

Indications de la Biologie Moléculaire en Immuno-Hématologie Érythrocytaire et ses Outils.

*Pascal BAILLY, DR
Responsable Dép. Recherche*

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

Méthodes immunologiques (l'hémagglutination >> Ag érythrocytaires et Ac plasmatiques)

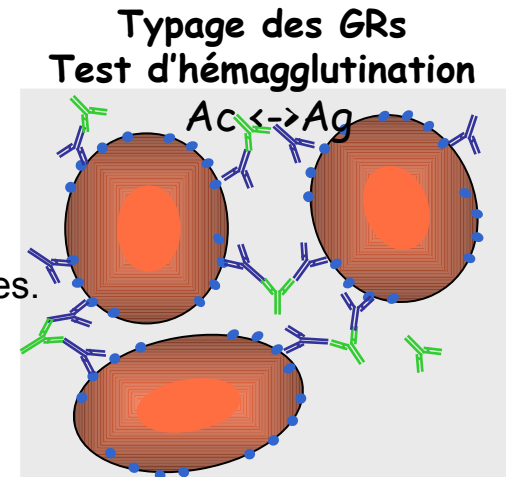
- simples, facile de réalisation et de faible coût,
- rapport sensibilité/spécificité adapté à la plupart des situations cliniques.

Les limites :

- difficultés d'interprétation des résultats,
- absence de certains réactifs,
- difficulté de prédiction du risque hémolytique fœtal / Alloimmunisation maternelle en contexte d'incompatibilité foeto-maternelle (IFM).

Ne permet pas la détermination :

- du phénotype des patients récemment transfusés et des patients avec un Coombs direct positif,
- des antigènes faiblement exprimés,
- du phénotype étendu d'un grand nombre de donneurs pour l'identification de phénotypes négatifs ou de donneurs de références pour les panels d'identifications des anticorps anti-érythrocytaires,
- du phénotype d'un fœtus à risque pour la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né (MHFNN).

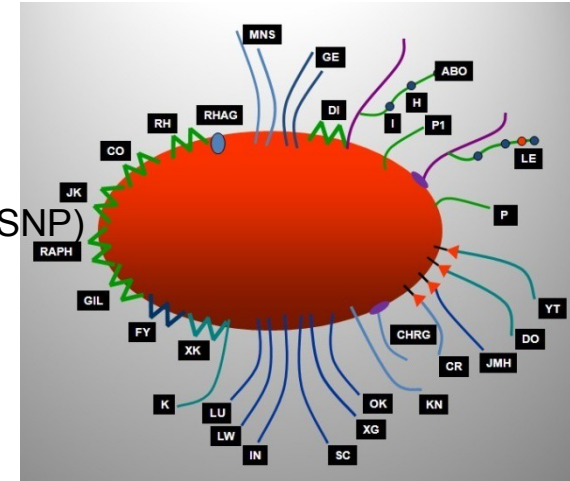


P
H
É
N
O
T
Y
P
E

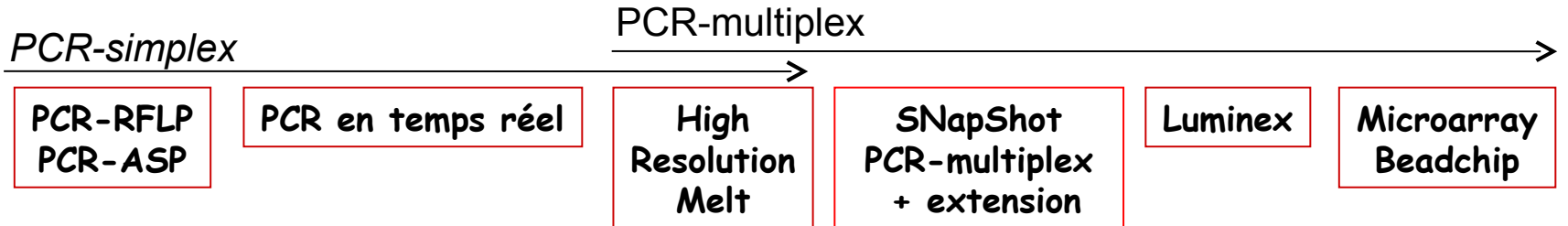
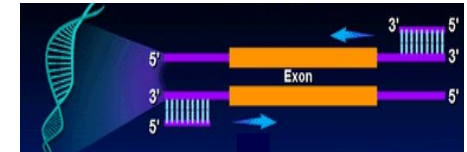
Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

Biologie moléculaire :

- exploration des GSE : ~300 AG / 35 sys.
- majorité des antigènes résultent de polymorphisme nucléotidique simple (SNP)
- Génotype → Phénotype déduit
- indiquée lorsque la sécurité transfusionnelle l'exige
- triple expertise : GSE, Techniques, Médecine/Biologie transfusionnelle exigeance de la biologie médicale (réglementaire et normatif)



Techniques disponibles : PCR (Polymerase Chain reaction)



Carte génétique
des GSs

Automatisation (prélèvement >> génotype)

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

Intérêt de la BM dans trois contextes :

► **IHM du donneur** —————> Risque >> faux négatif



Tout antigène (faible ou partiel) doit être étiqueté **POSITIF**

>< l'immunisation
du receveur

► **IHM du receveur** —————> Risque >> faux positif



Définir le statut faible ou partiel est **IMPORTANT**

>< l'immunisation
du receveur

Etiqueté : ↓ ↓
 + -

► **Situation clinicobiologique de la femme enceinte et du fœtus**

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

IHM du receveur/patient

Phénotype non réalisable sérologiquement ou difficultés d'interprétation

1. Patients récemment transfusés (< 3/4 mois)

- Image de double population : difficulté de distinction les GRs du patient des GRs transfusés
 - Fiabilité d'un phénotype : élément déterminant du choix d'un PSL ou interprétation RAI
 - Technique de séparation des auto/allo GRs : longues, complexes et sans garanties
- **Génotypage** (*absence de chimérisme post-transfusionnel*) > **phénotype déduit** > **gain de sécurité**
en adéquation avec l'urgence transfusionnelle

