



**Donnons  
au sang**  
*Le pouvoir  
de soigner*

# INDICATIONS DE GÉNOTYPAGE ÉRYTHROCYTAIRE DEVANT UNE DIFFICULTÉ EN SÉROLOGIE IH

21 mars 2024  
Rencontres TACT

A thick red line starts from the top left, curves down and right, then loops back up and left, ending at the top center. It is partially cut off by the left edge of the slide.

# Sommaire

**Biologie moléculaire en IH**

**Le système RH**

**Les indications de génotypage érythrocytaire**

**Cas cliniques**



**01**

# **BIOLOGIE MOLÉCULAIRE EN IH**

# Bases génétiques

Biologie moléculaire : étude de l'ADN du patient (Acide Désoxyribo Nucléique)  
L'ADN est le matériel génétique support de l'hérédité

## Structure :

- Chaîne linéaire de nucléotides.
- Chaque nucléotide possède un pentose, un groupement phosphate et une base azotée (Adénine A, Guanine G, Cytosine C, Thymine T)
- 2 chaînes d'ADN s'associent entre elles → double hélice

## Chromosome :

- Compactage de l'ADN sous forme de chromosome
- Dans l'espèce humaine, 22 paires de chromosomes homologues et 2 chromosomes sexuels (XX chez la femme et XY chez l'homme)
- Transmission : 50% maternelle et 50% paternelle

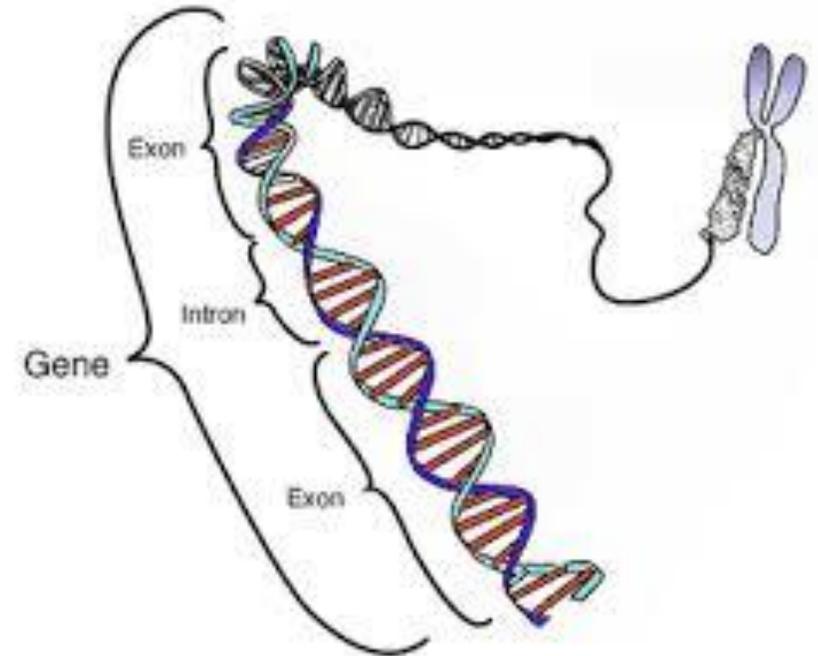
## Gène :

- Unité d'information sur le chromosome
- Promoteur, exon (séquence codante), intron (séquence non codante)

## Du gène à la protéine :

Transcription : ARN

Traduction : acides aminés → protéines



# Définitions

## Locus

Position d'un gène sur un chromosome

## Allèle

Formes alternatives d'un gène à un locus donné

Un individu est dit homozygote lorsqu'il possède 2 allèles identiques au même locus

Un individu est dit hétérozygote lorsqu'il possède 2 allèles différents au même locus

## Haplotype

Ensemble de gènes contigus sur un même chromosome transmis simultanément de génération en génération (exemple : Dce)

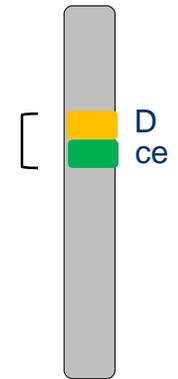
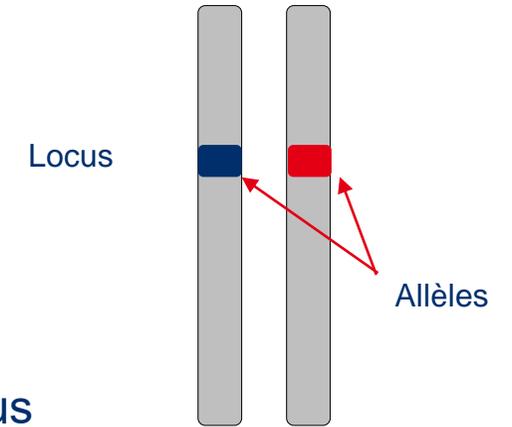
## Génotype

Ensemble des gènes d'un individu (environ 35000 gènes chez l'homme),

Utilisé de manière restreinte pour un locus donné.

## Phénotype

Ensemble des caractères observés.



