



**HAL**  
open science

# Étude des variantes du système RH chez les patients drépanocytaires suivis en PACA – Corse

Pauline Tisserand

► **To cite this version:**

Pauline Tisserand. Étude des variantes du système RH chez les patients drépanocytaires suivis en PACA – Corse. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03035176

**HAL Id: dumas-03035176**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03035176v1>**

Submitted on 2 Dec 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## **THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR**

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenue le 30 Octobre 2020

Par M<sup>lle</sup> Pauline TISSERAND  
Née le 2 Septembre 1993  
À Saint-Dié-des-Vosges

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017  
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

### **ÉTUDE DES VARIANTS DU SYSTEME RH CHEZ LES PATIENTS DRÉPANOCYTAIRES SUIVIS EN PACA – CORSE**

----oOo----

**JURY :**

Président : Madame le Professeur Florence SABATIER

Membres : Monsieur le Professeur Jacques CHIARONI

Madame le Docteur Estelle JEAN

Madame le Docteur Laurine LAGET (Directrice de Thèse)



## **THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR**

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenue le 30 Octobre 2020

Par M<sup>lle</sup> Pauline TISSERAND  
Née le 2 Septembre 1993  
À Saint-Dié-des-Vosges

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017  
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

**THÈSE**

**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

----oOo----

### **ÉTUDE DES VARIANTS DU SYSTEME RH CHEZ LES PATIENTS DRÉPANOCYTAIRES SUIVIS EN PACA – CORSE**

----oOo----

**JURY :**

Président : Madame le Professeur Florence SABATIER

Membres : Monsieur le Professeur Jacques CHIARONI

Madame le Docteur Estelle JEAN

Madame le Docteur Laurine LAGET (Directrice de Thèse)

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05  
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

## **ADMINISTRATION :**

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

## **DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

### **PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI  
Mme Odile RIMET-GASPARINI  
Mme Pascale BARBIER  
M. François DEVRED  
Mme Manon CARRE  
M. Gilles BREUZARD  
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA  
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES  
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON  
Mme Carole SIANI

## ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

**DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE**  
Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

## PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE  
Mme Laurence CAMOIN-JAU  
Mme Florence SABATIER-MALATERRE  
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN  
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET  
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

## ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Anne-Claire DUCHEZ
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Alexandra WALTON

## A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Mélanie VELIER
----------------------------	--------------------

## DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

## PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE	Mme Evelyne OLLIVIER

**MAITRES DE CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

**A.H.U.**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

**ATER**

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC
--	---------------

**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

**PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

**MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

**A.H.U.**

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

**ATER.**

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

## **REMERCIEMENTS**

***Madame la Présidente du Jury, le Professeur Florence SABATIER,***

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assurée de mon profond respect et de ma haute considération.

***Monsieur le Professeur Jacques CHIARONI,***

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire d'immuno-hématologie où j'ai pu apprendre et approfondir mes connaissances en transfusion sanguine grâce à vos précieux enseignements, que vous savez partager généreusement. Je suis reconnaissante de la confiance que vous m'avez témoignée en me proposant ce sujet de thèse. A travers ce travail, recevez l'expression de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

***Madame le Docteur Estelle JEAN,***

Je vous remercie d'avoir accepté d'être membre de ce jury et de l'intérêt que vous avez manifesté pour examiner ce travail. Je vous présente ma profonde et respectueuse reconnaissance.

***Madame le Docteur Laurine LAGET,***

Je te remercie de ta présence dans ce jury en tant que directrice de thèse. Tes compétences, tes conseils avisés, ta gentillesse, ton soutien et ta grande disponibilité m'ont permis de mener à bien ce travail de thèse. Ma reconnaissance et mon respect envers toi sont immenses. Sincères remerciements.

***L'Établissement Français du Sang Alpes-Méditerranée,***

Je remercie toute l'équipe de l'EFS pour votre accueil dans le service et votre gentillesse à mon égard, notamment Caroline IZARD, Elisabeth DURIEUX-ROUSSEL, et tout particulièrement Lugdivine de BOISGROLLIER pour ton aide précieuse et tes connaissances en biologie moléculaire, ainsi que ta patience lors de mes différentes manipulations.

*« L'UNIVERSITÉ N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION  
AUX OPINIONS ÉMISES DANS LES THÈSES. CES OPINIONS DOIVENT ÊTRE  
CONSIDÉRÉES COMME PROPRES À LEURS AUTEURS. »*



# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>I. GENERALITES</b> .....	<b>3</b>
1. LA DREPANOCYTOSE .....	3
a. <i>Physiopathologie de la drépanocytose</i> .....	3
b. <i>Diagnostic</i> .....	4
c. <i>Prise en charge des syndromes drépanocytaires majeurs</i> .....	6
d. <i>La transfusion chez le drépanocytaire</i> .....	7
2. LE SYSTEME RH .....	11
a. <i>Polymorphismes RHD</i> .....	16
b. <i>Phylogénie RHD</i> .....	18
c. <i>Polymorphismes RHCE</i> .....	20
d. <i>Variants RHD</i> .....	21
e. <i>Allo-immunisation</i> .....	22
<b>II. OBJECTIFS</b> .....	<b>23</b>
<b>III. MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>24</b>
1. ANALYSE DES D SAUVAGES IDENTIFIES PAR BIOARRAY .....	24
a. <i>Extraction d'ADN</i> .....	24
b. <i>Génotypage BioArray</i> .....	25
c. <i>Amplification et séquençage du gène RHD</i> .....	28
d. <i>Fréquence allélique</i> .....	29
2. ANALYSE RETROSPECTIVE DES PHENOTYPES RHD / RHCE DES DREPANOCYTAIRES EN PACA – CORSE .....	30
<b>IV. RESULTATS</b> .....	<b>31</b>
1. SEQUENÇAGE DU GENE <i>RHD</i> DES GENOTYPES « <i>RHD SAUVAGES</i> » RENDUS PAR BIOARRAY .....	31
2. ANALYSE RETROSPECTIVE DES GENOTYPES <i>RHD / RHCE</i> DES PATIENTS DREPANOCYTAIRES ISSUS DE LA REGION PACA – CORSE .....	32
a. <i>Génotype RHD</i> .....	33
b. <i>Génotype RHCE</i> .....	36
c. <i>Allo-immunisation</i> .....	40
d. <i>Transfusion</i> .....	45