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

IHM du receveur/patient

Phénotype non réalisable sérologiquement ou difficultés d'interprétation

1. Patients récemment transfusés (< 3/4 mois)

- Image de double population : difficulté de distinction les GRs du patient des GRs transfusés
- Fiabilité d'un phénotype : élément déterminant du choix d'un PSL ou interprétation RAI
- Technique de séparation des auto/allo GRs : longues, complexes et sans garanties
- **Génotypage** (*absence de chimérisme post-transfusionnel*) > **phénotype déduit** > **gain de sécurité en adéquation avec l'urgence transfusionnelle**

2. Patients dont les hématies sont recouvertes d'IgG (TDA+)

- Compromet tout phénotypage utilisant des réactifs spécifiques avec un test à l'antiglobuline anti-IgG
- Positivité du réactif témoin interdit la validation de réaction positive obtenue avec le réactif
- En absence de réactifs salins à base d'IgM → Désaturation des GRs → incomplet et destruction AG
- **Génotypage** > **phénotype déduit** > **résoudre la RAI + choix des GRs d'absorption**

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

IHM du receveur/patient

3. Faible réactivité d'un antigène - Discordance entre deux réactifs

Système RH

- Expression affaiblie peut résulter d'un simple Ag faible ou d'un Ag partiel
- Absence de réactifs sérologiques
- Problématique du diagnostic différentiel entre auto- et allo-anticorps (RAI)

La Biologie Moléculaire permet de distinguer :

- un Ag Rh complet d'un Ag Rh partiel (*fonction des variants RHD et CE*)
- l'absence d'un HFA (*homozygote ou hétérozygote composite, «public négatif»*)
- la présence d'un LFA
- les allo-anticorps d'intérêt transfusionnel

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

IHM du receveur/patient

3. Faible réactivité d'un antigène - Discordance entre deux réactifs

Système RH

- Expression affaiblie peut résulter d'un simple Ag faible ou d'un Ag partiel
- Absence de réactifs sérologiques
- Problématique du diagnostic différentiel entre auto- et allo-anticorps (RAI)

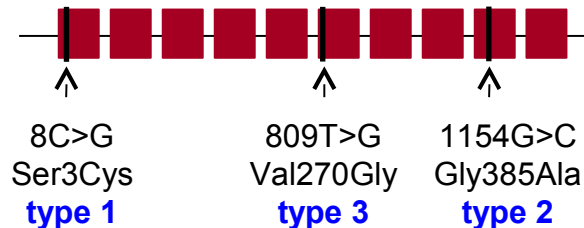
La Biologie Moléculaire permet de distinguer :

- un Ag Rh complet d'un Ag Rh partiel (*fonction des variants RHD et CE*)
- l'absence d'un HFA (*homozygote ou hétérozygote composite, «public négatif»*)
- la présence d'un LFA
- les allo-anticorps d'intérêt transfusionnel

RhD

- Recherche des variants faibles « complets » **RHD faible type 1, 2 et 3**
- Recherche de **partiels caractérisés** (complexe en cas **d'association de partiels**)
- Recherche de **variants non caractérisés** par séquençage (à considérer comme partiels)

RHD faible



À transfuser en RhD+
Optimiser les ressources

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

IHM du receveur/patient

3. Faible réactivité d'un antigène - Discordance entre deux réactifs

RhC Affaiblissement RHC par RH8 (Cw) ou par haplotype R_z (DCE)

RHC partiel

- $RHCE^*Ce(RN)$



Hétérozygote avec en *trans* $RHce$ ou $RHcE$ (avec ici aussi **Rhe partiel**), RH:20

Homozygote avec **Rhe partiel**, RH:-46

- l'haplotype (C)ces



Hétérozygote avec en *trans* $RHce$ ou $RHcE$ (avec ici aussi un **Rhe partiel**), RH:20

Homozygote avec **RHe partiel**, RH:-31, -34

Autres variants avec présence du polymorphisme RHC (*insertion 102bp, intron 2*)