# La technique BioArray en biologie moléculaire

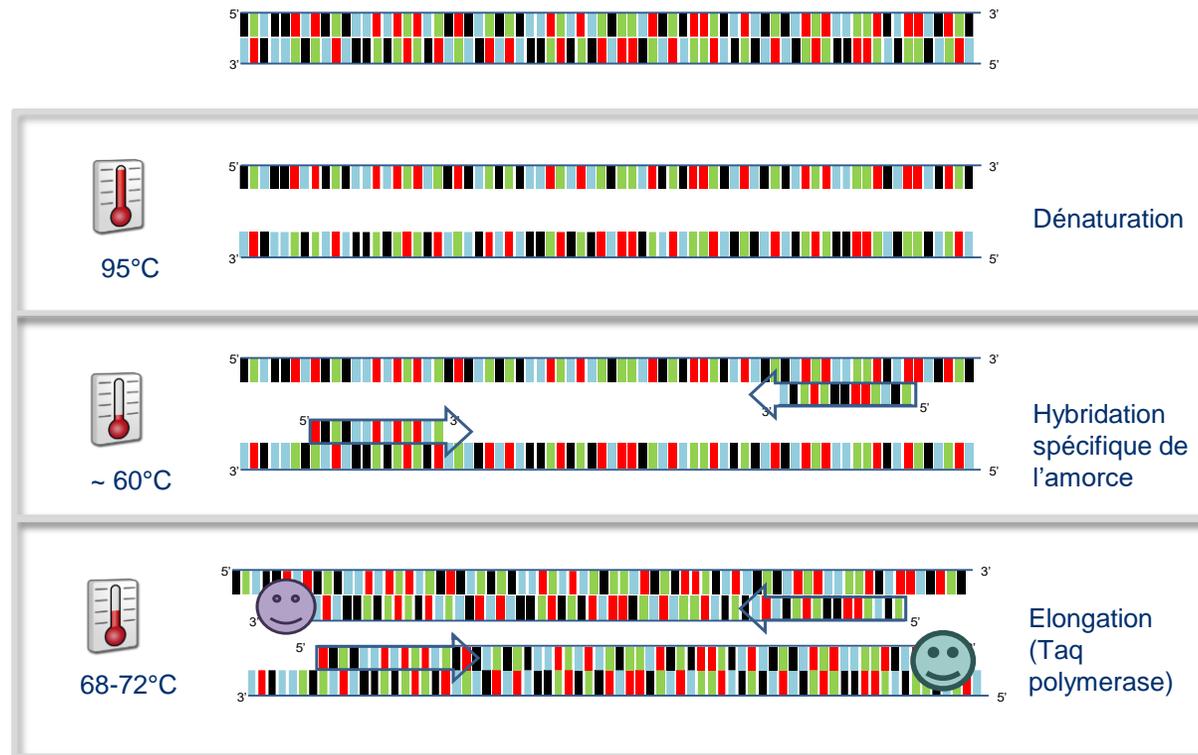


Couche leuco-plaquettaire

## Etape 1 : Extraction de l'ADN

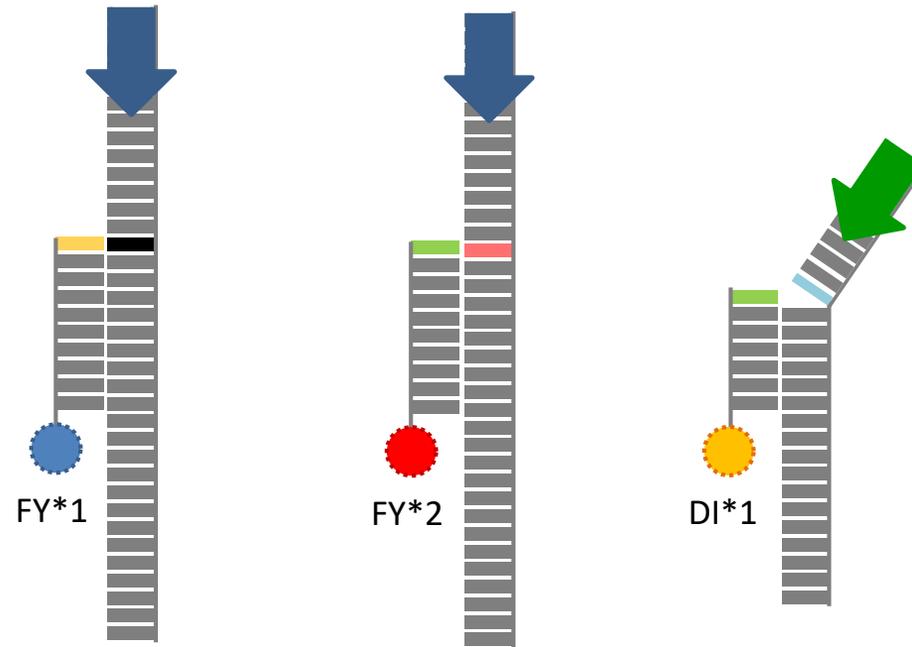
- L'ADN peut être extrait à partir du sang total (leucocytes), salive
- Principe : par solubilité différentielle des acides nucléiques entre 2 phases non miscibles
- Dosage de l'ADN par spectrophotométrie
  - Analyse quantitative →  $\mu\text{g/ml}$
  - Analyse qualitative (contamination protéique)

## Etape 2 : Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) avec génération d'un simple brin



# La technique BioArray en biologie moléculaire

## Etape 3 : Hybridation et élongation



- Utilisation de billes synthétiques (3µm de diamètre)
- Les billes sont recouvertes de sonde spécifique d'un allèle, teintées par des couleurs uniques chacune spécifique d'un allèle
  - Le **bleu** : Allèle *FY\*1*
  - Le **rouge** : Allèle *FY\*2*
  - Le **jaune** : Allèle *DI\*1*
- Si présence sur l'ADN du patient de l'allèle correspondant à la bille : hybridation et **élongation** → fluorescence
- Si absence sur l'ADN du patient de l'allèle correspondant à la bille : absence d'hybridation et **élongation** → pas de fluorescence

