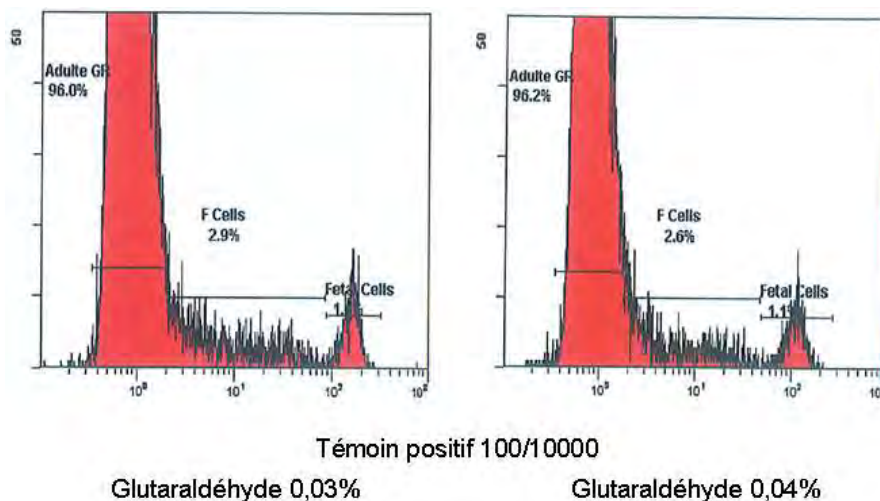


Figure 19 : Histogrammes monoparamétriques (HbF) d'un témoin préparé à deux concentrations de glutaraldéhyde

Ces essais ne montrent pas d'amélioration notable : les pics sont à nouveau plus proches et pas nettement plus fins.

III.2.2. Conservation

Pour évaluer les bonnes conditions de conservation avant analyse en CMF, nous avons travaillé sur trois échantillons (un négatif et deux positifs pour les hématies fœtales) que nous avons préparés à différents temps suivant le prélèvement et conservés à différentes températures. Les résultats sont présentés dans le tableau 13 et la figure 20.

Tableau 13 : Nombre d'hématies fœtales trouvées sur chaque préparation de l'étude de conservation

Valeur attendue	Résultat (pour 10000 GR)		
	Négatif	5	20
J0	0	4	27
J1	T° ambiante	1	5
	Réfrigérateur	0	4
J2	T° ambiante	0	3
	Réfrigérateur	1	4
J3	T° ambiante	0	5
	Réfrigérateur	0	4

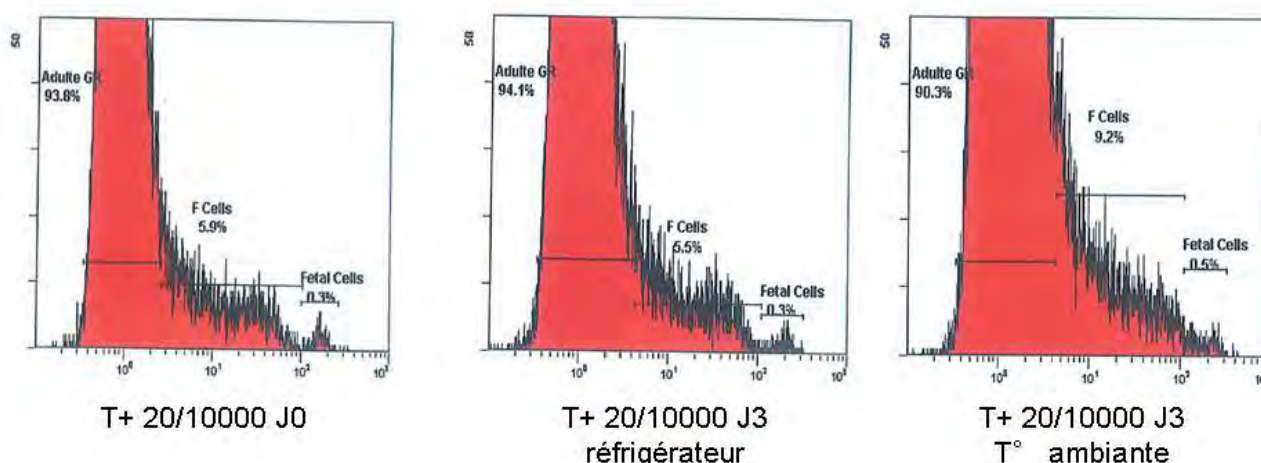


Figure 20 : Histogrammes d'un témoin positif à J0 et J3

Globalement, les prélèvements peuvent être conservés 72 heures avant d'être analysés. L'interprétation est plus difficile pour les échantillons positifs gardés à température ambiante en raison du décalage vers la droite des hématies ne contenant pas d'HbF. Il est donc préférable de conserver le prélèvement au réfrigérateur, au maximum pendant 72 heures, avant de le techniquer.

III.3. Vérification de la méthode de cytométrie en flux

III.3.1. Fidélité

a) Répétabilité

Nous avons préparé trois témoins positifs (à 5/10000, 20/10000 et 50/10000) en vue de leur passage sur le cytomètre. Chaque préparation obtenue a été passée dix fois à la suite. Sur les dix mesures réalisées pour chaque échantillon dont nous disposons, nous avons calculé la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation (tableau 14).

Tableau 14 : Résultats de dix passages successifs de trois échantillons

Valeur attendue (pour 10000 GR)	5	20	50
Résultats des dix passages en CMF	3	24	64
	4	19	61
	3	22	67
	5	25	67
	4	27	67
	5	21	64
	4	29	67
	5	23	63
	5	25	59
	3	20	62
Minimum	3	19	59
Maximum	5	29	67
Moyenne	4,1	23,5	64,1
Écart type	0,9	3,1	2,9
Coefficient de variation (%)	21,4	13,3	4,5
Biais (%)	-18,0	17,5	28,2

Le coefficient de variation est d'autant plus bas que le résultat est fortement positif.

b) Reproductibilité

Le contrôle positif FETALtrol™ niveau 3 a été passé en parallèle de neuf séries avant sa péremption. Nous avons calculé la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation pour ces valeurs (tableau 15).

Tableau 15 : Résultats de neuf préparations du contrôle FETALtrol™ niveau 3

Valeur attendue (pour 10000 GR)	118-178
Résultats des neuf passages en CMF	158
	160
	159
	169
	168
	160
	179
	157
	163
	Minimum
Maximum	179
Moyenne	163,7
Écart type	7,1
Coefficient de variation (%)	4,4
Biais (%)	10,6

Le coefficient de variation est très faible : 4,4%, témoignant de la bonne reproductibilité de la technique de CMF.

III.3.2. Justesse

Comme pour le TK, nous considérons que nos échantillons possèdent une valeur attendue grâce à laquelle nous pouvons définir le biais de la technique. La valeur vraie est la valeur théorique de la dilution pour les témoins "maison" et la valeur de la moyenne de l'intervalle de confiance renseigné par le fournisseur pour le contrôle commercial.

Les biais calculés (tableaux 14 et 15) sont plutôt positifs, entre -18% et 28% pour les valeurs testées, mais acceptables et bien inférieurs à ceux obtenus pour le TK (72 à 277%).

III.3.3. Incertitude de mesure

Nous n'avons pas calculé l'incertitude de mesure car nous ne disposons pas de contrôle stabilisé pour les seuils qui nous paraissent pertinents : 5/10000 pour évoquer une hémorragie fœto-maternelle pouvant entraîner un retentissement fœtal et 25/10000 pour administrer une dose supplémentaire de Rhophylac®.

III.3.4. Limites de détection et de quantification

Pour apprécier la quantité minimale d'hématies fœtales détectables avec une probabilité donnée d'un blanc de réaction, nous avons calculé l'écart-type des mesures de 42 échantillons dépourvus de ce type d'hématies au TK. La limite de détection (LD) peut alors être déterminée comme le triple de l'écart-type obtenu.

La limite de quantification (LQ), déterminée sur la même série de valeurs que la LD, est calculée en multipliant l'écart-type par 10.

Sur nos 42 échantillons négatifs, 25 ont un résultat à 0/10000, 16 à 1/10000 et 1 à 2/10000, et on calcule :

- $ET = 0,547$
- $LD = 3 \times ET = 1,642$
- $LQ = 10 \times ET = 5,474$

La limite de détection est donc fixée à deux hématies fœtales pour 10000 hématies maternelles et la limite de quantification à cinq hématies fœtales pour 10000 hématies maternelles.