À considérer comme **RhC faible**

Autres variants avec absence du polymorphisme RHC

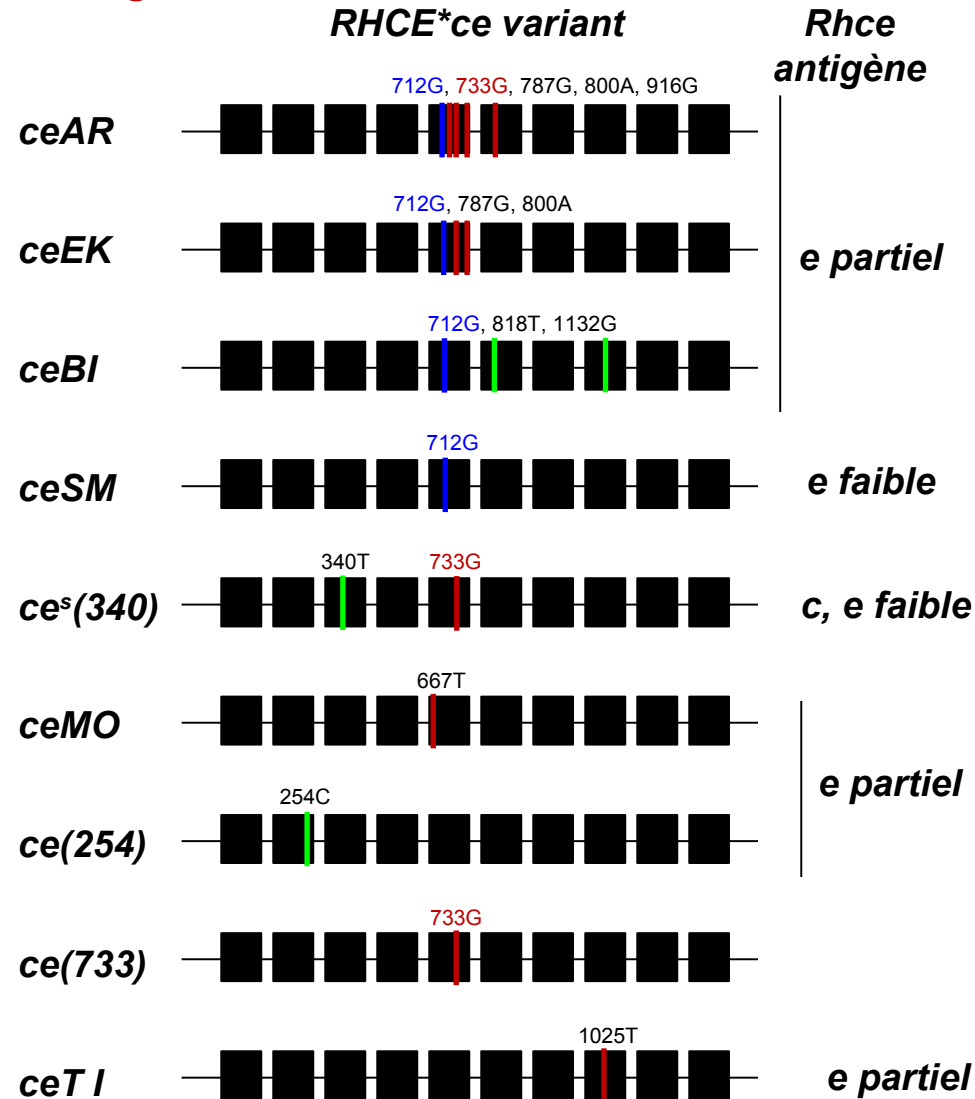
À considérer comme **RhC partiel**

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

IHM du receveur/patient

3. Faible réactivité d'un antigène - Discordance entre deux réactifs

Rhe

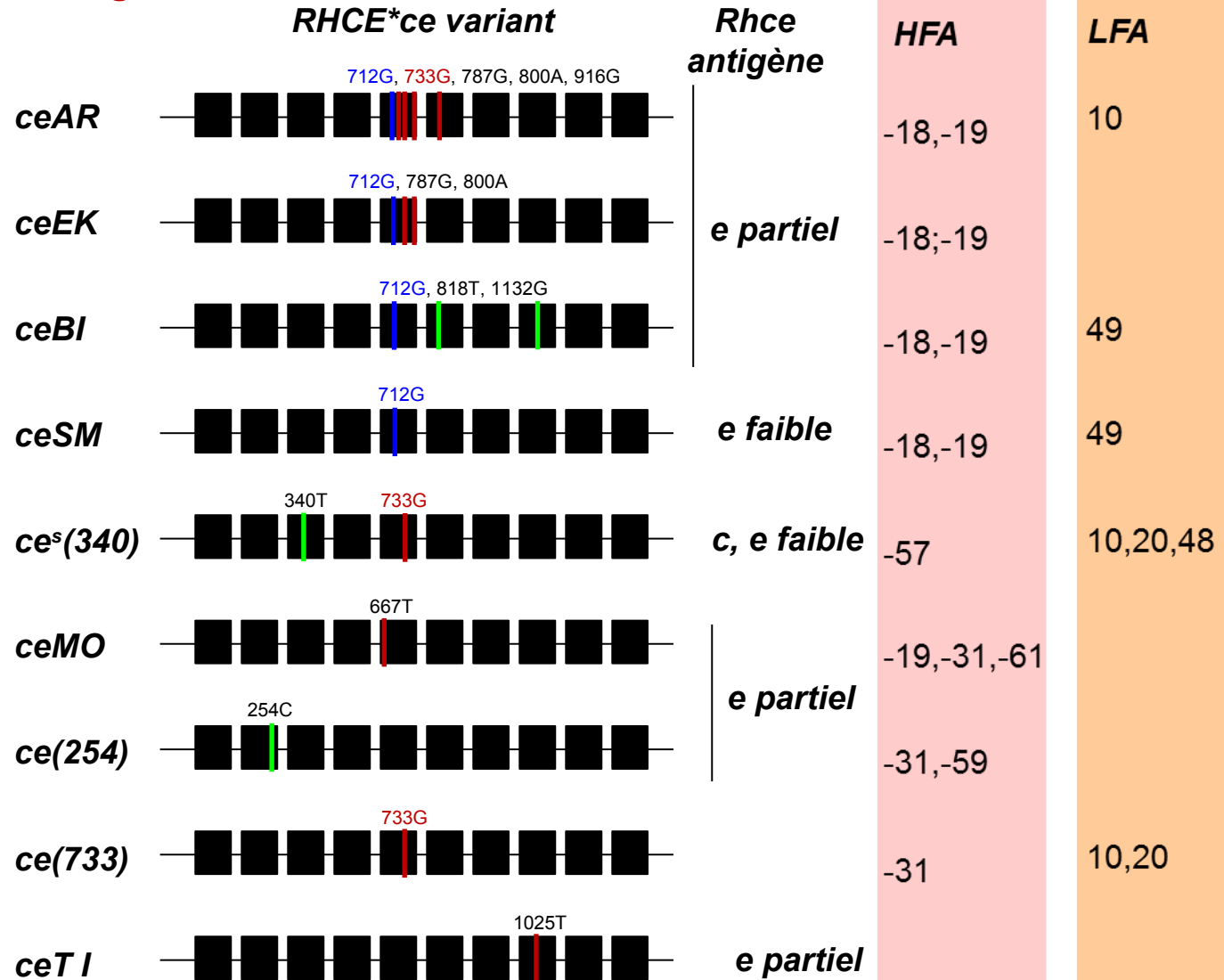


Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

IHM du receveur/patient

3. Faible réactivité d'un antigène - Discordance entre deux réactifs

Rhe



Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

IHM du receveur/patient

3. Faible réactivité d'un antigène - Discordance entre deux réactifs

Rhe	RHD variant	RhD antigène	RHCE*ce variant	Rhce antigène	HFA	LFA
			712G, 733G, 787G, 800A, 916G			
DAR		partiel			-18,-19	10
			712G, 787G, 800A			
				<i>e partiel</i>	-18,-19	
			712G, 818T, 1132G			
DOL		partiel			-18,-19	49
			712G			
				<i>e faible</i>	-18,-19	49
			340T, 733G			
DAU0		normal		<i>c, e faible</i>	-57	10,20,48
			667T			
				<i>e partiel</i>	-19,-31,-61	
			254C			
Dw4.0		partiel			-31,-59	
			733G			
D, DIIIa,Dw4.0		normal/ partiel			-31	10,20
			1025T			
DIIIa, DIVa		partiel		<i>e partiel</i>		

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

IHM du receveur/patient

3. Faible réactivité d'un antigène - Discordance entre deux réactifs

Autres systèmes

Antigène	Phénotype	Apporte de la BM
KEL	val. rare	<i>KELmod, KEL*3 (Kpa)</i>
	validation	McLeod phénotype, abs. de KX
Fyb	validation	<i>FY*Fyx</i>
JK	validation	InJK
LU	validation	<i>In(Lu) > facteur de transcription KLF1</i> (Fixation/élution positive)

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

IHM du receveur/patient

3. Faible réactivité d'un antigène - Discordance entre deux réactifs

Autres systèmes

Antigène	Phénotype	Apporte de la BM
KEL	val. rare	<i>KELmod</i> , <i>KEL*3 (Kpa)</i>
	val.	McLeod phénotype, abs. de KX
Fyb	val.	<i>FY*Fyx</i>
JK	val.	InJK