# La technique BioArray en biologie moléculaire

## Etape 4: Lecture et interprétation

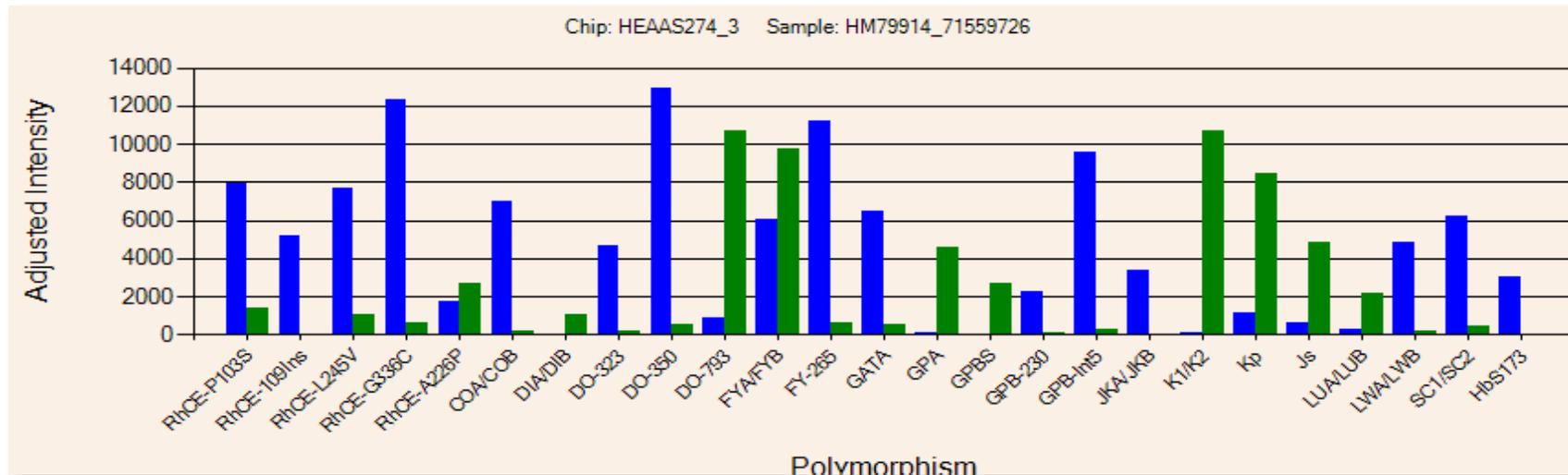
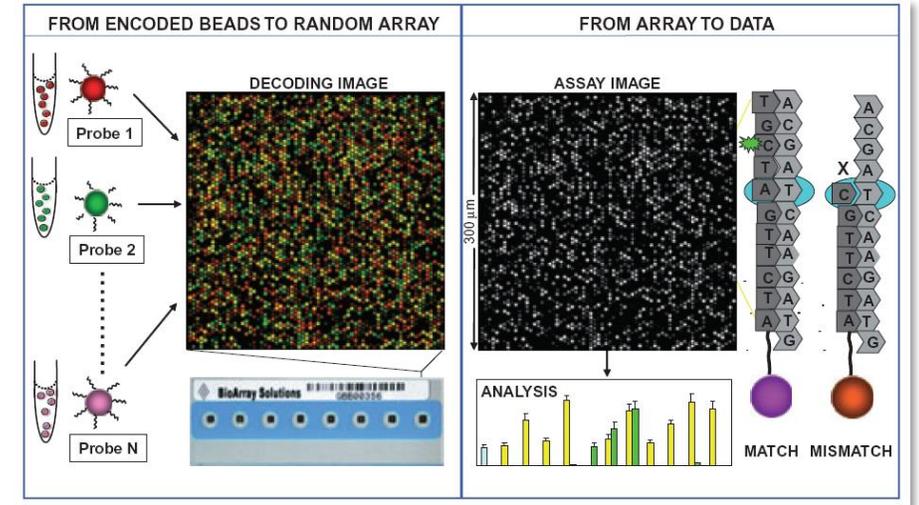
Prise en compte de la fluorescence associée à chaque sonde si hybridation et élongation il y a eu

Principe de comparaison avec « les valeurs attendues »

Le logiciel réalise un calcul du ratio de la fluorescence pour déterminer le génotype

Intégration des résultats sous forme de graphique

Présence d'un pic = présence de l'allèle chez le patient



# La technique BioArray en biologie moléculaire

## HEA: Human Erythrocyte Antigen

- 24 polymorphismes de groupes sanguins érythrocytaires
- C/c, E/e, K/k, MNSs, Jka/Jkb, Fya/Fyb, Dia/Dib, Coa/Cob, LWa/LWb, Sc1/Sc2, Doa/Dob, Hy, Joa, Lua/Lub, Jsa/Jsb, Kpa/Kpb

## RHD

- 35 polymorphismes du gène *RHD*

## RHCE

- 25 polymorphismes du gène *RHCE*



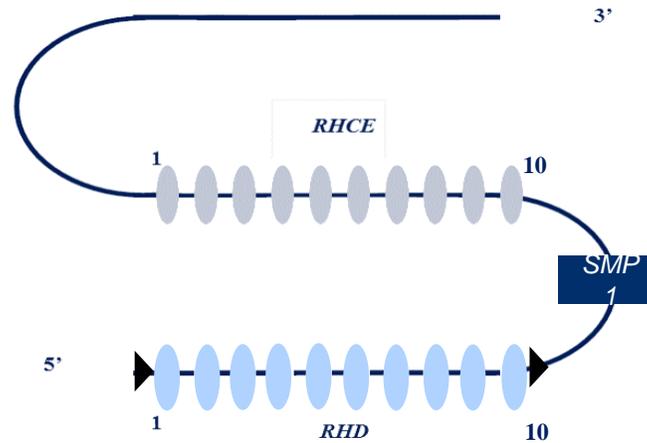
02

## LE SYSTÈME RH

# LE SYSTEME RH

Le système RH est le 4<sup>ème</sup> système décrit par l'ISBT

- Système complexe et polymorphe
- 56 antigènes dont 5 testés en routine : D (RH1), C (RH2), E (RH3), c (RH4), e (RH5)
- L'antigène D est le plus immunogène



Ce système est codé par 2 gènes : Le **gène RHD** et le **gène RHCE**

Locus sur le chromosome 1

Chaque gène comprend 10 exons et code pour une protéine de 417 acides aminés

- Homologie entre 2 gènes à 96%
- Hautement polymorphes
- Orientation face à face

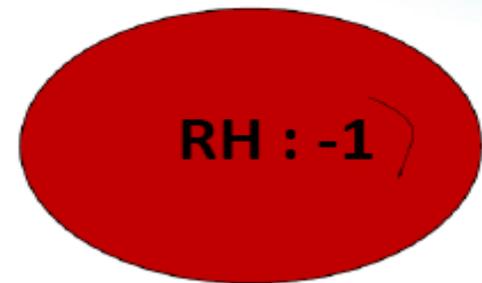
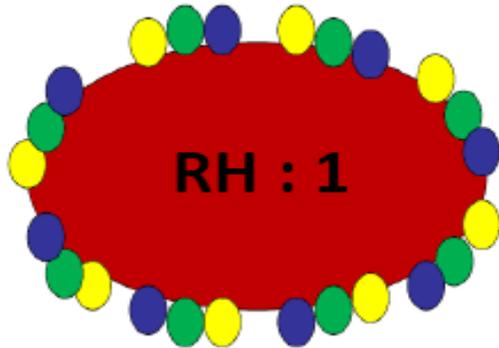
Favorise les échanges nucléotidiques produisant des gènes hybrides ou des réarrangements nucléotidiques

# Bases moléculaires

Complexité de l'antigène D :

L'antigène D est une mosaïque de sous unités (épitopes)

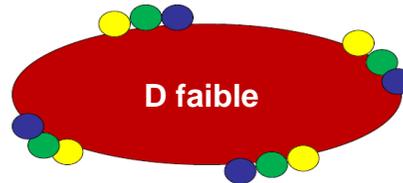
- Toutes présentes chez le sujet RHD positif (RH1)
- Toutes absentes chez le sujet RHD négatif (RH:-1)