<b>V. DISCUSSION .....</b>	<b>47</b>
1. SEQUENÇAGE DU GENE <i>RHD</i> DES GENOTYPES « <i>RHD</i> SAUVAGES » RENDUS PAR BIOARRAY .....	47
2. ANALYSE RETROSPECTIVE DES GENOTYPES <i>RHD</i> / <i>RHCE</i> DES PATIENTS DREPANOCYTAIRES ISSUS DE LA REGION PACA – CORSE .....	50
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	
<b>ANNEXES</b>	

## Index des figures

FIGURE 1 : LOCUS RH (32).....	12
FIGURE 2 : POLYPEPTIDES RH (33) .....	13
FIGURE 3 : PRINCIPALES PROTEINES DE LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE (36).....	14
FIGURE 4 : PHYLOGENIE DES HAPLOTYPES RH .....	15
FIGURE 5 : BASES MOLECULAIRES DES PHENOTYPES D NEGATIFS (32).....	17
FIGURE 6 : MODELE EN DEUX DIMENSIONS DE LA PROTEINE RHD MONTRANT LA LOCALISATION DES POLYMORPHISMES CARACTERISTIQUES DES CLUSTERS DIVA (ROUGE), D FAIBLE TYPE 4 (VERT) ET DAU (BLEU) .....	18
FIGURE 7 : PHYLOGENIE DES ALLELES RHD IDENTIFIANT UN CLUSTER RHD EURASIEN ET TROIS CLUSTERS AFRICAINS, A SAVOIR LE DIVA, LE DAU ET LE RHD FAIBLE TYPE 4 (33) .....	19
FIGURE 8 : REPRESENTATION DES ALLELES RHCE (32) .....	20
FIGURE 9 : PROCESSUS D'ANALYSE AVEC LES PUCES BIOARRAY RH EMAP® .....	25
FIGURE 10 : LECTURE DES PUCES BIOARRAY PAR SUPERPOSITION DES IMAGES DE CODAGES DES BILLES COLOREES (A GAUCHE) AVEC LES IMAGES DE FLUORESCENCE OBTENUES (A DROITE) .....	26
FIGURE 11 : RESULTAT BIOARRAY REPRESENTANT UN ALLELE RHD SAUVAGE .....	27
FIGURE 12 : REPARTITION DES GENOTYPES RHD DES DREPANOCYTAIRES .....	36
FIGURE 13 : REPARTITION DES DIFFERENTS ALLELES RHCE .....	37
FIGURE 14 : PHENOTYPES RHCE DEDUITS DU GENOTYPE .....	39
FIGURE 15 : PROPORTIONS D'ANTIGENES RH PARTIELS ET CONVENTIONNELS .....	40
FIGURE 16 : ANTICORPS ANTI-RH .....	42

## Index des tableaux

TABLEAU 1 : HAPLOTYPES DU SYSTEME RH ET PHENOTYPES ERYTHROCYTAIRES CORRESPONDANTS .....	15
TABLEAU 2 : ALLELES RHD IDENTIFIES PAR SEQUENÇAGE .....	32
TABLEAU 3 : PHENOTYPE RH DES 351 INDIVIDUS DREPANOCYTAIRES.....	32
TABLEAU 4 : ALLELES RHD IDENTIFIES EN TECHNIQUE BIOARRAY ET/OU SEQUENÇAGE ET FREQUENCES ALLELIQUES ASSOCIEES.....	34
TABLEAU 5 : REPARTITION DES DIFFERENTS GENOTYPES RHD DANS LA POPULATION DREPANOCYTAIRE .....	35
TABLEAU 6 : ALLELES RHCE IDENTIFIES EN TECHNIQUE BIOARRAY ET/OU SEQUENÇAGE ET FREQUENCES ALLELIQUES ASSOCIEES .....	37
TABLEAU 7 : REPARTITION DES DIFFERENTS GENOTYPES RHCE DANS LA POPULATION DREPANOCYTAIRE.....	38
TABLEAU 8 : ALLO-ANTICORPS IDENTIFIES ET LEUR FREQUENCE ASSOCIEE .....	41
TABLEAU 9 : ANTICORPS ANTI-RH ASSOCIES AUX GENOTYPES RHD ET RHCE .....	43
TABLEAU 10 : ASSOCIATION DES ALLELES RHD ET RHCE VARIANTS ET DE LEURS ALLO-ANTICORPS.....	44
TABLEAU 11 : ALLO-ANTICORPS IDENTIFIES ET NOMBRE DE CGR DE PHENOTYPE EUROPEEN TRANSFUSES ENTRE 2011 ET 2020.....	45
TABLEAU 12 : PREVALENCE DES ANTIGENES RH PARTIELS CHEZ LES PATIENTS DREPANOCYTAIRES EN FRANCE .....	50

## Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNg :	ADN génomique
AVC :	Accident vasculaire cérébral
BSA :	Albumine Sérique Bovine
CGR :	Concentrés de globules rouges
CNRGS :	Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins
CVO :	Crises vaso-occlusives
DHTR :	<i>Delayed Hemolytic Transfusion Reaction</i>
dNTP :	Désoxynucléotide triphosphate
Dwt :	<i>D wild-type</i> = D sauvage
EDCL :	Epreuve de compatibilité au laboratoire
GP :	Gycophorine
GR :	Globule rouge
Hb :	Hémoglobine
HbA :	Hémoglobine adulte
HbF :	Hémoglobine foétale
HbS :	Hémoglobine S
HPLC :	Chromatographie liquide haute performance
IHR :	Immuno-Hématologie Receveur
ISBT :	<i>International Society of Blood Transfusion</i>
MHNN :	Maladie hémolytique du nouveau-né
NGS :	<i>Next Generation Sequencing</i>
SDM :	Syndromes Drépanocytaires Majeurs
SNP :	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STA :	Syndrome thoracique aigu
Pb :	Paires de bases
RAI :	Recherche d'agglutinines irrégulières
RhAG :	<i>Rhesus associated glycoprotein</i>

## Introduction

La drépanocytose est la maladie génétique la plus fréquente en France (1). Elle est due à une mutation de l'hémoglobine conduisant à la production d'hémoglobine S qui déforme les globules rouges en faucilles, ce qui donne son nom à la maladie « *Sickle cell disease* ». La plupart des patients drépanocytaires nécessitent des transfusions régulières de Concentrés de Globules Rouges (CGR) pour limiter les complications de la maladie et prolonger la durée de vie des patients (2).