LU	val.	<i>In(Lu)</i> > facteur de transcription <i>KLF1</i> (Fixation/élution positive)

4. Valider l'absence d'antigènes antithétique et donc l'absence de HFA

Ags antithétiques absents	Ags associés absences
D, C-, E-, c-, e- (RH:1,-2,-3,-4,-5)	RH17
D-, C-, E-, c-, e- (RH:-1,-2,-3,-4,-5)	RH29 et FY5
K-,k- (KEL:-1,-2)	KEL5 et KEL20
Fy(a-,b-), FY:-1,-2	FY3 et FY5
Jk(a-,b-), JK:-1,-2	JK3
S-s- (MNS:- 3,-4)	MNS5 (U)

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

IHM du receveur/patient

5. Dépistage systématique d'un phénotype rare (critères : ethnologie, pathologie)

- détection de variants rares africains : ceCF, Js^a, RH10/20, Uvar, RH:-18, -34, -46

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

IHM du receveur/patient

5. Dépistage systématique d'un phénotype rare (critères : ethnologie, pathologie)

- détection de variants rares africains : ceCF, Jsa, RH10/20, Uvar, RH:-18, -34, -46

6. Aide à la décision en cas de RAI complexe

- **Coexistence Ag/Ac**

Anti-D avec un phénotype RhD+
Anti-C avec un phénotype RhC+
Anti-E avec un phénotype RhE+
Anti-c avec un phénotype Rhc+
Anti-e avec un phénotype Rhe+

**Distinction auto et allo:
BM si auto-adsorption impossible
en vue de détecter un partiel**

- **Validation d'une spécificité en absence de réactif (Do, Yt, Co....)**

- **Suspicion d'un anti-public en contexte d'agglutination de la totalité du panel**

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

IHM du receveur/patient

Phénotype > indications de la BM

- Difficultés de Phénotypage (DP, TCD, Affaiblissement/Discordance, Abs. d'Ags antithétiques)
- Difficultés de RAI (coexistence Ag/Ac, Abs. de réactif, pan agglutination)

Pas nécessaire pour tous, fonction de la situation bioclinique

Faut il les résoudre?

- Age
- Sexe
- Ethnie
- Pathologie (poly transfusé itératif)
- Espérance de vie
- RAI

Y a-t-il une alternative sérologique à la BM ?

Biologie Moléculaire
Génotype

CONSEIL TRANSFUSIONNEL

- Autres variants
- Gène inh., rég.