# Bases moléculaires : Variants du D

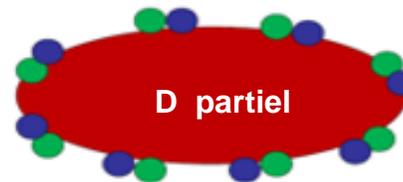
## Phénotype D faible

- Ensemble des épitopes présents mais nombre d'antigènes diminué
- Ne produisent classiquement pas d'allo-anticorps anti-D
- Consensus national pour considérer les D faibles de type 1, 2, 3 et 4.0 D positif
- Population européenne



## Phénotype D partiel

- Un ou plusieurs épitopes D manquants
- Porteurs peuvent produire un allo-anticorps anti-D en cas d'exposition par transfusion et/ou par grossesse
- Population africaine



# Bases moléculaires : Variants du gène *RHCE*

- Variants d'intérêt clinique plutôt rares chez les caucasiens : variants *RH\*Ce* et *RH\*cE*
- Variants fréquents dans la population afro-antillaise : variants *RH\*ce* essentiellement
- Impact possible des variants sur l'expression des 2 antigènes exprimés par la protéine RhCE (c/e, C/e par ex.), mais potentiellement compensé par la 2<sup>ème</sup> protéine RhCE exprimée

Allèle	Gène <i>RHCE</i> et polymorphismes présents	Ag altéré	Ag de basse fréquence exprimé	Ag de haute fréquence absent
<b><i>RN</i></b>	577G 	C, e	RH:32, 54	RH:46
<b><i>(C)ce<sup>s</sup>(1006)</i></b>	733G 1006T 	C, c, e	RH:20	RH:31, 34
<b><i>ceAR</i></b>	712G,733G,787G,800A,916G 	c, e	RH:10	RH:18, 19
<b><i>ceEK</i></b>	712G,787G,800A 	e		RH:18, 19
<b><i>ceBI</i></b>	712G,818T,1132G 	e	RH:49	RH:18, 19
<b><i>ceSM</i></b>	712G 	e	RH:49	RH:18, 19
<b><i>ce<sup>s</sup>(340)</i></b>	340T, 733G 	c, e	RH: 10, 20, 48	RH:57
<b><i>ceMO</i></b>	667T 	c, e		RH:19, 31, 61
<b><i>ce(254)</i></b>	254T 	e		RH:31, 59
<b><i>ce(733)</i></b>	733G 	e	RH: 10, 20	RH:31
<b><i>ceTI</i></b>	1025T 	c, e	RH: 10	



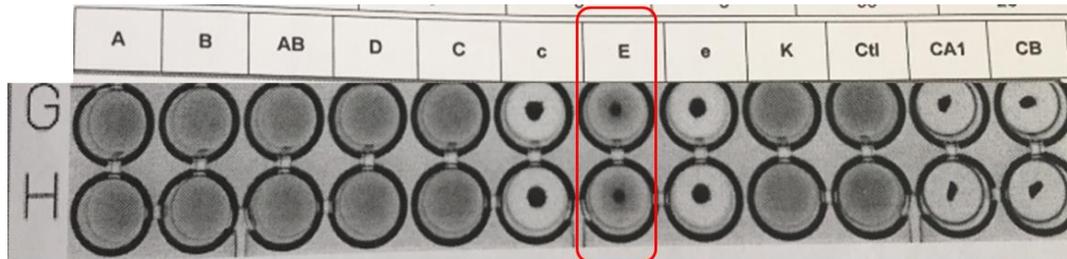
**03**

## **LES INDICATIONS PRINCIPALES**

# Les principales indications du phénotype RHD ET RHCE déduit du génotype

## 1) Transfusion récente :

- Présence de double(s) populations (s) lors du groupage RHD et RHCE,
- Notion de transfusion <4 mois,
- Groupage initial non connu et phénotype de la poche inconnu (pas d'interprétation de groupage possible sous dérogation d'un biologiste)
- Lorsque le phénotype RHD et RHCE doit être respecté en transfusion
- Exemple: Patiente de 36 ans, transfusée à l'étranger avec une double population sur l'antigène E



# Les principales indications du phénotype RHD ET RHCE déduit du génotype

## 2) Ambiguïté réactionnelle, discordance de résultats entre deux clones de réactifs, profil sérologique inhabituel

- Recherche de variants dans le système RH.
- Ces variants peuvent être à l'origine d'antigène faible (à considérer positif), d'antigène partiel (à considérer négatif), d'apparition d'antigène de faible fréquence ou encore de disparition d'un antigène de grande fréquence.
- Point d'appel de certains phénotypes rares (RH:-46, RH:-34...)
- Exploration systématique des phénotypes rares retrouvés en sérologie

D-C+E-c-e+ :  $r'r'$

D-C-E+c+e- :  $r''r''$

D+C+E+c-e- :  $R_zR_z$

D-C+E+c-e- :  $r^{\gamma}r^{\gamma}$

D-C+E+c-e+ :  $r'r^{\gamma}$

D-C+E+c+e- :  $r''r^{\gamma}$

Phénotypes rares

# Les principales indications du phénotype RHD ET RHCE déduit du génotype

2) Ambiguïté réactionnelle, discordance de résultats entre deux clones de réactifs, profil sérologique inhabituel

**Que faire face à un affaiblissement du D au laboratoire ?**

**Solution idéale :**

- Considérer tous les patients comme D- si réactivité de l'antigène D < 4+
- Pratiquer une prophylaxie anti-D si réactivité de l'antigène D < 4+

**Mais :**

- Problème de disponibilité des CGR D négatif
- Phénotype RHCE associé : c négatif et e négatif ?
- Coût/efficacité et bénéfice/risque pour la prophylaxie anti-D par excès

# Les principales indications du phénotype RHD ET RHCE déduit du génotype

## 2) Ambiguïté réactionnelle, discordance de résultats entre deux clones de réactifs, profil sérologique inhabituel

### Génotypage RHD

Prise en compte :

- De l'intensité des réactions
- Sexe, âge et origine ethnique du patient
- Phénotype RHCE associé

### Indications biologie moléculaire



### Indications du respect du phénoRHK en transfusion

**Si réaction positive supérieure ou égale à 3+ du RH1 et du « CDE »**  
Validation d'une réaction positive.  
Ajout du commentaire « Antigène D affaibli, positif en technique filtration » (AMB)