IV. COMPARAISON DE LA CYTOMÉTRIE EN FLUX ET DU TEST DE KLEIHAUER

IV.1. Corrélation

Nous avons comparé l'ensemble des échantillons négatifs et positifs passés en parallèle pour le TK et la CMF en les reportant sur un graphique représentant les valeurs obtenues avec la CMF par rapport à celles de la technique de référence : le TK. Puis, nous avons simplement calculé l'équation de la droite de régression à l'aide du tableur Excel (figure 21) et non le coefficient de corrélation qui s'applique uniquement à des variables indépendantes.

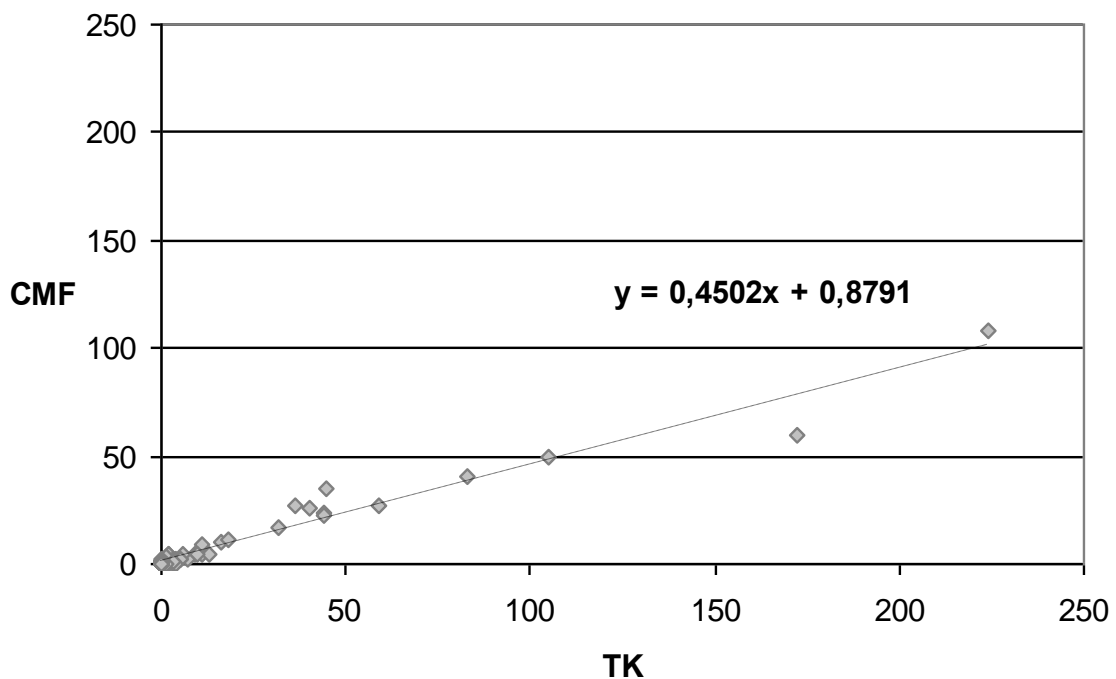


Figure 21 : Comparaison de la CMF avec le TK : équation de la droite de régression

La similitude entre les deux techniques n'est pas optimale puisque malgré une ordonnée à l'origine ($b = 0,8791$) proche de 0, la pente ($a = 0,4502$) est relativement inférieure à 1. Ceci montre que les résultats numériques du TK sont supérieurs à ceux obtenus par la technique de CMF pour le même échantillon.

IV.2. Performances

Pour savoir quelle technique offrait un résultat plus proche de la valeur attendue, nous avons examiné tous nos témoins positifs en parallèle avec les deux techniques (figure 22).

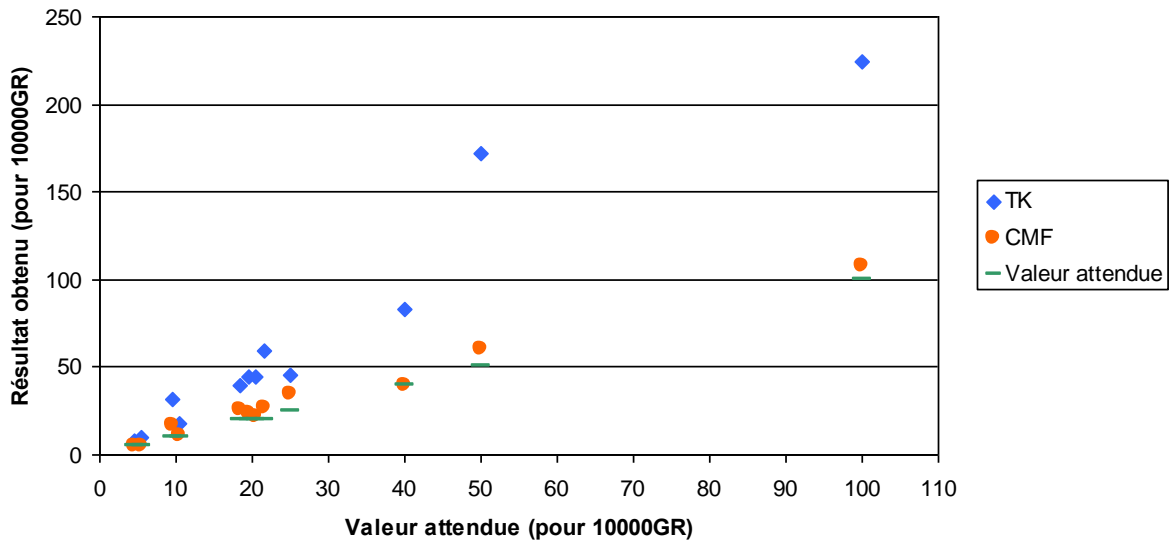


Figure 22 : Résultats obtenus par le TK et la CMF pour les témoins positifs

On constate que la CMF donne une valeur plus proche de la valeur attendue que le TK. Ceci est confirmé par le calcul de l'écart à la valeur attendue plus faible ($r = 0,54$) pour la CMF (20% en moyenne) que pour le TK (129% en moyenne).

IV.3. Cas des hématies intermédiaires

Nous avons voulu savoir si la CMF permettait d'apporter des réponses dans les cas douteux au TK et notamment de s'affranchir des hématies intermédiaires. Nous avons donc passé en CMF des échantillons sanguins présentant des hématies intermédiaires au TK. Sur un échantillon nous avons ajouté du sang de nouveau-né, pour simuler une HFM, afin de voir si les hématies fœtales étaient distinguables des F-cells (figure 23).