- Impact sur :**
- la sécurité transfusionnelle et obstétricales
 - la conduite transfusionnelle (choix de la CGR) ou obstétricale (+/- γ globulines)
 - une meilleur gestion de la ressources

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

Situation clinicobiologique de la femme enceinte et du fœtus :

- Risque à prévenir : la maladie hémolytique du nouveau-né (MHNN) lié à l'immunisation fœto-maternelle RhD (IFM)



I - Diagnostic anténatale RhD non invasif sur ADNg fœtal à partir du plasma maternel (Lo et al., *Am J Genet* 1998, 99)

- ➔ Suivi des femmes allo-immunisé anti-RhD ➤ Prédiction du statut *RHD* du fœtus permet de réserver un suivi aux femmes avec un fœtus *RHD+*
 - ➔ Indication de l'immunoprophylaxie RH anté-natale par injection de γ globulines anti-RhD
 - En absence de prophylaxie : 5-10% en G1 et 20% en G2
 - En cas de prophylaxie ciblée post-partum : 1%
 - En cas de prophylaxie anté-natale systématique 28SA : 0,3%
- ▼
- Prévention par excès : 40% des femmes RhD- ont un enfant RhD- ➤ Prédiction du statut *RHD* du fœtus permet de réserver, les γ globulines anti-RhD aux femmes RhD- avec un fœtus *RHD+*

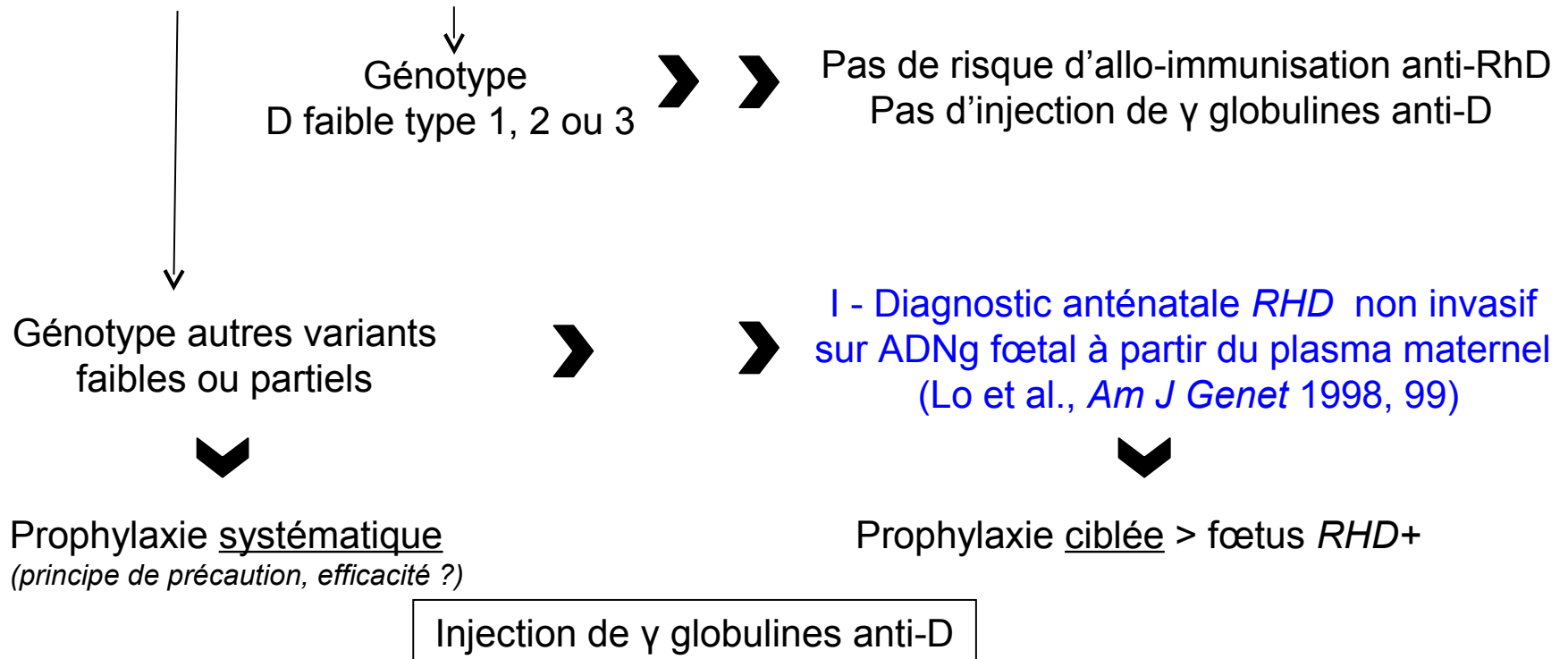
* *DA est validé techniquement, inclus dans les algorithmes décisionnels mais toujours en évaluation économique*

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

Situation clinicobiologique de la femme enceinte et du fœtus

- Risque à prévenir : la maladie hémolytique du nouveau-né (MHNN) lié à l'immunisation fœto-maternelle RhD (IFM)

II - Exploration moléculaire de tout affaiblissement de l'antigène RhD chez la femme enceinte



Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

IHM du donneur

- Augmenter la disponibilité de CGR renseigné pour les système JK, FY et Ss

Respect du phénotype étendu chez les patients avec 1 anticorps

Objectif de la BM : remplacer la sérologie / impacts économique

Enjeu : Tester de nbre donneurs >> chaîne automatisé haut débit

- Dépister l'absence simultanée d'antigènes communs (ex: C-,E-,Fy(a-),Jk(b-))

- Tester des antigènes pour lesquels les réactifs sont absent (anti-DO, -CO, -Yt)

Objectif double de la BM : transfusionnel et production de panel d'identification plus complet

Enjeu : Tester de nbre donneurs >> chaîne automatisé haut débit

- Dépister des géno(phéno)types rares (Afrique subsaharienne) >> BNSPR (réactifs absents)

Objectif de la BM : détecter l'absence HFA (U, RH18, 34, 46), la présence LFA (RH10, 20, Js^a) et marqueurs impactant la préparation et la conservation des CGR (trait drépanocytaire, G6PD)

Enjeu : génotypage sur donneurs ciblés / les sensibiliser / éthique : définir les variants d'intérêt