Si réaction positive et inférieure ou égale à 2+ du RH1 et du « CDE » :	
Indication de génotypage RHD	Si pas d'indication de génotypage:
<ul style="list-style-type: none"><li>-Une femme &lt; 50 ans, de phénotype associé ccee (systématique)</li><li>-Une femme &lt; 50 ans, de phénotype associé E pos ou C pos (conseillé)</li><li>-<b>une discordance</b> de l'antigène selon la méthode utilisée ou une antériorité, pour un sujet de &lt; 50 ans</li><li>-Un patient atteint d'hémoglobinopathie (drépanocytaire ou thalassémique)</li><li>-Un patient Polytransfusé itératif : au cas par cas, avec accord du prescripteur</li></ul>	Ag D rendu positif Ajout du commentaire « Antigène D affaibli, positif en technique filtration » (AMB)

# Les principales indications du phénotype RHD ET RHCE déduit du génotype

## 2) Ambiguïté réactionnelle, discordance de résultats entre deux clones de réactifs, profil sérologique inhabituel

### Génotypage RHCE

Prise en compte :

- Sexe, âge et origine ethnique du patient
- Phénotype RHCE associé

### Indications biologie moléculaire



### Indications du respect du phénoRHK en transfusion

Antigène C(RH2)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Si le patient est Afro antillais (H/F) &lt;50 ans de phénotype <b>D+CCee (RH-46 ?)</b> ou de phénotype <b>D-Ccee (RH-34 ?)</b></li><li>- femme &lt;50 ans si doute sur origine</li></ul>
Antigène E(RH3)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Si femme &lt;50 ans (quelle que soit l'origine)</li></ul>
Antigène c(RH4)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Si femme &lt;50 ans (quelle que soit l'origine)</li></ul>
Antigène e(RH5)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Si le patient est <b>Afro antillais (H/F) &lt;50 ans</b></li><li>- chez tous les (H/F) sujets &lt; 50 ans de phénotype <b>D+ccee (RH-18)</b></li><li>- femme &lt;50 ans si doute sur origine</li></ul>

# Les principales indications du phénotype RHD ET RHCE déduit du génotype

## 3) Recherche systématique de variant chez les patients drépanocytaires

- Nombreux variants dans ces populations le plus souvent d'origine Africaine → **grande diversité allélique car populations les plus anciennes au niveau génétique**
- Absence d'affaiblissement/discordance de réactivité ne veut pas dire absence de variants
- Etude en 2020 *P. Tisserand* à l'EFS PACA-Corse de 351 patients drépanocytaires
  - 29% des individus présentent au moins un allèle variant
  - 5,1% des patients de phénotype D positif sont porteurs d'un antigène D partiel
  - 15,3% des patients de phénotype C positif sont porteurs d'un antigène C partiel
  - Adaptation de la consigne transfusionnelle chez 13,1% des patients

# Les principales indications du phénotype étendu déduit du génotype

## 1) Transfusion récente (<4mois) :

- Drépanocytaire
- Bilan pré-greffe de CSH
- Validation d'un anticorps à la RAI avec impact sur la consigne transfusionnelle
  - Exemples : Auto-Jka : Respect Phénotype RHK / Allo-Jka : Respect Phénotype RHK + Jka - + compatibilisé

## 2) Examen direct à l'antiglobuline positif :

- Interférence avec certains réactifs utilisés en sérologie : Choix des réactifs en fonction du profil de l'EDA (si EDA IgG+ pur : réactifs en technique saline)
- Problème de disponibilité de réactif (sérum test anti-Fya uniquement en TIA)
- EDA mixte : pas de choix possible

## 3) Pan-agglutination à la RAI :

- Auto-anticorps, anti-public, traitement monoclonal (anti-CD38, anti-CD47), anticorps anti-solution de conservation

## 4) Ambiguïté réactionnelle, discordance de résultats entre deux clones de réactifs utilisés ou absence de deux antigènes antithétiques

- Recherche de variants



**04**

**CAS CLINIQUES**

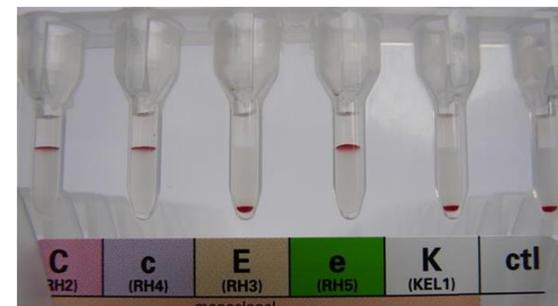
# Variants du D

## Cas clinique n°1 :

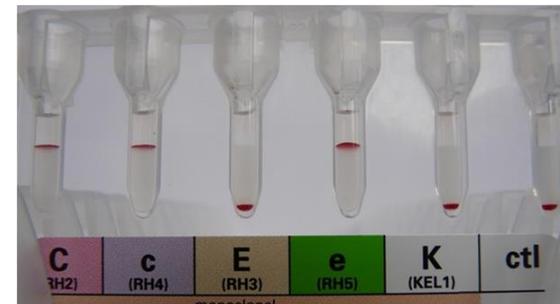
Femme de 25ans, enceinte de 12 SA, qui réalise son groupage ABOD-RHK dans le cadre de suivi de sa grossesse.

La patiente est d'origine caucasienne, sans antécédents transfusionnels et/ou obstétricaux, et non connue à l'EFS.

Que faites-vous de ce résultat ?