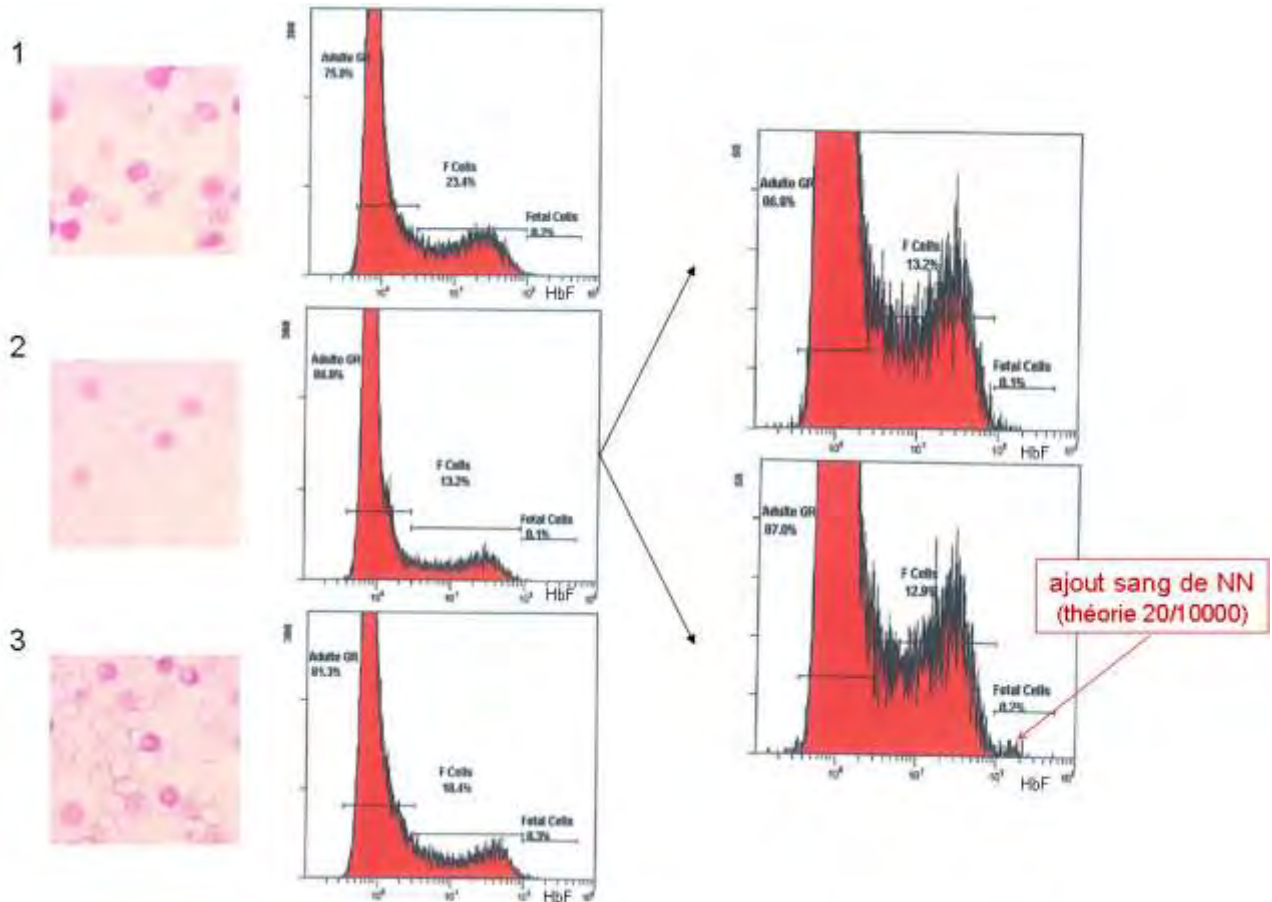


Figure 23 : Profils de trois patientes présentant des hématies intermédiaires

Chez les patientes présentant des hématies intermédiaires au TK on retrouve en CMF une population de F-cells augmentée. Face à l'aspect d'un pic très étalé, on risque de ne pas voir une faible quantité d'hématies fœtales ou de sous-estimer le décompte. Cependant, pour l'échantillon 2 auquel nous avons ajouté du sang de nouveau-né, on visualise un pic d'hématies fœtales distinct des F-cells même si leur décompte (10/10000) est inférieur à celui attendu.

La CMF peut constituer un argument supplémentaire pour éviter de rendre un résultat de TK ininterprétable. En effet, pour les patientes 1 et 3 l'observation du frottis du TK ne permettait pas de conclure formellement alors que la CMF ne semble pas mettre en évidence d'hématies fœtales : le pic des F-cells ne remonte pas.

V. APPORTS DE LA CYTOMÉTRIE POUR LES PATIENTS ATTEINTS D'HÉMOGLOBINOPATHIE

V.1. Drépanocytaires

Nous avons inclus dans notre étude sept patients drépanocytaires homozygotes : six femmes et un homme âgés de 25 à 50 ans. Trois sont traités par hydroxurée.

Pour chacun, nous avons comparé les frottis colorés par la technique de Kleihauer, le pourcentage de F-cells obtenu en cytométrie et la quantité totale d'HbF détectée par chromatographie liquide haute performance (figure 24).

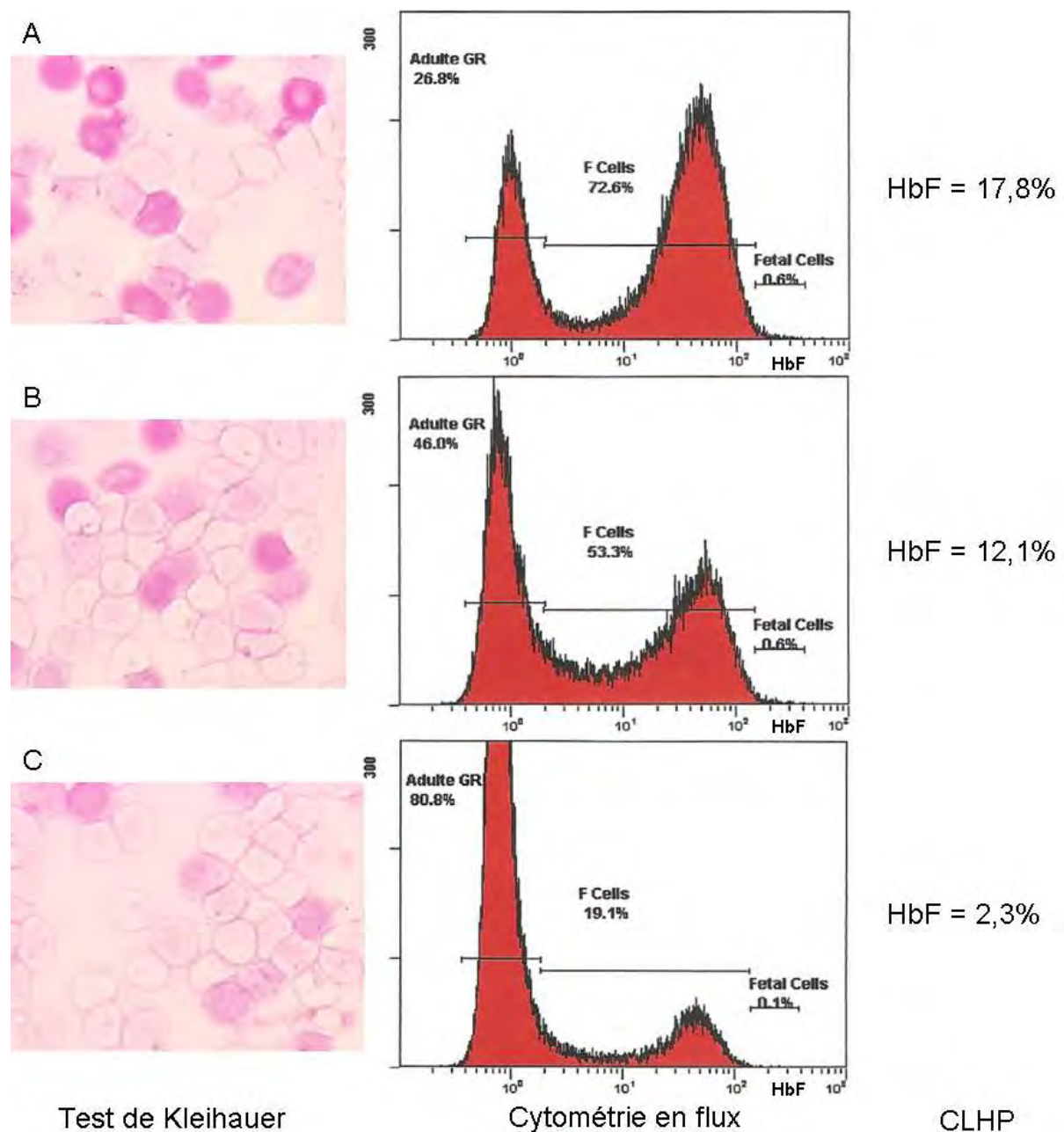


Figure 24 : Comparaison des résultats de TK et de CMF de trois patientes atteintes de drépanocytose.
A : patiente sous hydroxurée, très bonne réponse clinique
B : patiente non traitée, clinique peu sévère
C : patiente transfusée régulièrement

Le pourcentage de F-cells obtenu par cytométrie et la quantité d'HbF mise en évidence par l'électrophorèse de l'hémoglobine sont différents mais semblent liés. En effet, aucun de nos patients ne présente de discordance entre le pourcentage de F-cells, la quantité d'HbF et la clinique. Nous avons donc étudié la possible corrélation de ces deux paramètres (figure 25).