- *Enjeu technologique*

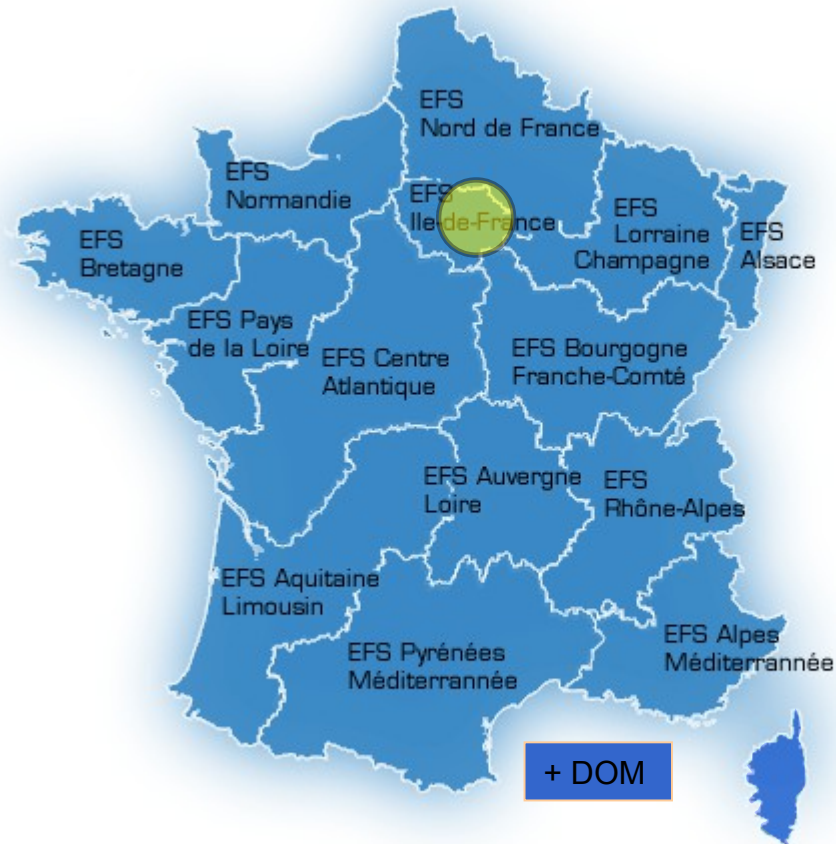
Choix technologique PCR simplex : (+) souplesse , (-) une réaction par SNP

PCR multiplex : (+) une réaction pour plusieurs SNP, (-) souplesse

- **Dans tous les cas : chaîne automatisé haut débit, robustesse de la détection**

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

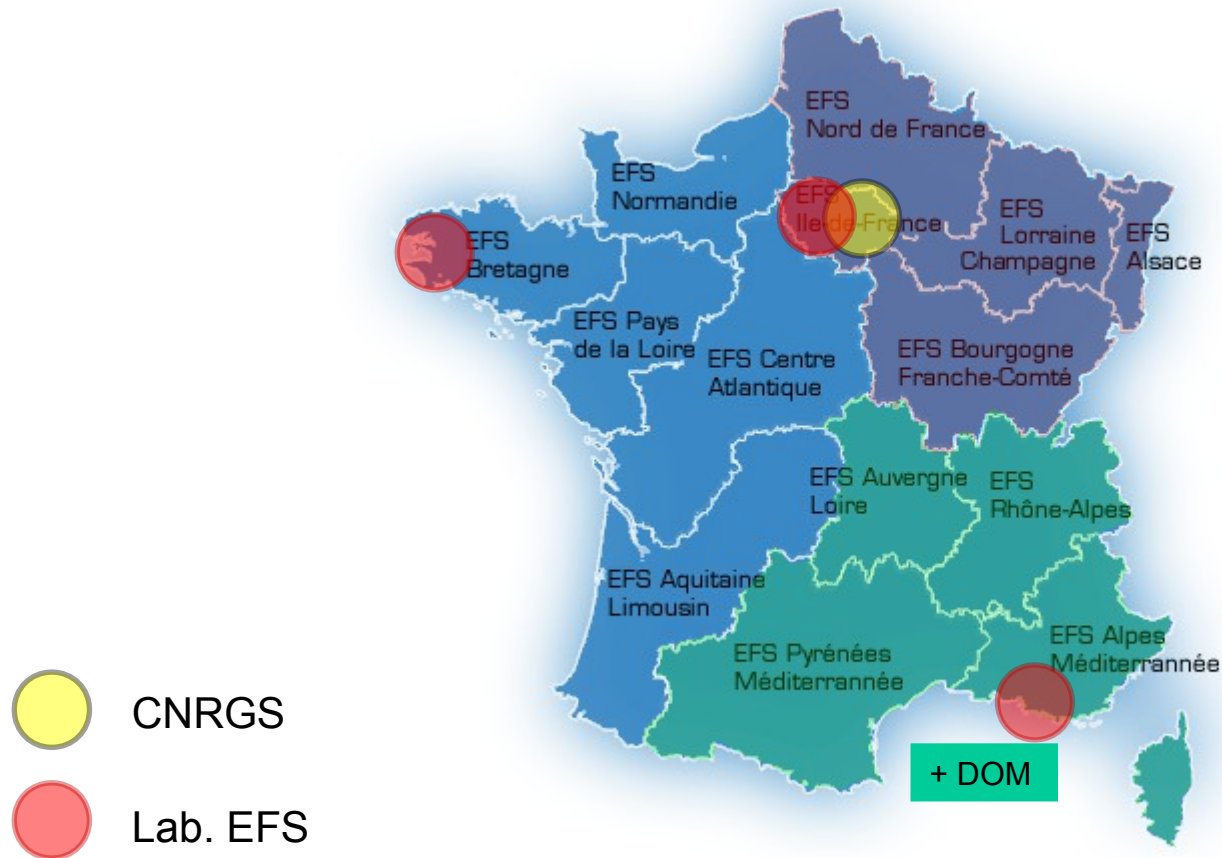
Plateforme de génotypage érythrocytaire en Métropole