# Variants du D

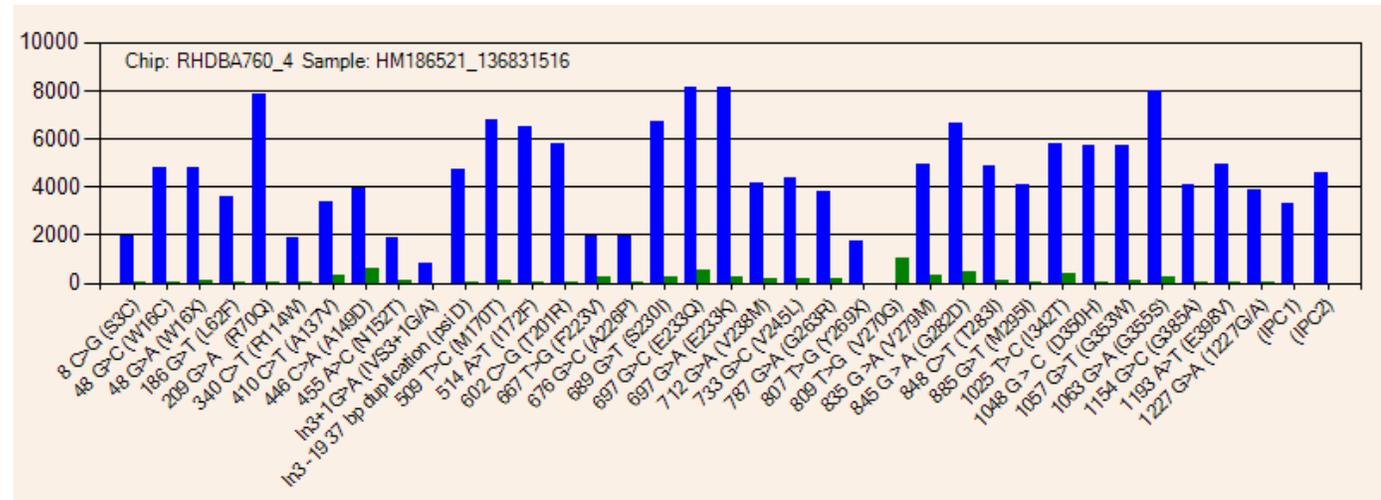


Indication de biologie moléculaire car réactivité de l'anti-D à 2+ en technique filtration, femme < 50 ans,  
 En attente du résultat, patiente **à considérer provisoirement D négative** en contexte transfusionnel et obstétrical

# Variants du D

Résultats de biologie moléculaire :

- Génotype RHD : **D faible de type 1**



- Antigène D faible à considérer positif en contexte obstétrical et transfusionnel
- Pas de risque d'allo-immunisation anti-D décrits dans la littérature
- Pas d'injection de Rhophylac en cas de grossesse

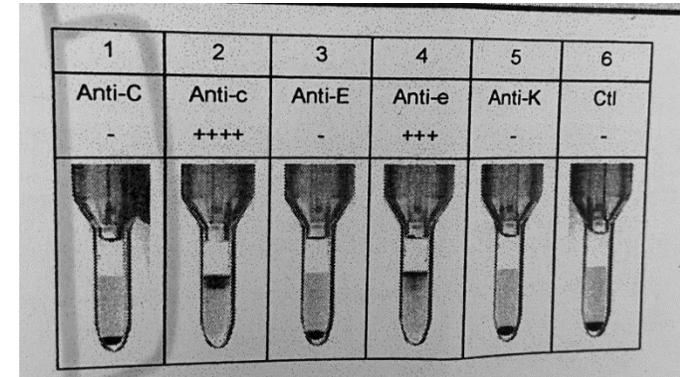
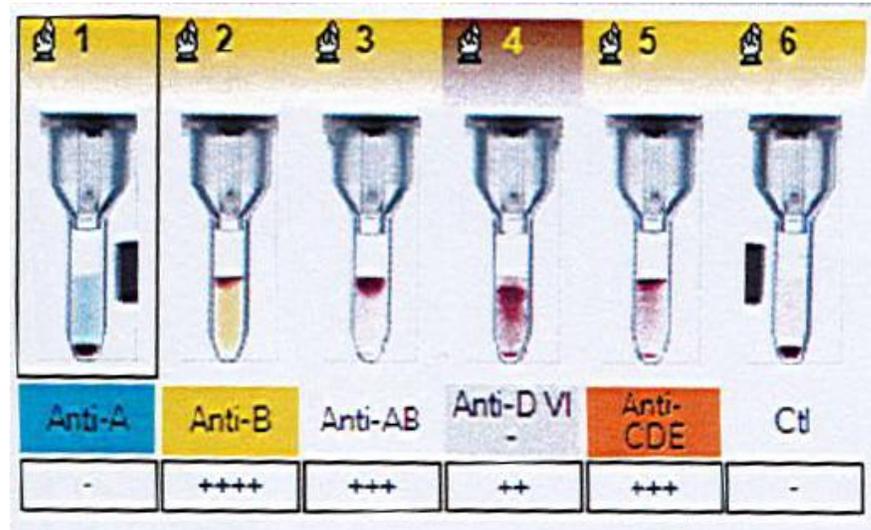
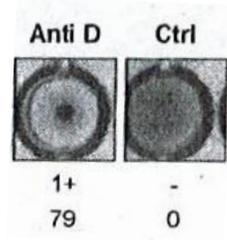
## Cas clinique n°2 :

Si même profil sérologique chez un patient de 80 ans groupage dans le cadre d'un bilan pré-opératoire, pas d'indication du respect du phénotype RHK en transfusion : Patient à considérer D positif sans réalisation de la biologie moléculaire.

# Variant du D et du CE

## Cas clinique n°3 :

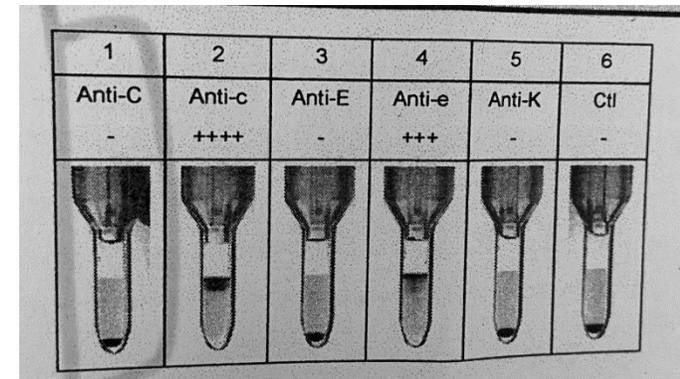
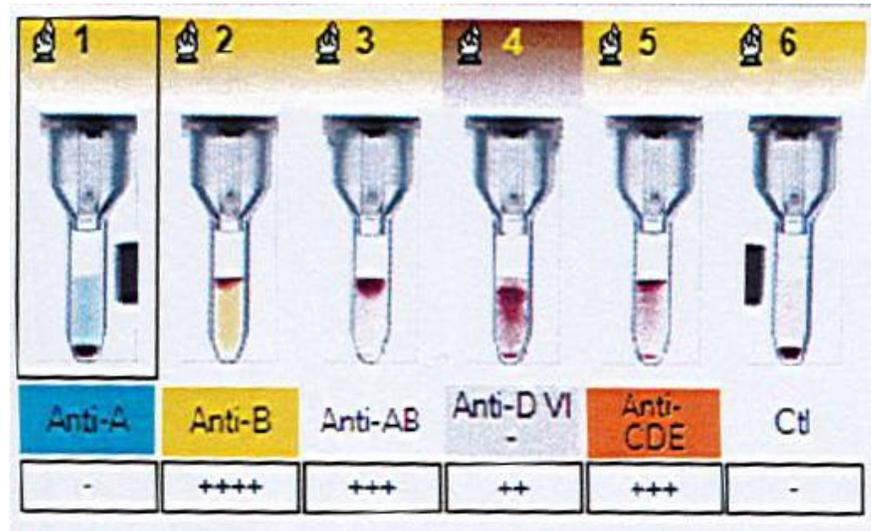
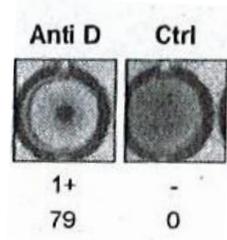
Patiente d'origine Malienne, 32 ans, 3<sup>ème</sup> mois de grossesse