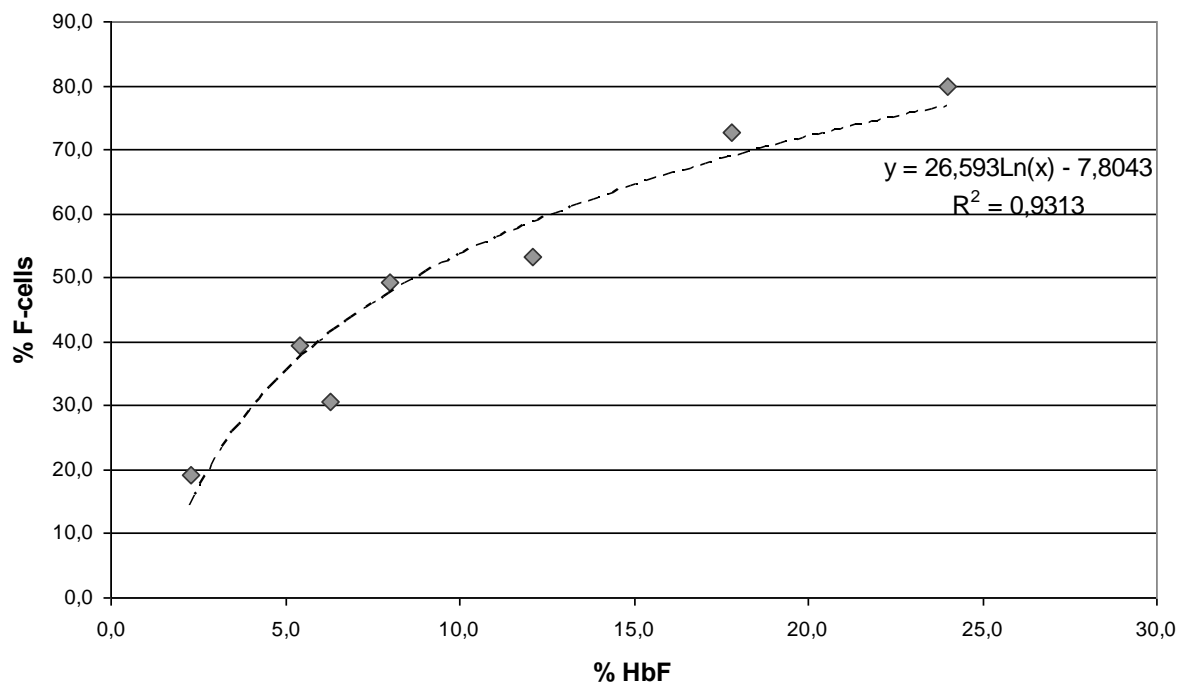


Figure 25 : Corrélation entre le pourcentage de F-cells et la quantité d'HbF des drépanocytaires

Le pourcentage de F-cells et la quantité totale d'HbF sont liés par une relation logarithmique ($r = 0,97$) chez nos sept patients. Ce résultat est en accord avec les travaux de l'équipe de Marcus et al., qui a décrit en 1997 une corrélation logarithmique entre les pourcentages de F-cells et d'HbF sur une population de 242 enfants drépanocytaires (130 homozygotes S/S, 74 hétérozygotes S/C, 30 hétérozygotes S/ β -thalassémique et 8 hétérozygotes S/PHHF) (68).

En revanche, l'ajout de sang de nouveau-né, même en quantité supérieure à une hémorragie fœto-maternelle, indique qu'il n'est pas toujours possible d'identifier et de quantifier avec certitude les hématies fœtales (figure 26).

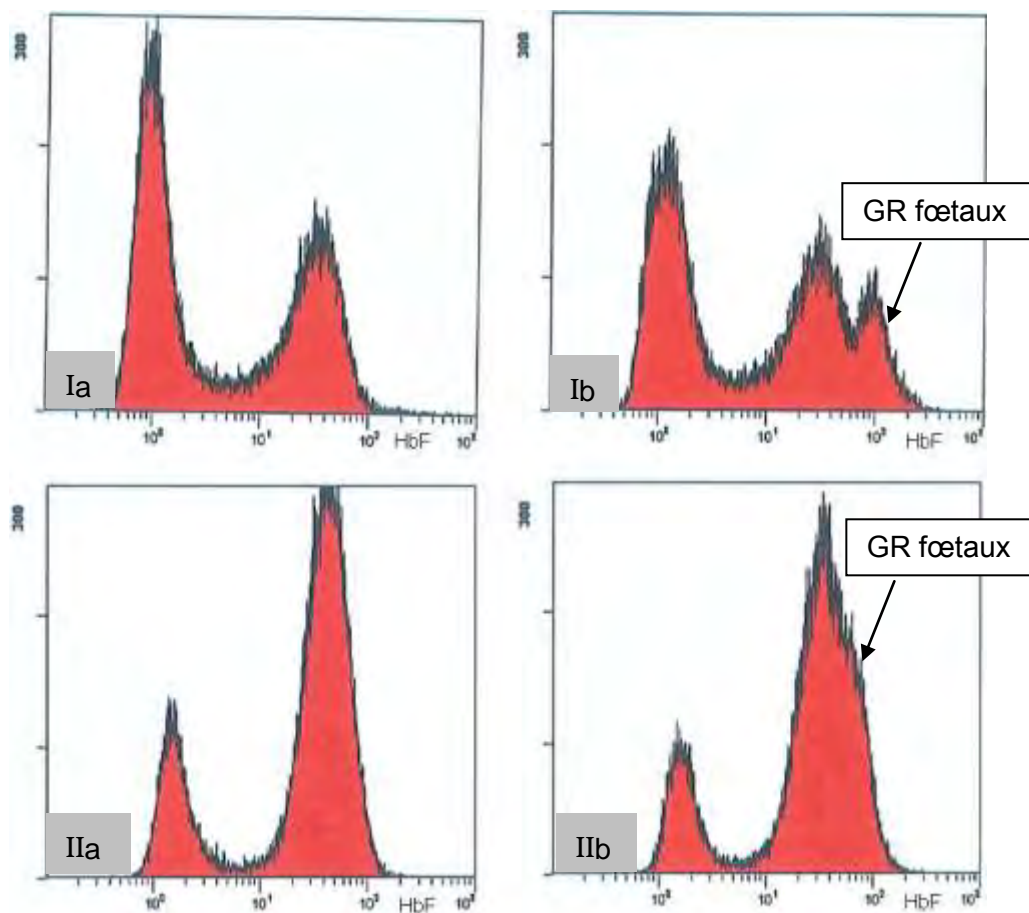


Figure 26 : Histogrammes de mélanges de sang de drépanocytaires et de nouveau-né
 I : sang d'homme drépanocytaire sans (a) et avec (b) ajout d'hématies fœtales
 II : sang de femme drépanocytaire sans (a) et avec (b) ajout d'hématies fœtales

V.2. Thalassémiques

Sur les six patients inclus, un homme et cinq femmes âgés de 14 à 67 ans, trois présentent des traits thalassémiques, deux des thalassémies majeures nécessitant des transfusions de culots érythrocytaires régulières et un est porteur d'une forme intermédiaire.

La figure 27 montre le panel des résultats obtenus.