L'allo-immunisation est la production d'un anticorps dont l'antigène cible est un antigène absent chez l'individu, c'est l'une des principales complications de la transfusion. Cela peut conduire à un mauvais rendement transfusionnel, à une diminution du nombre de donneurs compatibles, voire à des réactions potentiellement mortelles, telles que la réaction hémolytique post-transfusionnelle retardée (*Delayed Hemolytic Transfusion Reaction, DHTR*) décrite chez le drépanocytaire (3). Les drépanocytaires sont globalement plus à risque d'allo-immunisation que la population générale de par le contexte inflammatoire chronique dû à la maladie (4) et du nombre généralement important d'épisodes transfusionnels réalisés au cours de leur vie. L'allo-immunisation avec de nombreuses spécificités différentes peut à terme mener à des impasses transfusionnelles.

Afin de limiter l'allo-immunisation des drépanocytaires en France, les CGR sélectionnés respectent le phénotype RH-Kell des patients, de plus, une épreuve de compatibilité au laboratoire (EDCL) est systématiquement réalisée avant chaque transfusion. Le respect du phénotype de chaque individu peut paraître compliqué du fait du polymorphisme antigénique marqué entre les donneurs de sang, principalement d'origine Caucasienne, et les patients atteints de drépanocytose, principalement d'origine Africaine ou Afro-Antillaise.

La détermination du phénotype érythrocytaire est historiquement réalisée par réaction d'agglutination, qui est la technique de base en immuno-hématologie. Cette technique rapide, fiable et peu onéreuse peut s'avérer inadaptée en contexte de transfusion récente et ne permet pas dans la majorité des cas de détecter et/ou de distinguer des variants faibles ou partiels. La recherche de ces variants est pourtant indispensable dans le cas des transfusions itératives du drépanocytaire (5).

Aujourd'hui, le génotypage érythrocytaire permet d'identifier le(s) SNP(s) (*Single nucleotide polymorphism*) au niveau de l'ADN afin de prédire l'acide aminé présent dans la protéine, et donc de déduire l'antigène exprimé. On parle alors de « phénotype déduit du génotype ».

Les recommandations nationales de l'EFS préconisent depuis 2014 un génotypage *RHD* et *RHCE* systématique chez tous les patients drépanocytaires ayant reçu moins de 12 épisodes transfusionnels, et/ou allo-immunisés, quelque soit le phénotype RH, y compris en l'absence d'affaiblissement antigénique.

Le système de groupe sanguin RH est le quatrième système identifié parmi les 39 recensés lors de la dernière mise à jour de la classification par l'ISBT en août 2019 (*International Society of Blood Transfusion*) (6). Les antigènes du système RH sont de nature protéique, et sont les produits primaires des gènes *RHD* et *RHCE*. Ces antigènes font partie des plus immunogènes, notamment l'antigène RH1 (D) qui possède de loin l'immunogénicité la plus importante (7). Les gènes *RHD* et *RHCE* sont très polymorphes, leur orientation face à face et leur forte similarité favorisent les réarrangements nucléotidiques pouvant produire des gènes hybrides ou des réarrangements nucléotidiques (SNP). Les populations d'origine Africaine présentent une grande variabilité génétique et les phénotypes partiels sont très fréquents, ce qui complique généralement la transfusion (8). La recherche de variants présente donc un grand intérêt chez les patients drépanocytaires, principalement originaires de ces populations Africaines.

Le premier objectif de cette étude est de déterminer la pertinence de l'utilisation de la méthode BioArray RHD Beadchip dans la recherche systématique de variants chez le patient drépanocytaire.

La deuxième partie de ce travail est une étude des différents variants du système RH retrouvés dans une population de 351 drépanocytaires issus de la région PACA – Corse entre 2011 et 2019. Nous comparerons la fréquence des polymorphismes identifiés avec des drépanocytaires issus d'autres régions, et nous évaluerons l'intérêt du génotypage systématique chez ces individus.

# I. Généralités

## 1. La drépanocytose

### a. Physiopathologie de la drépanocytose

La drépanocytose est une maladie génétique héréditaire à transmission autosomique récessive, touchant particulièrement l'Afrique Subsaharienne, l'Afrique du Nord, le bassin méditerranéen (Maghreb, Sicile, Grèce) et les Antilles. Il s'agit d'une mutation nucléotidique ponctuelle dans le gène de la  $\beta$ -globine situé sur le chromosome 11, une Thymine remplace une Adénine en 17<sup>ème</sup> position entraînant la substitution de l'Acide Glutamique par une Valine au niveau du 6<sup>ème</sup> acide aminé (2). Ceci conduit à la formation d'hémoglobine S anormale (*Sickle cell disease*). C'est la maladie génétique la plus courante en France. En effet, 431 cas de drépanocytose ont été diagnostiqués à la naissance en 2016, grâce à un dépistage néonatal ciblé des enfants dont les parents sont originaires des régions à forte prévalence, mis en place depuis 2000. Au niveau mondial, on estime environ 300 000 nouveau-nés drépanocytaires par an (1).