 CNRGS

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

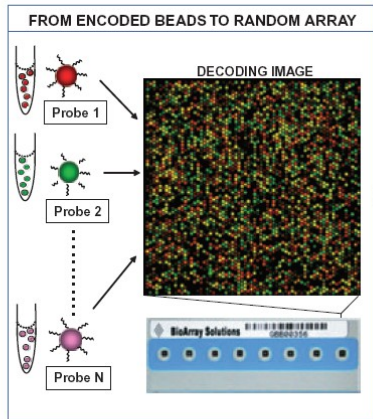
Plateforme de génotypage érythrocytaire en Métropole



Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

Les outils commerciaux

BioArrays

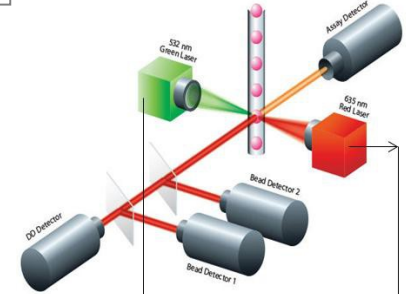


Immobilisées

PCR-multiplex

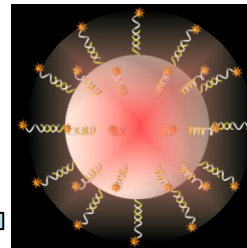
Hybridation sur billes
À une couleur de billes correspond une sonde spécifique

Luminex



En solution

Marquage



dCTP-Rhodamine

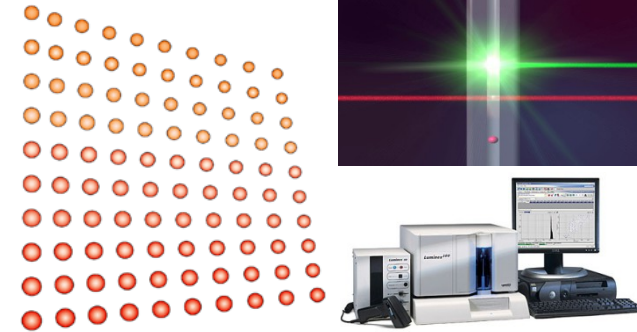
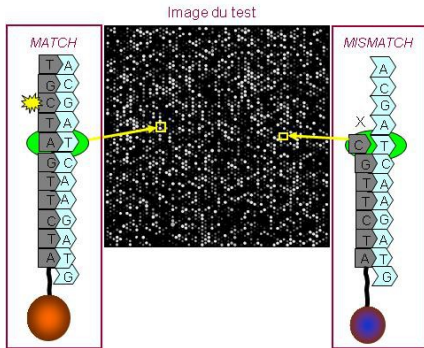
Streptavidine-PE

Laser rouge identification de la bille
 Laser vert pour mesure le marquage

Lecteur

Log. d'analyse

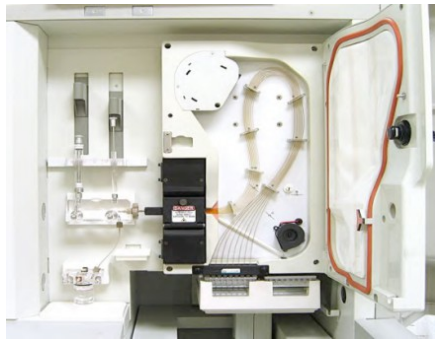
HEA,
 RHD, RHCE, HPA



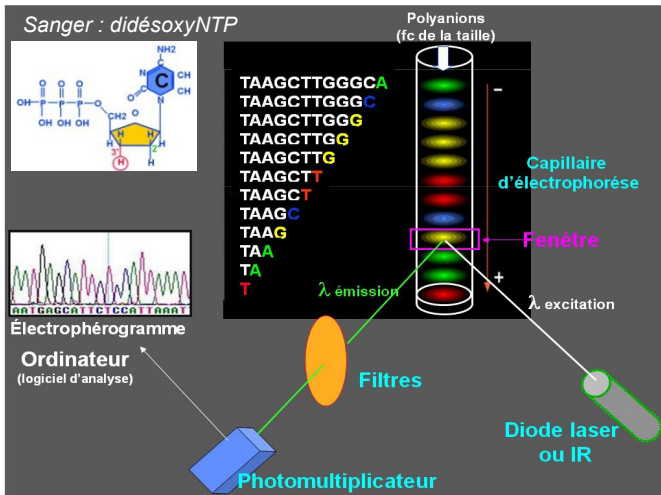
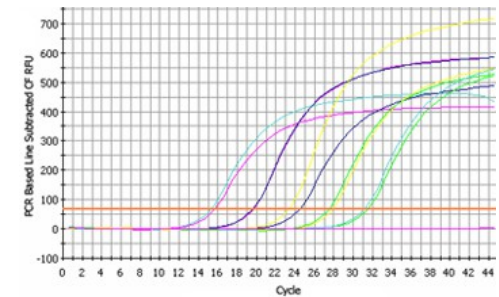
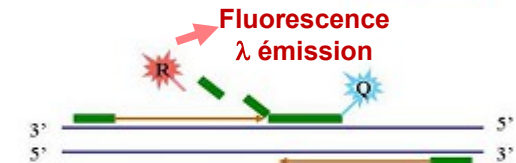
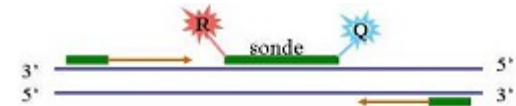
Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

Les outils complémentaires: (C)ces, RN, ce(254), gènes RHD, RHCE.....etc.