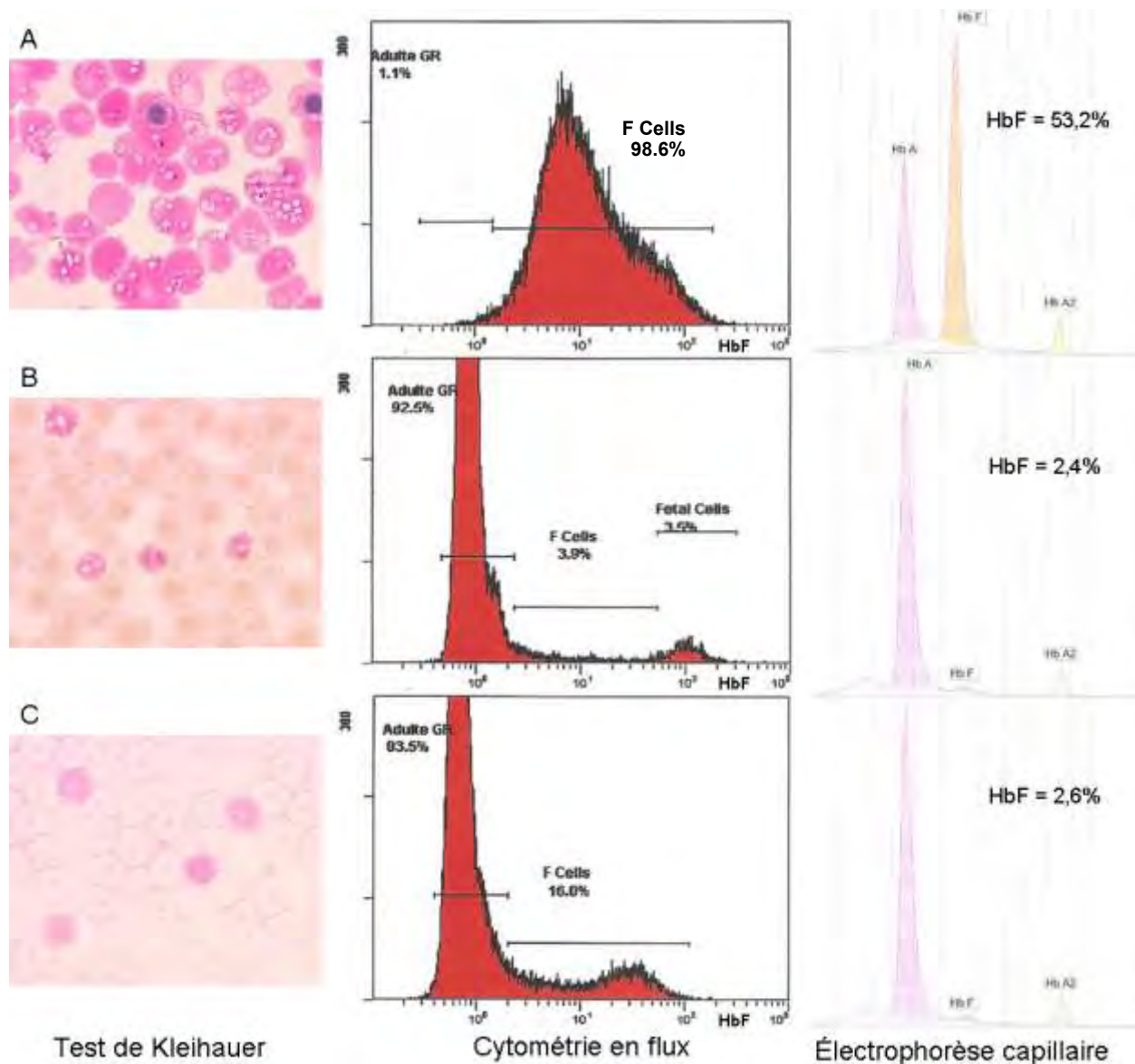


Figure 27 : Comparaison des résultats de TK, CMF et EC de trois patients thalassémiques.

- A : thalassémie intermédiaire non traité
- B : thalassémie majeure massivement transfusée
- C : trait thalassémique

Pour la patiente présentant un trait thalassémique, on observe une répartition aléatoire de l'HbF dans quelques hématies mais atteignant rarement la quantité totale d'hémoglobine de la cellule. En revanche, dans le premier cas on note la répartition quasi-gaussienne de l'HbF dans toutes les hématies. Le cas de la patiente transfusée est intéressant car on voit que les seules hématies de la patiente qui restent sont celles contenant le plus d'HbF : elles apparaissent dans la région des F-cells. En conséquence, ce profil ne pourrait pas permettre de détecter une hémorragie fœto-maternelle.

DISCUSSION

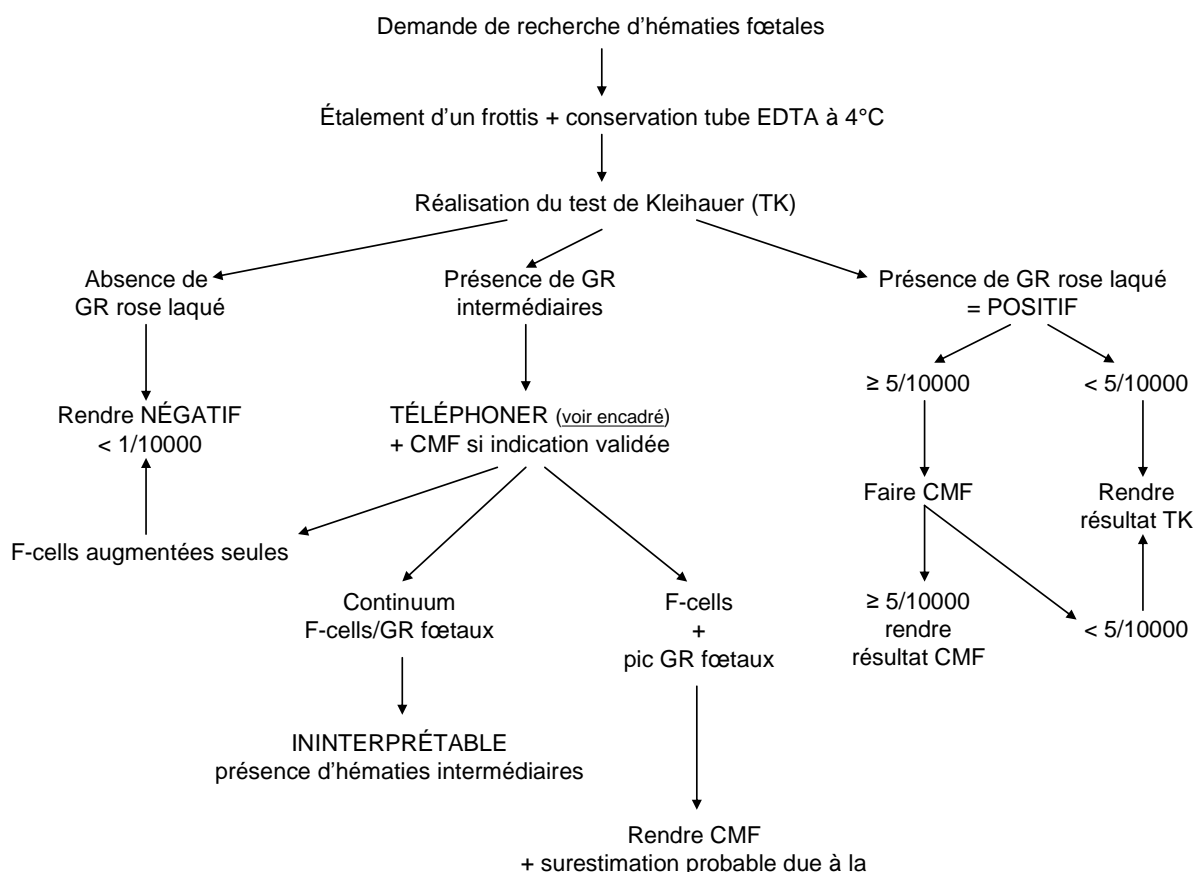
Une hémorragie foeto-maternelle (HFM) peut survenir au décours de toutes les grossesses et la prévention de l'allo-immunisation materno-foetale (AMF) anti-RH1 concerne potentiellement toutes les femmes enceintes RH:-1, soit 15 pour cent des grossesses. Cependant, pour déterminer les réelles grossesses à risque parmi les mères RH:-1, il faudrait effectuer le génotypage RH1 du fœtus, qui ne semble pas devoir se systématiser en raison de son coût élevé (72). Il est nécessaire de disposer de tests de biologie sensibles, spécifiques et précis pour dépister les hématies fœtales présentes dans la circulation sanguine maternelle afin d'estimer avec exactitude l'importance de l'HFM et, le cas échéant, d'adapter les doses de Rhophylac®.

Parmi les méthodes biologiques de détection d'une hémorragie foeto-maternelle, deux principaux tests existent : la coloration de référence des hématies fœtales sur frottis sanguin (test de Kleihauer), ainsi qu'une technologie d'apparition plus récente qui consiste à détecter les hématies fœtales par cytométrie en flux. Le test de Kleihauer (TK) est le test le plus sensible (67,73), il permet de détecter une hématie fœtale pour 10000 hématies maternelles. Cependant, il souffre de son manque de spécificité (53–55,71,74) : il est notamment mis en défaut chez les patientes atteintes d'une hémoglobinopathie s'accompagnant d'une augmentation de l'hémoglobine fœtale (HbF) en raison de la difficulté d'identification des hématies intermédiaires, contenant une faible quantité d'HbF. De plus, on note une grande variabilité inter-individuelle dans le décompte des hématies fœtales (75). Bien que le résultat rendu soit opérateur-dépendant, on observe une tendance constante à la surestimation par rapport à la valeur attendue (62,67,76). Sa mise en place au laboratoire est relativement aisée : il faut du personnel formé pour la lecture mais la coloration du frottis sanguin est simple et les réactifs peu onéreux (77). Toutes ces données de la littérature sont confirmées dans notre étude : nous avons mis en évidence par le TK des HFM non détectées en CMF, nos résultats ont montré une variabilité importante dans les résultats rendus du TK, particulièrement en présences d'hématies maternelles dites intermédiaires (dont la quantité d'HbF est augmentée). Comme la littérature le rapporte, notre étude a mis en évidence une surestimation fréquente du décompte du TK, surtout pour les résultats élevés.