Cette anomalie génétique entraîne un changement conformationnel de l'hémoglobine et une tendance à la polymérisation intracellulaire, favorisée par l'hypoxie, la déshydratation, l'acidose ou l'hyperthermie. La polymérisation de l'HbS est réversible lors de la réoxygénation. Les polymères s'associent en fibres de désoxy-HbS, les hématies se déforment en faucilles et deviennent des drépanocytes, ce phénomène est irréversible et s'appelle falciformation. Ceci entraîne une diminution de la durée de vie des globules rouges déformés, une hémolyse chronique et une anémie. D'autres phénomènes entrent en compte, notamment la déshydratation, la rigidification cellulaire, l'augmentation d'adhérence à l'endothélium vasculaire et l'obstruction des petits vaisseaux par ces hématies peu déformables, conduisant aux crises vaso-occlusives (CVO) du drépanocytaire situées en général dans la microcirculation post-capillaire et pouvant survenir dans tous les organes vascularisés (9).

En plus de la douleur chronique, de nombreuses complications aiguës et chroniques existent, causées par une ischémie et une inflammation chroniques, telles qu'un syndrome thoracique aigu (STA), accident vasculaire cérébral, aggravation de l'anémie, priapisme, infections bactériennes, atteintes d'organes (néphropathies, rétinopathies, cardiopathie, atteintes ostéo-articulaires). Il n'existe pas d'expression clinique avant l'âge de 6 mois, car l'hémoglobine fœtale (HbF) joue un rôle protecteur et inhibe la polymérisation de l'HbS (10).

Quand les deux allèles du gène codant pour la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine sont atteints, on parle de syndrome drépanocytaire majeur. L'expression clinique et biologique varie selon le type de mutation. Les mutations les plus fréquentes aboutissent à l'hémoglobine S (Acide Glutamique remplacé par une Valine en position 6) et l'hémoglobine C (Acide Glutamique remplacé par une Lysine), forme modérée plutôt retrouvée en Afrique de l'Ouest.

La forme homozygote S/S est la plus fréquente et la plus sévère. Il existe aussi des formes hétérozygotes composites : S/C, ou les formes associant une hémoglobine S à un gène  $\beta$  thalassémique. On distingue les formes S/ $\beta^+$  thalassémie où le déficit en chaîne  $\beta$  est partiel, et S/ $\beta^0$  thalassémie où le déficit en chaîne  $\beta$  est complet. On associe généralement les formes S/S et S/ $\beta^0$  et les formes S/C et S/ $\beta^+$  pour leurs similarités cliniques et biologiques. Il existe d'autres formes de drépanocytoses hétérozygotes composites, plus rares : SD<sub>Punjab</sub>, SO<sub>Arab</sub>, S<sub>Antilles</sub>C, ...

Les sujets hétérozygotes HbA/HbS, porteurs d'un trait drépanocytaire sont porteurs sains, asymptomatiques et ne présentent pas les complications de la maladie.

## **b. Diagnostic**

Le diagnostic repose sur plusieurs méthodes de séparation et de quantification des différentes fractions de l'hémoglobine, à réaliser à distance d'au moins 3 mois d'une transfusion selon les recommandations de la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) (11). Les techniques utilisées sont soit séparatives permettant de différencier les hémoglobines en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (électrophorèse, chromatographie,...), soit non séparatives mais mettant en évidence des propriétés spécifiques (test d'Itano, recherche de corps de Heinz, ...).

La pratique d'une seule technique n'est pas recommandée car un profil normal, quel que soit le système utilisé ne permet pas d'éliminer un variant de l'Hb, et plusieurs variants peuvent se comporter de la même façon dans un système. Il est nécessaire de disposer d'un hémogramme et d'un bilan martial pour interpréter les résultats de l'étude de l'Hb.

La méthode de référence pour le dépistage de la drépanocytose est l'isoélectrofocalisation, qui consiste à séparer les fractions de l'Hb selon leur point isoélectrique. Technique sensible et nécessitant une faible quantité d'hématies, c'est la technique de choix chez le nouveau-né lors du dépistage néonatal (12).

Une autre technique existe pour le dépistage : l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin (pH = 8.6), elle permet la séparation des fractions de l'Hb selon leurs charges (migration vers l'anode). Elle est inadaptée chez le nouveau-né car l'HbF est majoritaire et se sépare mal des fractions HbA et HbS.

Tout dépistage positif doit être confirmé par une technique d'électrophorèse sur citrate d'agar à pH acide (pH = 6.0), qui permet de séparer les fractions de l'Hb selon leur affinité pour l'agaropectine (complexe migrant vers l'anode) et le courant d'électroendosmose (diffusion vers la cathode).

La quantification des différentes fractions de l'Hb est indispensable pour affiner le diagnostic, elle est réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur résine échangeuse de cations, ou par électrophorèse capillaire automatisée. Ces méthodes présentent une excellente précision pour le dosage des fractions HbA2 et HbF.

Enfin, le test de solubilité de l'HbS (test d'Itano) met en évidence la précipitation *in vitro* de l'HbS désoxygénée par l'hydrosulfite de sodium en milieu salin concentré. C'est un test de confirmation, très spécifique de l'HbS car c'est la seule hémoglobine qui précipite. Cette technique a été décrite pour la première fois en 1953 (13). Manuelle, facile à mettre en œuvre et rapide, elle est encore utilisée de nos jours.

La biologie moléculaire étudie les gènes de la globine et permet de détecter directement les mutations recherchées. Elle est utilisée pour confirmation génotypique en cas d'ambiguïté diagnostique avec les techniques précédemment citées et aussi pour dépister les porteurs sains et identifier des couples à risque de donner naissance à un enfant malade, afin de leur proposer un conseil génétique et éventuellement un diagnostic prénatal. Celui-ci est réalisable à partir de l'ADN fœtal isolé des cellules amniotiques, de biopsie de placenta ou de villosités chorales (14).

### **c. Prise en charge des syndromes drépanocytaires majeurs**

Les objectifs de la prise en charge des syndromes drépanocytaires majeurs sont la gestion rapide des crises vaso-occlusives et de la douleur, la prévention, détection et traitement des complications aiguës et chroniques, et l'amélioration de la longévité et de la qualité de vie des patients. Des mesures préventives peuvent être appliquées à vie afin de maintenir le niveau de qualité de vie des patients : supplémentation en acide folique, maintien d'une hydratation abondante, prévention des infections (antibioprophylaxie au long cours, vaccinations), éviction des facteurs favorisant les crises vaso-occlusives (hypoxie, refroidissement, hyperthermie, déshydratation, stress, tabac, drogues, etc.).