# Variant du D et du CE

## Cas clinique n°3 :

Patiente d'origine Malienne, 32 ans, 3<sup>ème</sup> mois de grossesse



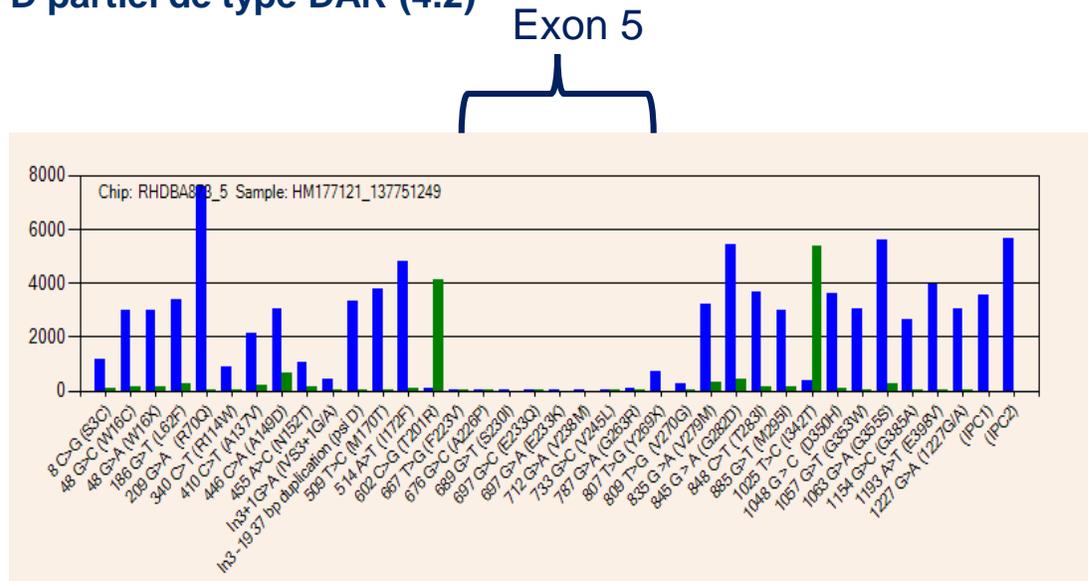
Indication de biologie moléculaire car réactivité 2+, femme <50 ans d'origine Afro-antillaise avec phénotype ccee associé.

En attente du résultat, patiente à **considérer provisoirement D négative** en contexte transfusionnel et obstétrical

# Variant du D et du CE

Résultats de biologie moléculaire :

- Génotypage RHD : **D partiel de type DAR (4.2)**



- Antigène D partiel à considérer négatif en contexte obstétrical et transfusionnel
- Risque d'allo-immunisation anti-D
- Injection de Rhophylac au cours de la grossesse

# Variant du D et du CE

Résultats de biologie moléculaire :

- Génotypage RHD : **D partiel de type DAR (4.2)**
  - **Le plus souvent associé à un allèle ceAR = formation de l'haplotype DAR/ceAR**
  - Si DAR à l'état homozygote = ceAR à l'état homozygote = phénotype rare sans affaiblissement sérologique du c et e !
  - Rajout du génotype RHCE systématique
1. Si haplotype à l'état homozygote :
    - Phénotype exceptionnel RH-18
    - Antigènes D, c et e partiels
    - Risque d'allo-immunisation **anti-RH18**
    - Anticipation des besoins transfusionnels** : convocation de donneurs de sangs rares ou décongélation de poches (BNSPR)
    - Enregistrement au CNRGS
  2. Si haplotype à l'état hétérozygote :
    - Absence de phénotype exceptionnel
    - Antigène D partiel
    - Pas de précaution particulière hormis une consigne transfusionnelle en CGR D négatif**

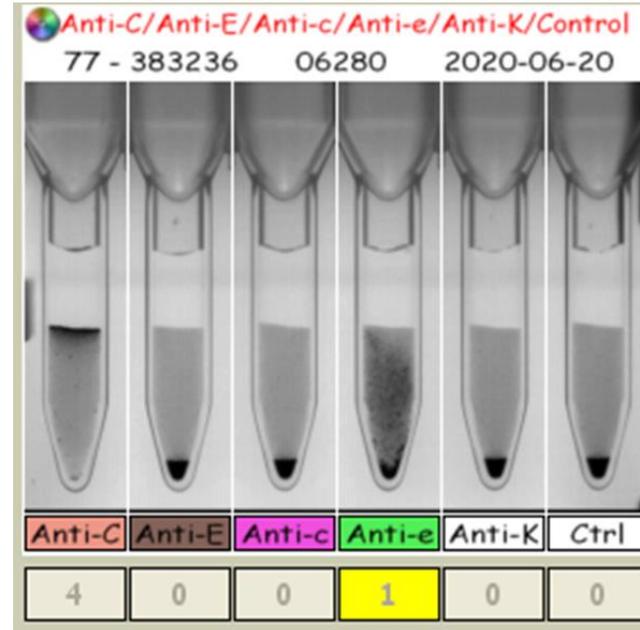
# Variants du RHCE

## Cas clinique n°4 :

Patient d'origine Malienne de 12 ans, hospitalisé pour une opération cardiaque. Un antécédent de transfusion à ses 8 ans lors d'une première opération cardiaque.

Résultats de la RAI : Pan-agglutination avec témoin autologue négatif. Profil d'anti-public (autres étiologies de pan-agglutination ont été éliminés)

Qu'en pensez-vous ?