La CMF est une technique utilisée depuis quelques années pour le diagnostic des HFM. Nos résultats ont permis d'estimer la limite de quantification de la technique à 5/10000, résultat en accord avec les données de la littérature : les différents auteurs évoquent des seuils compris entre 5 et 10/10000. La CMF est donc moins sensible que le TK. En revanche, comme nos résultats l'ont confirmé, elle est beaucoup plus précise et reproductible que le TK (60,62–67,71,75). Le paramétrage réalisé sur le contrôle FETALtrol™ est normalement adapté afin de ne pas apporter de modifications à tous les

échantillons. Toutefois, nous nous autorisons à bouger les fenêtres suivant les populations observées sur les histogrammes biparamétrique HbF/structure et monoparamétrique HbF car chaque préparation est unique et la concentration de glutaraldéhyde peut varier légèrement malgré nos précautions. La réalisation de la CMF n'est pas compatible avec une activité de garde puisqu'elle nécessite du matériel et du personnel dédiés. De plus, le test de Kleihauer est coté B70 à la nomenclature de biologie médicale (18€90). Or, le coût des réactifs pour la CMF (presque 10€) est supérieur à celui des réactifs du TK (environ 1€), et le temps technicien est également plus important avec la CMF (1h30 contre 1h pour le TK). Le délai maximum entre le prélèvement et l'analyse est identique pour les deux techniques (72 heures) mais il correspond au temps maximum pour réaliser la prophylaxie par Rhophylac® de manière efficace.

En raison des avantages et des limites de la CMF et du TK, nous avons donc essayé de mettre en place une nouvelle stratégie de détection des HFM au laboratoire (figure 28).



TÉLÉPHONER pour valider l'indication :

- terme de grossesse
- facteurs de risque d'hémorragie fœto-maternelle (HFM)
- signes cliniques ou échographiques d'anémie fœtale
- accouchée : rhésus mère et nouveau-né pour Rhophylac®
hémoglobine et bilirubine pour HFM massive

Figure 28 : Stratégie de prise en charge des nouvelles demandes de TK

Sur la période de notre étude, 15 prélèvements seulement sur 383 auraient nécessité un passage en CMF selon les critères ci-dessus, ce qui représente un surcoût négligeable au regard du service rendu. En effet, l'ajustement de la dose de Rhophylac® est important pour éviter une allo-immunisation de la mère RH:-1 et dépend du volume estimé de l'HFM. C'est l'association du TK (plus sensible) et de la CMF (plus précise et parfois plus spécifique) qui permet d'obtenir les meilleurs résultats. Cependant, le kit de CMF contient 100 tests et risque de périmier avant son utilisation complète ce qui augmenterait le coût d'une analyse.

Par ailleurs, on pourrait étudier la possibilité de rendre un commentaire accompagnant un pourcentage d'hématies intermédiaires supérieur à dix pour cent suggérant de réaliser une électrophorèse de l'hémoglobine afin de dépister un éventuel trait thalassémique et dans ce cas de proposer un conseil génétique pour les grossesses suivantes.

Nous avons voulu tester la cytométrie dans les cas où le TK est difficilement interprétable dans les cas où il y a présence d'hématies intermédiaires afin de voir si elle permettait de s'affranchir du problème. Pour les patients thalassémiques, on observe en CMF des hématies contenant toutes des proportions variables d'HbF, allant jusqu'à quelques hématies pour lesquelles la totalité de l'hémoglobine est de l'HbF : elles sont donc non différenciables des hématies fœtales. Le diagnostic d'une HFM chez une patiente thalassémique est impossible par le TK ou par la CMF utilisant un anticorps anti-HbF. Le clinicien devra alors se reporter à l'échographie pour la mise en évidence d'une HFM pendant la grossesse. En cas d'incompatibilité RH1, pour adapter les doses de Rhophylac®, certaines équipes (78) proposent d'avoir recours à la recherche d'agglutinines irrégulières (RAI). En effet, si la RAI est positive et l'anticorps identifié de type anti-RH1 on peut réaliser un microtitrage et comparer la concentration obtenue à celle attendue en l'absence de fixation sur les hématies fœtales ($C = n \times \frac{15}{e^{0.03t}}$ où n est le nombre de doses de Rhophylac® de 100 µg administrées et t le délai, en jours, depuis l'injection). De plus, si l'HFM est massive on peut l'évaluer en fonction du nombre de doses d'immunoglobulines administrées en sachant qu'une dose de 200 µg neutralise une HFM de 10 ml.

Pour les patients drépanocytaires, le pourcentage de F-cells, hématies adultes contenant de l'HbF, obtenu en CMF et le profil de répartition de l'HbF au sein des hématies peuvent donner des informations complémentaires pour expliquer les présentations cliniques favorables et la réponse au traitement par hydroxyurée. Cependant, nous n'avons pas étudié suffisamment de patients et n'avons pas de données comparatives avant et après traitement pour définir la place de la CMF dans ce contexte.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'hémorragie fœto-maternelle (HFM) est une situation à ne pas méconnaître. Ses conséquences pour la mère et le fœtus peuvent être graves : allo-immunisation, anémie parfois mortelle.

Nous avons montré que le test de Kleihauer, mis au point en 1957, avait toujours sa place dans le diagnostic des HFM. Cette technique est sensible et bon marché : c'est un bon test de dépistage. En revanche, sa spécificité et sa reproductibilité en cas de positivité sont médiocres. Notre étude montre l'intérêt de développer la cytométrie en flux (CMF) pour les échantillons positifs au TK. La CMF apporte au clinicien un résultat plus fiable qui pourra peut être aider, sur des études à grande échelle, à adopter une stratégie standardisée de prise en charge des HFM.

BIBLIOGRAPHIE

1. Beuzard Y, Galectéros F. L'hémoglobine et ses gènes. Dans : L'Hématologie de Bernard Dreyfus. Dreyfus B, Breton-Gorius J, Reyes F, Rochant H, Rosa J, Vernant JP. Paris: Flammarion médecine-sciences; 1992. p.89-98.
2. Hill RJ, Konigsberg W, Guidotti G, Craig LC. The structure of human hemoglobin. I. The separation of the alpha and beta chains and their amino acid composition. *J. Biol. Chem.* mai 1962;237:1549-1554.
3. Deisseroth A, Nienhuis A, Turner P, Velez R, Anderson WF, Ruddle F, et al. Localization of the human alpha-globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridization assay. *Cell.* sept 1977;12(1):205-218.
4. Deisseroth A, Nienhuis A, Lawrence J, Giles R, Turner P, Ruddle FH. Chromosomal localization of human beta globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* mars 1978;75(3):1456-1460.
5. Wajcman H, Lantz B, Girot R. L'hémoglobine. Les maladies du Globule Rouge. Paris: Les éditions INSERM : Médecine-Sciences Flammarion; 1992. p.11-30.
6. Rosa J, Wajcman H, Blouquit Y. Hémoglobine. *EMC - Hématologie* 1993:1-0 [Article 13-000-S-10].
7. La drépanocytose dossier complet sur la maladie [Internet]. [cité 5 janv 2013]. Disponible sur: http://pedagogie.ac-guadeloupe.fr/sciences_vie_et_terre/drepanocytose_dossier_complet_sur_maladie
8. Lauer J, Shen CK, Maniatis T. The chromosomal arrangement of human alpha-like globin genes: sequence homology and alpha-globin gene deletions. *Cell.* mai 1980;20(1):119-130.
9. Shaw JP, Marks J, Shen CK. Evidence that the recently discovered theta 1-globin gene is functional in higher primates. *Nature.* 16 avr 1987;326(6114):717-720.
10. Fritsch EF, Lawn RM, Maniatis T. Molecular cloning and characterization of the human beta-like globin gene cluster. *Cell.* avr 1980;19(4):959-972.
11. Labie D, Elion J. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC - Hématologie* 2005:1-15 [Article 13-000-S-10].
12. Harju S, McQueen KJ, Peterson KR. Chromatin structure and control of beta-like globin gene switching. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* oct 2002;227(9):683-700.
13. Schroeder WA, Huisman TH, Shelton JR, Shelton JB, Kleihauer EF, Dozy AM, et al. Evidence for multiple structural genes for the gamma chain of human fetal hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* juin 1968;60(2):537-544.
14. Ricco G, Mazza U, Turi RM, Pich PG, Camaschella C, Saglio G, et al. Significance of a new type of human fetal hemoglobin carrying a replacement isoleucine replaced by threonine at position 75 (E 19) of the gamma chain. *Hum. Genet.* 29 juin 1976;32(3):305-313.
15. Boyer SH, Belding TK, Margolet L, Noyes AN. Fetal hemoglobin restriction to a few erythrocytes (F cells) in normal human adults. *Science.* 25 avr 1975;188(4186):361-363.
16. Wood WG, Stamatoyannopoulos G, Lim G, Nute PE. F-cells in the adult: normal values and levels in individuals with hereditary and acquired elevations of Hb F. *Blood.* nov 1975;46(5):671-682.
17. Miyoshi K, Kaneto Y, Kawai H, Ohchi H, Niki S, Hasegawa K, et al. X-linked dominant control of F-cells in normal adult life: characterization of the Swiss type as hereditary persistence of fetal hemoglobin regulated dominantly by gene(s) on X chromosome. *Blood.* déc 1988;72(6):1854-1860.