Deux grands traitements de fond sont actuellement disponibles pour les patients drépanocytaires présentant des complications fréquentes et graves : l'hydroxycarbamide et la transfusion sanguine. L'hydroxycarbamide (hydroxyurée, SIKLOS®) est un inducteur de la synthèse d'HbF, qui inhibe la polymérisation intracellulaire d'HbS et donc diminue les crises vaso-occlusives. La transfusion sanguine est une autre alternative, permettant de prendre en charge les complications de la drépanocytose. Il faut distinguer les transfusions simples (ponctuelles ou chroniques), et les protocoles d'échanges érythrocytaires (15).

La greffe de cellules souches hématopoïétiques est actuellement le seul traitement curatif de la drépanocytose. Elle est réservée aux formes graves chez l'adulte (existence d'une vasculopathie cérébrale, échec d'un traitement par hydroxycarbamide, récurrences de STA ou CVO), et elle est proposée dans la petite enfance si un donneur HLA-identique est présent dans la fratrie (16).

## **d. La transfusion chez le drépanocytaire**

### *i. Indications*

Le principal pilier du traitement de fond de la drépanocytose est la transfusion sanguine, avec plus de 90% des adultes drépanocytaires ayant déjà reçu une transfusion de concentrés de globules rouges (CGR) dans leur vie. Les principales indications de la transfusion sont la correction de l'anémie aiguë et le remplacement des hématies falciformes par des hématies normales, afin de diminuer le taux d'HbS en apportant des GR contenant de l'HbA. Dans la plupart des cas, l'objectif est de maintenir un taux d'HbS < 30% (17). Ces buts peuvent être atteints par une transfusion simple ou par un échange transfusionnel.

Chez les patients drépanocytaires, la traçabilité et l'efficacité transfusionnelles peuvent être appréciées par le suivi du pourcentage de l'HbA mesuré par HPLC. En effet, les patients drépanocytaires ne produisant pas d'HbA, le pourcentage de celle-ci constitue le reflet des culots transfusés.

La transfusion simple a pour but d'augmenter la capacité de transport de l'oxygène, afin de traiter une anémie mal tolérée, notamment le syndrome thoracique aigu avec anémie, une érythroblastopénie, ou une hyperhémolyse. Elle est également utilisée pour prévenir les complications lors d'une grossesse ou d'une chirurgie. Il faut néanmoins faire preuve de prudence car l'augmentation de l'hémoglobine peut majorer l'hyperviscosité sanguine.

Le protocole d'échange érythrocytaire est recommandé pour le traitement des vasculopathies cérébrales (AVC), les crises vaso-occlusives résistantes à la morphine, les défaillances d'organes chroniques, mais aussi pour réduire la survenue de complications. Les échanges érythrocytaires diminuent plus efficacement le pourcentage d'HbS que les transfusions simples, ils permettent la transfusion de volumes élevés de GR contenant de l'HbA, ont un meilleur contrôle du volume sanguin et de la viscosité pendant la transfusion, et limitent le risque de développer une hémochromatose liée à la transfusion. Cependant, ils ont un coût plus élevé que les transfusions simples, nécessitent un équipement spécialisé et souvent un accès veineux permanent (18).

La Haute Autorité de Santé (HAS) recommande de réaliser le phénotype ABO-D RHK et le phénotype étendu chez tous les drépanocytaires, idéalement avant leur première transfusion (10). Le phénotype étendu comprend les antigènes : Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, M, N, S, s. La connaissance du phénotype étendu du drépanocytaire permet de faciliter l'identification d'un éventuel anticorps, et ainsi de pouvoir trouver des CGR compatibles en fonction de l'antigène négatif souhaité (19).

Les recommandations nationales de l'EFS préconisent un génotypage *RHD* et *RHCE* systématique chez tous les patients drépanocytaires ayant reçu moins de 12 épisodes transfusionnels, et/ou allo-immunisés, quel que soit le phénotype RH, y compris en l'absence d'affaiblissement antigénique. Le génotypage systématique est réalisé à l'aide des kits BioArray RHD Beadchip et BioArray RHCE Beadchip (Immucor<sup>®</sup>). On recherche également l'allèle *RHCE\*CeRN* par PCR en temps réel chez tout patient drépanocytaire de phénotype C positif, ainsi que l'allèle *RHCE\*ceAG (ce254)* par PCR allèle spécifique aboutissant à un antigène RH5 (e) partiel, chez tout patient drépanocytaire de génotype *RHCE\*ce* homozygote.

Le dossier transfusionnel du patient drépanocytaire doit être unique, transférable d'un site à un autre et maintenu à jour. Il doit comporter les antécédents transfusionnels et indiquer les antécédents d'allo-immunisation ou d'hémolyse post-transfusionnelle retardée.

La consigne transfusionnelle des patients drépanocytaires impose d'utiliser des CGR phénotypés ABO RH-Kell (D, C, c, E, e, K) et de réaliser une épreuve de compatibilité au laboratoire (EDCL) avant la transfusion. Le respect des antigènes du phénotype étendu peut limiter une allo-immunisation supplémentaire ; celui-ci sera respecté en fonction du statut d'allo-immunisation du drépanocytaire et de son risque à développer une DHTR (nombre d'épisodes transfusionnels, antécédents, ...) (10).

## ***ii. Complications de la transfusion***

Les transfusions sanguines répétées peuvent produire des effets indésirables chez les receveurs, tels qu'une allo-immunisation, une réaction hémolytique immédiate ou retardée rendant la transfusion inefficace, une anaphylaxie, une lésion pulmonaire aiguë ou encore une infection, une hyperviscosité par augmentation du taux d'hémoglobine, une hémochromatose,... Ces effets indésirables sont les mêmes pour tous les patients transfusés, drépanocytaires ou non (17).

Dans l'hémolyse post-transfusionnelle immédiate, on observe plutôt une hémolyse intravasculaire avec activation du complément et lyse des hématies. Elle est associée de manière presque constante à une hyperthermie, et peut être associée à des frissons, des douleurs lombaires, des signes digestifs ou respiratoires. Elle peut se compliquer d'insuffisance rénale, de coagulation intra-vasculaire disséminée voire du décès de l'individu.