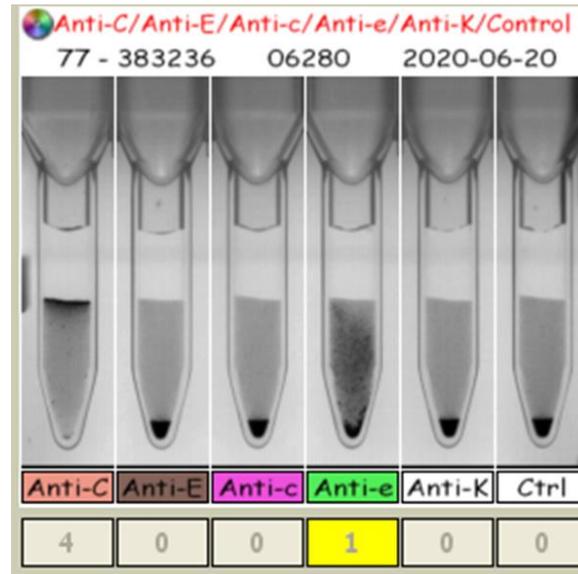
# Variants du RHCE

## Cas clinique n°4 :

Patient d'origine Malienne de 12 ans, hospitalisé pour une opération cardiaque. Un antécédent de transfusion à ses 8 ans lors d'une première opération cardiaque.

Résultats de la RAI : Pan-agglutination avec témoin autologue négatif. Profil d'anti-public (autres étiologies de pan-agglutination ont été éliminés)

Qu'en pensez-vous ?



Indication de biologie moléculaire : affaiblissement du RH5 chez un patient d'origine Afro-antillaise avec profil d'anti-public à la RAI : suspicion d'un phénotype rare allo-immunisé.

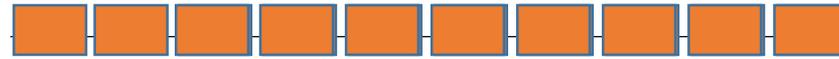
En attendant les résultats de biologie moléculaire, consigne transfusionnelle est de ne **pas transfuser** ! Risque d'incompatibilité avec l'ensemble des CGR disponibles.

# Variants du RHCE

Résultats de biologie moléculaire :

- Génotypage RHCE : Présence d'un **allèle RN** (DCe) à l'état homozygote
- Insertion de l'exon 4 du gène RHD au niveau du gène RHCE sur les deux haplotypes DCe

Gène RHD normal



Gène RHCE hybride: RHCE-D(4)-Ce



- C et e partiels (souvent affaiblissement uniquement du e en sérologie)
- Expression de l'antigène de faible fréquence RH32
- Perte de l'antigène public RH46 (**RH:-46**)
- Tant que la RAI est négative : pas de respect de l'antigène public
- Si **immunisation anti-RH46** : anticipation des besoins transfusionnels : convocation de donneurs rares ou décongélation de poche (BNSPR)
- Intérêt du dépistage enzymatique systématique chez ces patients : recherche d'un début d'immunisation
- Enregistrement au CNRGS

## Variants du système MNS

### Cas clinique n°5 :

Patiente de 55 ans, sans antécédent, originaire de l'île Maurice. Réalisation d'un phénotype étendu dans le cadre de la prise de Daratumumab (anti-CD38) pour traitement de son myélome multiple.

Mise en évidence d'une discordance de résultats pour le phénotype S/s en fonction des réactifs utilisés.

Anti-S grifols	Anti-s grifols
-	4+
Anti-S diagast	Anti-s diagast
-	-

## Variants du système MNS

### Cas clinique n°5 :

Patiente de 55 ans, sans antécédent, originaire de l'île Maurice. Réalisation d'un phénotype étendu dans le cadre de la prise de Daratumumab (anti-CD38) pour traitement de son myélome multiple.

Mise en évidence d'une discordance de résultats pour le phénotype S/s en fonction des réactifs utilisés.

Anti-S grifols	Anti-s grifols
-	4+
Anti-S diagast	Anti-s diagast
-	-

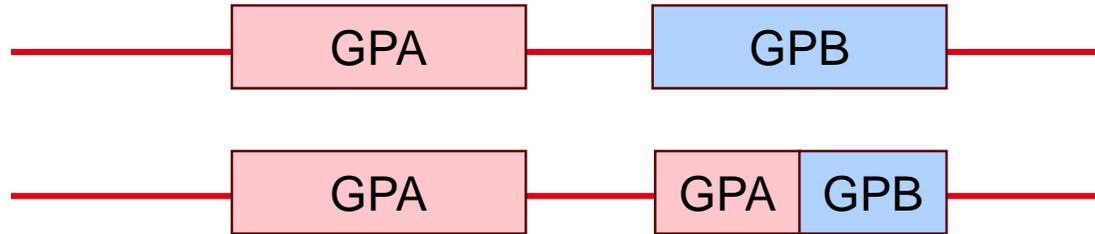
Tout affaiblissement du phénotype étendu doit être arrêté et doit être exploré en biologie moléculaire

# Variants du système MNS

Résultats de biologie moléculaire :

## Génotypage HEA : Phénotype Dantu

- Gène hybride de la GPA et GPB présent dans les populations de l'océan Indien



- Patient à considérer S- et s-
- Risque d'immunisation anti-public **anti-U** (anti-MNS5)
- Enregistrement au CNRGS



**05**

**CONCLUSION**

## **Biologie moléculaire** : outil indispensable au laboratoire pour palier les difficultés sérologiques

- Tout affaiblissement dans le système RH et phénotype étendu doit être arrêté par le technicien. Moindre doute sur une indication de biologie moléculaire : biologiste médical référent
- Prise en compte du statut du patient (âge, sexe et origine géographique)
  - Si envoi d'une demande de biologie moléculaire Importance de fournir un maximum de renseignements cliniques et sérologiques (origine ethnique, résultats phénotype, EDA et RAI).
  - Population Afro-Antillaise +++
- Certaines limites :
  - Dans le cas de certains variants (allèle silencieux ou le gène est présent mais ne s'exprime pas, mutation non recherchée en technique de première intention) : biologie moléculaire non concluante ou nécessité d'avoir recours à d'autres techniques (séquençage)
  - Analyses longues et coûteuses (97,3 euros par lame) ne figurant pas à la nomenclature en France donc non remboursée

A thick red line starts at the top center, curves left and down, then right and down, then left and down, and finally right and down, ending at the bottom right edge of the frame.

**MERCI**

[camille.joubert@efs.sante.fr](mailto:camille.joubert@efs.sante.fr)