18. Dover GJ, Smith KD, Chang YC, Purvis S, Mays A, Meyers DA, et al. Fetal hemoglobin levels in sickle cell disease and normal individuals are partially controlled by an X-linked gene located at Xp22.2. *Blood*. 1 août 1992;80(3):816-824.
19. Popat N, Wood WG, Weatherall DJ, Turnbull AC. Pattern of maternal F-cell production during pregnancy. *Lancet*. 20 août 1977;2(8034):377-379.
20. De Wit H, Nabbe KCAM, Kooren JA, Adriaansen HJ, Roelandse-Koop EA, Schuitemaker JHN, et al. Reference values of fetal erythrocytes in maternal blood during pregnancy established using flow cytometry. *Am. J. Clin. Pathol.* oct 2011;136(4):631-636.
21. Syndromes drépanocytaires majeurs de l'adulte. Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare. Guide affection longue durée. HAS. Janvier 2010;86 pages.
22. Elion J, Labie D. Bases physiopathologiques moléculaires et cellulaires du traitement de la drépanocytose. *Hématologie* 1996 ; 2 : 499-510.
23. Labie D, Elion J. Génétique et Physiopathologie de la Drépanocytose. Dans : La Drépanocytose. Girot R, Bégue P, Gaclectéros F. John Libbey Eurotext; 2003.
24. Lionnet F, Stankovic K, Girot R. Drépanocytose de l'adulte. EMC - Hématologie 2009:1-19 [Article 13-006-D-16].
25. Weatherall D et al. Dans : Jamison DT et al. Disease control priorities in developing countries. 2nd ed. Washington (DC): World Bank; 2006. p. 663-680.
26. De Montalembert M. Syndromes thalassémiques. EMC - Hématologie 2008:1-9 [Article 13-006-D-17].
27. Godeau B, Galactéros F. Principales hémoglobinopathies. EMC - AKOS (Traité de Médecine) 2003:1-6 [Article 4-0040].
28. Zandecki M. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [cité 26 janv 2013]. Disponible sur: <http://hematocell.univ-angers.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/globules-rouges-et-leur-pathologie/87-les-syndromes-thalassemiques>
29. Girot R, De Montalembert M. Thalassémies chez l'enfant. EMC - Pédiatrie - Maladies infectieuses 2006:1-8 [Article 4-080-A-30].
30. Wajcman H, Lantz B, Girot R. Hémolyses par anomalies de synthèse de l'hémoglobine. Dans : Les maladies du Globule Rouge. Paris: Les éditions INSERM : Médecine-Sciences Flammarion; 1992. p.223-224.
31. Wajcman H, Moradkhani K. Abnormal haemoglobins: detection & characterization. *Indian J Med Res.* oct 2011;134(4):538-546.
32. Bardakdjian-Michau J, Dhondt J-L, Ducrocq R, Galactéros F, Guyard A, Huchet F-X, et al. Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. Juil-Aou 2003;61(4):401-409.
33. Mannessier L. Prévention de l'allo-immunisation foetomaternelle. *Transfu Clin Biol* 2000 ; 7 : 525-526.
34. Purwosunu Y, Sekizawa A, Farina A, Okai T, Takabayashi H, Wen P, et al. Enrichment of NRBC in maternal blood: a more feasible method for noninvasive prenatal diagnosis. *Prenat. Diagn.* juin 2006;26(6):545-547.
35. Sebring ES, Polesky HF. Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence, and clinical effects. *Transfusion.* mai 1990;30(4):344-357.
36. Huissoud C, Divry V, Rudigoz R-C. Hémorragie foetomaternelle : le point de vue du clinicien. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.* juin 2009;38(4):286-297.

37. Giacoia GP. Severe fetomaternal hemorrhage: a review. *Obstet Gynecol Surv.* juin 1997;52(6):372-380.
38. CNGOF. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D fœto-maternelle. Recommandations pour la pratique clinique. 2005.
39. Meleti D, Caetano ACR, Boute T, De Oliveira LG, Araujo E Jr, Nardoza LMM, et al. Assessment of fetomaternal hemorrhage by kleihauer-betke test, flow cytometry and alpha-fetoprotein after invasive obstetric procedures. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2012;39(3):303-306.
40. Cheutet S, Bretelle F, Demeester A, Gamberre M. Diagnostic des hémorragies fœto-maternelles et test de Kleihauer. *La revue Sage-femme.* avr 2007;6(1):pp. 5-13.
41. Rubod C, Deruelle P, Le Goueff F, Tunes V, Fournier M, Subtil D. Long-term prognosis for infants after massive fetomaternal hemorrhage. *Obstet Gynecol.* août 2007;110(2 Pt 1):256-260.
42. D'Ercole C. Allo-immunisation foetomaternelle érythrocytaire. *EMC - Obstétrique* 2009:1-7 [Article 5-020-A-20].
43. Mannessier L. La surveillance immunohématologique de la femme enceinte et la nouvelle politique de prévention de l'allo-immunisation anti-RH1. *Transfus Clin Biol.* mai 2007;14(1):112-119.
44. RHOPHYLAC®. Monographie VIDAL 2012.
45. Mari G, Deter RL, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise KJ, et al. Noninvasive Diagnosis by Doppler Ultrasonography of Fetal Anemia Due to Maternal Red-Cell Alloimmunization. *New England Journal of Medicine.* 2000;342(1):9-14.
46. Boutté P, Dageville C, Maillotte A-M, Monpoux F. Immunoglobulines polyvalentes intraveineuses et allo-immunisation érythrocytaire fœtomaternelle. *Archives de Pédiatrie.* mai 2011;18(5):H19-H20.
47. Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem hämoglobin in den erythrocyten eines blutausstrichs. *Klin. Wochenschr.* 15 juin 1957;35(12):637-638.
48. Dacie JV, Lewis SM. *Practical haematology.* Sixth edition. Churchill Livingstone; 1984.
49. Mollison PL. Quantitation of transplacental haemorrhage. *Br Med J.* 8 juill 1972;3(5818):115.
50. Martin C, Riou B, Vallet B. *Physiologie humaine appliquée.* [Paris]: Arnette; 2006.
51. Duckett JR, Constantine G. The Kleihauer technique: an accurate method of quantifying fetomaternal haemorrhage? *Br J Obstet Gynaecol.* juill 1997;104(7):845-846.
52. Pelikan DMV, Mesker WE, Scherjon SA, Kanhai HHH, Tanke HJ. Improvement of the Kleihauer-Betke test by automated detection of fetal erythrocytes in maternal blood. *Cytometry B Clin Cytom.* juill 2003;54(1):1-9.
53. Iyer R, McElhinney B, Heasley N, Williams M, Morris K. False positive Kleihauer tests and unnecessary administration of anti-D immunoglobulin. *Clin Lab Haematol.* déc 2003;25(6):405-408.
54. Kush ML, Muench MV, Harman CR, Baschat AA. Persistent fetal hemoglobin in maternal circulation complicating the diagnosis of fetomaternal hemorrhage. *Obstet Gynecol.* avr 2005;105(4):872-874.
55. Ramesh L, Onon T. Role of flow cytometry in mothers with hereditary persistence of fetal haemoglobin. *J Obstet Gynaecol.* 2010;30(6):630-631.