L'hémolyse retardée, se situe plutôt au niveau extracellulaire, les hématies sont recouvertes par des anticorps ou des fragments du complément et sont reconnues par les macrophages du système réticulo-endothélial puis détruites, ce qui conduit à une accumulation de produits de dégradation de l'hémoglobine.

Dans les deux cas, une hémolyse biologique est observée : hyperbilirubinémie, augmentation des LDH (Lactate Déshydrogénase, marqueur de dommage tissulaire) et chute de l'haptoglobine (protéine qui fixe l'hémoglobine).

Chez le patient drépanocytaire, les réactions hémolytiques post-transfusionnelles retardées jusqu'à 21 jours sont rares mais redoutables et peuvent menacer son pronostic vital. Elles sont appelées *Delayed Hemolytic Transfusion Reaction* (DHTR). Le diagnostic est posé devant l'apparition de signes vaso-occlusifs après une transfusion de CGR, sans autre cause d'hémolyse intravasculaire, associés à une diminution rapide de l'hémoglobine A qui a été transfusée, une hémoglobinurie, et à l'apparition d'un nouvel anticorps ou d'un test direct à l'antiglobuline positif, signifiant que des anticorps sont fixés à la surface des GR (20). Il existe peu d'options thérapeutiques à l'heure actuelle et le tableau peut évoluer vers la défaillance d'un ou plusieurs organes, voire le décès (3,21). Chez un patient ayant reçu une transfusion et présentant une DHTR, une nouvelle transfusion ne doit être envisagée qu'en cas d'urgence vitale en raison de l'aggravation de la situation qu'elle va induire (19). Les mécanismes de la DHTR dans la drépanocytose restent mal compris à ce jour, la prévention de l'allo-immunisation des patients drépanocytaires reste l'une des principales précautions pour limiter la survenue de DHTR.

Une complication fréquente de la transfusion est l'allo-immunisation qui s'explique par le développement d'allo-anticorps contre des antigènes de donneurs que le receveur ne possède pas, qui lui sont apportés par une transfusion de concentrés de globules rouges (CGR), ou par une grossesse. L'allo-immunisation complique la prise en charge du drépanocytaire, notamment par le retard de transfusion dû au temps nécessaire pour identifier l'allo-anticorps, et à la complexité de trouver des CGR compatibles, dépourvus de l'antigène correspondant.

L'incidence de l'allo-immunisation chez les patients atteints de drépanocytose est plus élevée que dans la population générale de patients transfusés, pour des raisons qui restent mal comprises, mais différents facteurs jouent un rôle :

- Charges transfusionnelles relativement importantes et répétées
- Etat inflammatoire chronique de la drépanocytose (4,22)
- Nombreuses différences de polymorphismes antigéniques selon les origines géographiques, et présence d'antigènes variants ou de combinaisons antigéniques rares. Les drépanocytaires, d'ascendance principalement Africaine s'immunisent contre des antigènes issus des populations Caucasiennes, qui représentent la majorité des donneurs dans les pays occidentaux.
- Des facteurs génétiques comme le polymorphisme HLA classe II, prédisposant au statut répondeur, c'est-à-dire la capacité à développer des anticorps suite à la rencontre d'antigènes érythrocytaires (4,23).

Le développement d'allo-anticorps semble entraîner également la production d'auto-anticorps (24). Ces auto-anticorps réagissent avec la totalité des hématies du panel d'identification et rendent la recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) complexe de par cette pan-agglutination. Il en va de même pour les patients poly-immunisés qui possèdent plusieurs allo-anticorps. En effet, la pan-agglutination nécessite d'effectuer des analyses immuno-hématologiques supplémentaires, augmentant le délai et la difficulté pour trouver des CGR compatibles.

## 2. Le système RH

En 1939, Levine étudie le cas d'une jeune femme qui présente une réaction transfusionnelle sévère après la transfusion de sang de son mari pour hémorragie de la délivrance (25). Le nouveau-né souffrait quant à lui d'anémie hémolytique. Le sérum de cette patiente agglutinait environ 85% des GR de sujets compatibles en ABO.

En 1940, les Docteurs Karl Landsteiner et Alexander Wiener injectent du sang de singe *Macacus Rhesus* à des lapins et obtiennent un anticorps dirigé contre les globules rouges de singe qu'ils appellent anti-Rhésus (26). Ils découvrent ensuite que le sérum des lapins immunisés permet d'agglutiner 85% des échantillons humains. Ils ont nommé les échantillons agglutinés par ces sérums « Rh+ » et ceux qui ne produisent pas de réaction « Rh- » (27).

Il fut alors acté que les anticorps de la jeune femme et ceux du lapin reconnaissaient le même facteur Rhésus chez l'homme et chez le singe. On découvrit finalement dans les années 1960 que l'anticorps mis en évidence par Landsteiner et Wiener n'était pas le même que celui étudié par Levine. Le facteur humain découvert par Levine garda le nom de RH (Rhésus) alors que le facteur commun au singe et à l'homme devint LW (Landsteiner-Wiener), nommé ainsi pour saluer les travaux de ces derniers (28).

On sait maintenant d'où vient la confusion entre RH et LW : les globules rouges de sujets Rh+ possèdent beaucoup plus d'antigènes LW que les GR de sujets Rh-.