Séquençage

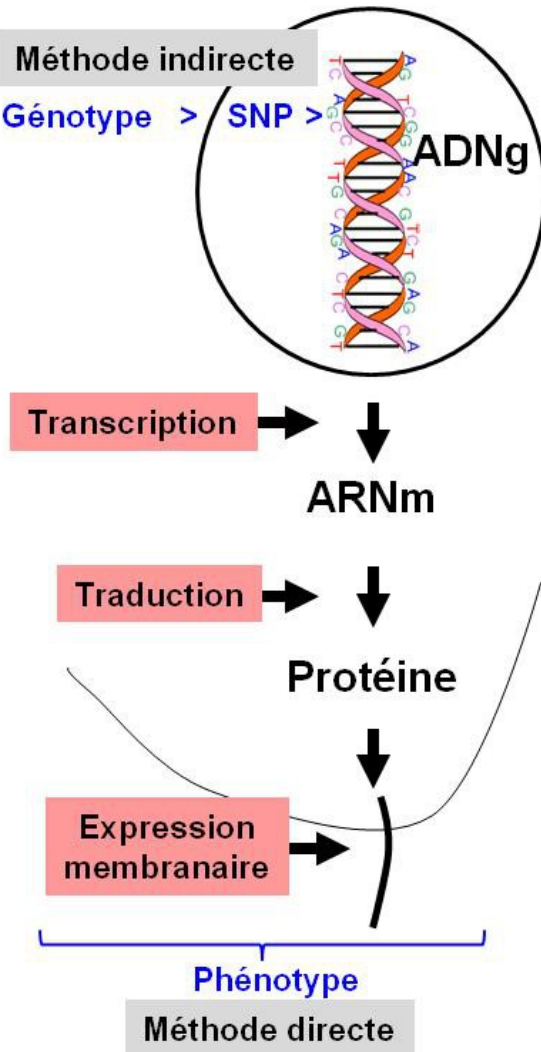


TaqMan
(sonde
d'hydrolyse)



Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

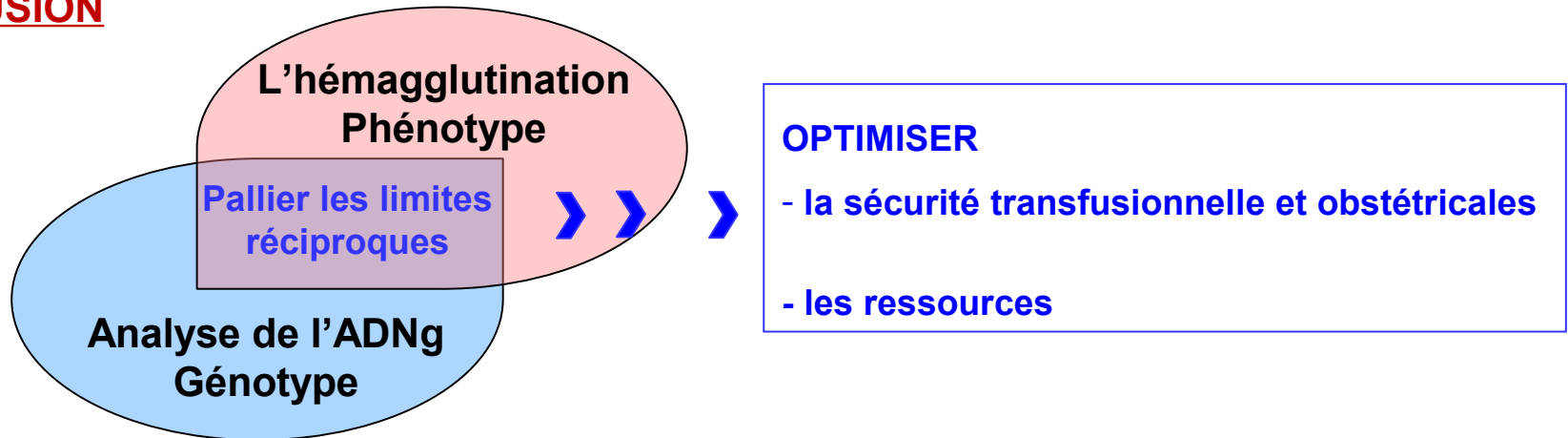
Les limites de la BM



- **Non prise en compte de certains polymorphismes** (Ethnie) > Discordance Gène/Ag
- **Limite pour les systèmes très polymorphes** >> ABO et RH
>< Détermination du phénotype O, sérologie = méthode de choix
- **Spécificité dont le mécanisme moléculaire est méconnu** (Ac rare mais sévère RT/MHNN) **ou lié à des interactions moléculaires au niveau membranaires ou génétiques:** gène inhibiteur (*In(Lu)*) et RHAG pour le Rhnull régulateur
- **Historique clinique et biologique** (transplantation CS et chimérisme > génotype des ϕ somatiques \neq leucocytes)
- **Génotype négatif doit être confirmé en technique d'hémagglutination**

Indications de la Biologie Moléculaire en IHE et ses Outils

CONCLUSION



Intégration du génotypage en médecine transfusionnelle passera par :

- *Connaissance des caractéristiques génétiques des GS dans les différentes populations
(corrélation géno/phéno, la relevance clinique des variants >< allo-immunisation)*
- *Expertise dans l'interprétation des résultats de BM,*
- *Développement d'outils en adéquation avec l'origine ethnique (+ haute cadence pour la QBD)*
- *Mise en œuvre des pratiques transfusionnelles adaptées*
- *Veille scientifique*