56. Boissière A, Arnathau C, Duperray C, Berry L, Lachaud L, Renaud F, et al. Isolation of *Plasmodium falciparum* by flow-cytometry: implications for single-trophozoite genotyping and parasite DNA purification for whole-genome high-throughput sequencing of archival samples. *Malar. J.* 2012;11:163.
57. Merle-Béral H, Le Garff-Tavernier M. Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie de flux. *EMC - Hématologie* 2008;1-12 [Article 13-000-L-10].
58. Gendron MC. Cytométrie en flux. *EMC - Biologie médicale* 2003;1-0 [Article 90-60-0065].
59. La cytométrie de flux [Internet]. [cité 26 janv 2013]. Disponible sur: <http://pedagogie.ac-amiens.fr/svt/info/logiciels/cytometrie/Cytometrie2.html>
60. Nance SJ, Nelson JM, Arndt PA, Lam HC, Garratty G. Quantitation of fetal-maternal hemorrhage by flow cytometry. A simple and accurate method. *Am. J. Clin. Pathol.* mars 1989;91(3):288-292.
61. Urbaniak SJ. The scientific basis of antenatal prophylaxis. *Br J Obstet Gynaecol.* nov 1998;105 Suppl 18:11-18.
62. Davis BH, Olsen S, Bigelow NC, Chen JC. Detection of fetal red cells in fetomaternal hemorrhage using a fetal hemoglobin monoclonal antibody by flow cytometry. *Transfusion.* août 1998;38(8):749-756.
63. Nelson M, Zarkos K, Popp H, Gibson J. A flow-cytometric equivalent of the Kleihauer test. *Vox Sang.* 1998;75(3):234-241.
64. Chen JC, Davis BH, Wood B, Warzynski MJ. Multicenter clinical experience with flow cytometric method for fetomaternal hemorrhage detection. *Cytometry.* 15 déc 2002;50(6):285-290.
65. Kennedy GA, Shaw R, Just S, Bryson G, Battistutta F, Rowell J, et al. Quantification of fetomaternal haemorrhage (FMH) by flow cytometry: anti-fetal haemoglobin labelling potentially underestimates massive FMH in comparison to labelling with anti-D. *Transfus Med.* févr 2003;13(1):25-33.
66. Radel DJ, Penz CS, Dietz AB, Gastineau DA. A combined flow cytometry-based method for fetomaternal hemorrhage and maternal D. *Transfusion.* sept 2008;48(9):1886-1891.
67. Porra V, Bernaud J, Gueret P, Bricca P, Rigal D, Follea G, et al. Identification and quantification of fetal red blood cells in maternal blood by a dual-color flow cytometric method: evaluation of the Fetal Cell Count kit. *Transfusion.* juill 2007;47(7):1281-1289.
68. Marcus SJ, Kinney TR, Schultz WH, O'Branski EE, Ware RE. Quantitative analysis of erythrocytes containing fetal hemoglobin (F cells) in children with sickle cell disease. *Am. J. Hematol.* janv 1997;54(1):40-46.
69. Maier-Redelsperger M, De Montalembert M, Flahault A, Neonato MG, Ducrocq R, Masson MP, et al. Fetal hemoglobin and F-cell responses to long-term hydroxyurea treatment in young sickle cell patients. The French Study Group on Sickle Cell Disease. *Blood.* 15 juin 1998;91(12):4472-4479.
70. COFRAC. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/ validation (portée B) des méthodes de biologie médicale. SH GTA 04. Révision 00. Avril 2011.
71. Pastoret C, Priol JL, Fest T, Roussel M. Evaluation of FMH QuikQuant for the detection and quantification of fetomaternal hemorrhage. *Cytometry B Clin Cytom.* janv 2013;84(1):37-43.
72. Benachi A, Delahaye S, Leticee N, Jouannic J-M, Ville Y, Costa J-M. Impact of non-invasive fetal RhD genotyping on management costs of rhesus-D negative patients: results of a French pilot study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* mai 2012;162(1):28-32.
73. Bromilow IM, Duguid JK. Measurement of fetomaternal haemorrhage: a comparative study of three Kleihauer techniques and two flow cytometry methods. *Clin Lab Haematol.* juin 1997;19(2):137-142.

74. Sanchez C, Bertrand A, Linget C. Test de Kleihauer : intérêt et difficultés d'interprétation. La revue de biologie praticienne. sept 2012;LIII(38):45-50.
75. Sandler SG, Sathiyamoorthy S. Laboratory methods for Rh immunoprophylaxis: a review. Immunohematology. 2010;26(3):92-103.
76. Chambers E, Davies L, Evans S, Birchall J, Kumpel B. Comparison of haemoglobin F detection by the acid elution test, flow cytometry and high-performance liquid chromatography in maternal blood samples analysed for fetomaternal haemorrhage. Transfus Med. juin 2012;22(3):199-204.
77. Savithrisowmya S, Singh M, Kriplani A, Agarwal N, Mehra NK, Bhatla N. Assessment of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry and Kleihauer-Betke test in Rh-negative pregnancies. Gynecol. Obstet. Invest. 2008;65(2):84-88.
78. Dupont M, Gouvitsos J, Dettori I, Chiaroni J, Ferrera V. Intérêt de la technique de microtitrage des anticorps anti-RH1 dans le suivi immunohématologique des femmes enceintes. Transfus Clin Biol. oct 2007;14(4):381-385.



DECISION D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : BASSAN Cecile

Date, heure et lieu de soutenance :

Le 08 / 03 / 2013 à 18h00 Amphithéâtre ou salle : Amie

Avis du conseiller de thèse:

Nom : Charpentier Prénom : Agnès

- favorable
 défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 20/01/2013
Signature: A. Charpentier

Avis du Président de Jury

Nom : D. Dubreuil Prénom : Pastorick

- favorable
 défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 22/01/2013
Signature: [Signature]

Décision de Monsieur le Doyen:

- favorable
 défavorable

Le Doyen
[Signature]
L. DUBREUIL

Nom : BASSAN
Prénom : Cécile

Titre du mémoire : Mise au point technique d'une nouvelle méthode de quantification des hématies contenant de l'hémoglobine fœtale par cytométrie en flux. Comparaison avec le test de Kleihauer

Mots-clés : hémoglobine fœtale, cytométrie en flux, test de Kleihauer, hémorragie fœto-maternelle, allo-immunisation RH, hémoglobinopathie

Résumé : L'hémorragie fœto-maternelle (HFM) se définit par le passage anormal d'hématies fœtales dans la circulation sanguine maternelle au cours de la grossesse ou de l'accouchement. L'HFM est fréquente et peut passer inaperçue mais ses conséquences ne sont pas négligeables : anémie fœtale et/ou allo-immunisation maternelle (anti-RH1 notamment). Le diagnostic clinique d'une HFM étant tardif, les tests de diagnostic biologique doivent donc être performants. Le test de Kleihauer (TK) est la technique de référence pour détecter les hématies fœtales présentes dans le sang maternel sur un simple frottis sanguin. Néanmoins, le TK a des limites : test "opérateur dépendant" de médiocre reproductibilité s'il est positif, interprétation difficile en cas d'hémoglobinopathie associée car les hématies maternelles contenant de l'hémoglobine fœtale (HbF) ont une coloration "intermédiaire" avec le TK. Or, il est nécessaire d'obtenir le résultat de TK le plus précis possible car ce dernier permet d'évaluer le volume de l'HFM afin d'adapter la prise en charge de la mère et du bébé.

Nous avons évalué une nouvelle méthode de quantification des hématies contenant de l'hémoglobine fœtale par cytométrie en flux (CMF) grâce à un anticorps monoclonal anti-HbF. Pour cela, nous avons comparé les résultats obtenus par CMF et TK dans 110 échantillons de sang maternel reproduisant des situations d'HFM plus ou moins abondante ainsi que dans du sang de patientes atteintes d'hémoglobinopathie afin d'évaluer la capacité de la CMF à détecter les hématies intermédiaires du TK. La technique de CMF s'est avérée plus fidèle et plus précise que le TK pour dénombrer les hématies fœtales. De plus, la CMF peut pallier les faux positifs du TK dus à la présence d'hématies intermédiaires grâce à un examen attentif de la répartition des pics d'hématies adultes et fœtales contenant de l'HbF. Chez les patients atteints de drépanocytose, nos résultats concordent avec ceux de la littérature sur l'existence d'une corrélation logarithmique entre le pourcentage d'hématies maternelles contenant de l'HbF déterminées par CMF et le pourcentage d'HbF totale (électrophorèse). Toutefois, le seuil minimal de détection des hématies fœtales est plus élevé par CMF que par TK (cinq hématies fœtales pour 10000 hématies maternelles par CMF, une pour 10000 par TK). En outre, l'utilisation de la CMF requiert du personnel spécialisé et il est donc peu envisageable de l'employer en routine en remplacement du TK. Nous proposons donc une stratégie où le TK reste effectué en première intention : les TK négatifs ou faiblement positifs (< 5/10000) sont rendus directement et les TK positifs ($\geq 5/10000$) ou douteux sont analysés en CMF.

Membres du jury :

Président DUTHILLEUL Patrick, PU-PH Faculté de Pharmacie de Lille-CH Valenciennes

Assesseurs ROSE Christian, PU-PH Université Catholique de Lille-CH St Vincent de Paul
LE BARON Fabienne, PH CH Valenciennes
DELGRANCHE Aline, PH CH St Vincent de Paul
CHARPENTIER Agnès, MCU-PH Université Catholique de Lille-CH St Philibert