Le système RH est le numéro 004 d'après la classification des systèmes de groupes sanguins de l'ISBT (*International Society of Blood Transfusion*) (6). C'est le plus important en termes de sécurité transfusionnelle après le système ABO. Il possède 55 antigènes mais les cinq principaux sont : RH1 (D), RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e). Les bases génétiques du système RH ont été déterminées par la biologie moléculaire dans les années 1990. Ces études décrivent l'existence du locus RH constitué de deux gènes : le gène *RHD* qui produit l'antigène D et le gène *RHCE* qui produit les antigènes C/c, E/e. Ces deux gènes sont situés sur le bras court du chromosome 1 (au locus 1p34.3 – 1p36.1 (29)), et dérivent vraisemblablement de la duplication d'un gène ancestral commun : le gène *RHD* est le produit d'une translocation génique horizontale du gène *RHCE*. Ils sont composés chacun de dix exons et présentent 96% de similarité (30). Les gènes *RHD* et *RHCE* sont orientés en tandem

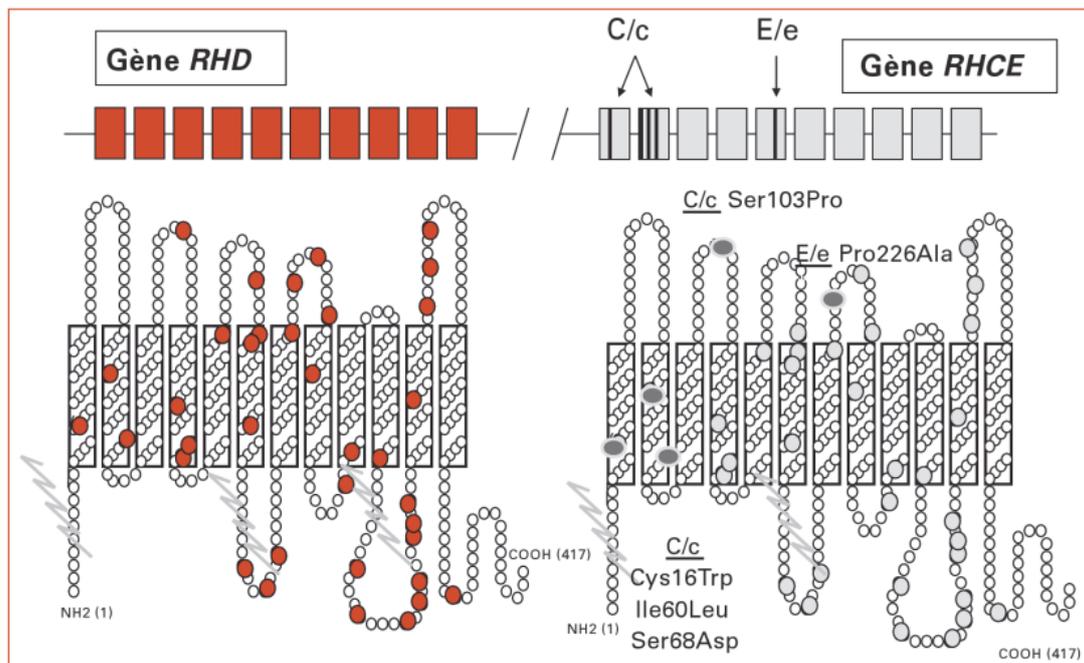
inversé : les extrémités 3' se font face. Cette inversion explique la facilité de survenue de conversions géniques, en effet après repliement en épingle à cheveux, les deux gènes et tous leurs exons se retrouvent strictement les uns en face des autres. Les deux gènes *RHD* et *RHCE* forment ensemble un haplotype, transmis en un seul bloc lors de la méiose. Il en existe 8 différents et leurs fréquences sont variables au sein des populations.

Les gènes *RHD* et *RHCE* sont séparés par environ 30 000 paires de bases qui contiennent le gène *SMP1* (Small Membrane Protein 1). Le gène *RHD* est entouré par deux boîtes rhésus, qui ont une longueur d'environ 9000 pb, une homologie de 98.6% et une orientation identique (31) (Figure 1).



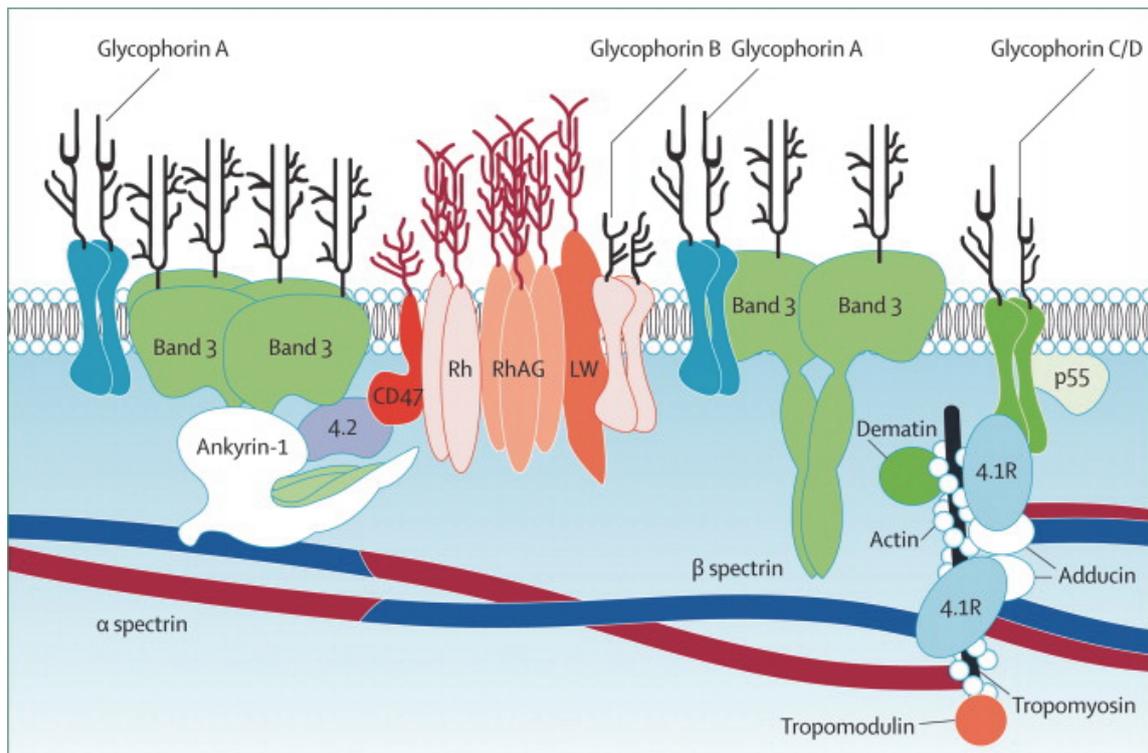
**Figure 1 : Locus RH (32)**

Les protéines RhD et RhCE, produites directement par les gènes *RHD* et *RHCE*, appartiennent à la famille de transporteurs d'ammonium Amt/MEP/Rh (Ammonium transporter, methylamine permease, Rh). Elles sont constituées chacune de 417 acides aminés, répartis en douze domaines transmembranaires dans la bicouche lipidique érythrocytaire. Ces protéines ne diffèrent que de 32 à 35 acides aminés selon les allèles RHCE. Les extrémités C-terminale (COOH) et N-terminale (NH<sub>2</sub>) sont intracellulaires. Ces polypeptides sont constitués de 6 boucles extracellulaires, 5 boucles intracellulaires, et 12 passages transmembranaires (Figure 2) (33).



**Figure 2 : Polypeptides Rh (33)**

La famille des protéines Rh comprend également la protéine RhAG (Rhesus associated glycoprotein), codée par un gène situé sur le chromosome 6. Les protéines RhD, RhCE et RhAG sont associées entre elles pour former le complexe RH à la surface membranaire. Ce complexe joue un rôle fondamental dans l'intégrité structurale de la membrane du globule rouge de par son interaction avec la spectrine et l'ankyrine du cytosquelette, et fait intervenir plusieurs protéines liées de manière non-covalente : CD47, LW, glycophorines A et B (Figure 3) (34,35).



**Figure 3 : Principales protéines de la membrane érythrocytaire (36)**

La protéine RhAG est exprimée au cours de la différenciation érythroïde, en amont des protéines Rh. Elle est indispensable aux protéines RhD et RhCE pour atteindre la membrane érythrocytaire, ce qui signifie que les mutations de la protéine RhAG sont associées à la perte totale d'expression des antigènes RH (RHD et RHCE) et conduisent au phénotype Rh<sub>null</sub> (phénotype dit « régulateur »). Le deuxième mécanisme aboutissant au phénotype Rh<sub>null</sub> est lié à l'absence d'expression du gène *RHCE* en association avec une délétion du gène *RHD* : il s'agit du phénotype dit « amorphe » (37,38). Les GR Rh<sub>null</sub> sont morphologiquement et fonctionnellement anormaux. Chez les individus Rh<sub>null</sub>, on retrouve des stomatocytes et des sphérocytes au frottis sanguin ainsi qu'un certain degré d'anémie hémolytique. La sévérité de cette anémie est cependant très variable en fonction des individus (39).

Plusieurs nomenclatures sont couramment utilisées pour désigner les différents antigènes présents à la surface du globule rouge, notamment deux nomenclatures historiques : celle de Fisher-Race et celle de Wiener, mais aussi la nomenclature de Rosenfield qui est à l'origine de la nomenclature internationale (*ISBT*) (40) (Tableau 1).

Tableau 1 : Haplotypes du système RH et phénotypes érythrocytaires correspondants

Haplotypes		Phénotypes érythrocytaires	
Fisher-Race	Wiener	ISBT	Nomenclature usuelle
<i>Dce</i>	$R^0$	RH : 1, -2, -3, 4, 5	D+, C-, E-, c+, e+
<i>DCe</i>	$R^1$	RH : 1, 2, -3, -4, 5	D+, C+, E-, c-, e+
<i>DcE</i>	$R^2$	RH : 1, -2, 3, 4, -5	D+, C-, E+, c+, e-
<i>DCE</i>	$R^Z$	RH : 1, 2, 3, -4, -5	D+, C+, E+, c-, e-
<i>dce</i>	$r$	RH : -1, -2, -3, 4, 5	D-, C-, E-, c+, e+
<i>dCe</i>	$r'$	RH : -1, 2, -3, -4, 5	D-, C+, E-, c-, e+
<i>dcE</i>	$r''$	RH : -1, -2, 3, 4, -5	D-, C-, E+, c+, e-
<i>dCE</i>	$r'''$	RH : -1, 2, 3, -4, -5	D-, C+, E+, c-, e-

Dans les populations originaires d'Afrique Subsaharienne, l'haplotype *Dce* ou  $R^0$  est le plus répandu. Cet haplotype est considéré comme la forme ancestrale à partir de laquelle les autres haplotypes (*dce*, *dCe*, *dcE*, *dCE*, *DCe*, *DcE*, *DCE*) sont apparus par délétion, conversion, mutation, ou recombinaison (41) (Figure 4).

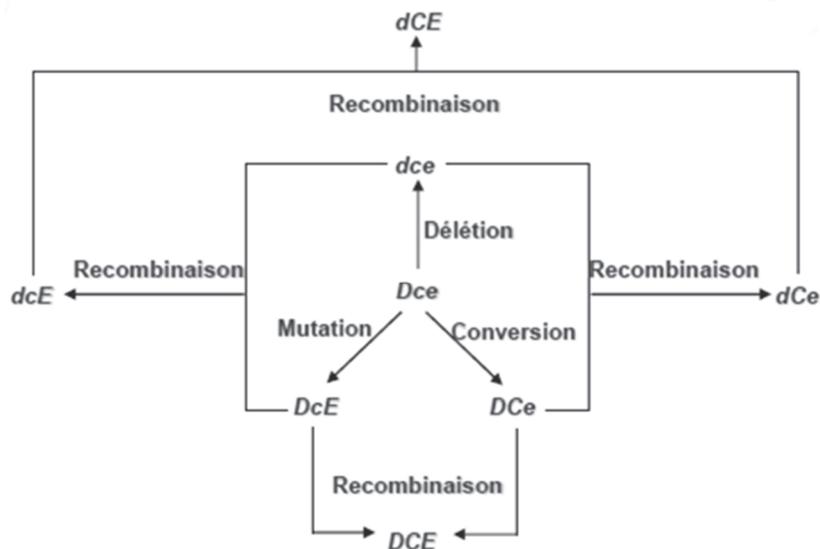


Figure 4 : Phylogénie des haplotypes RH

### a. Polymorphismes RHD

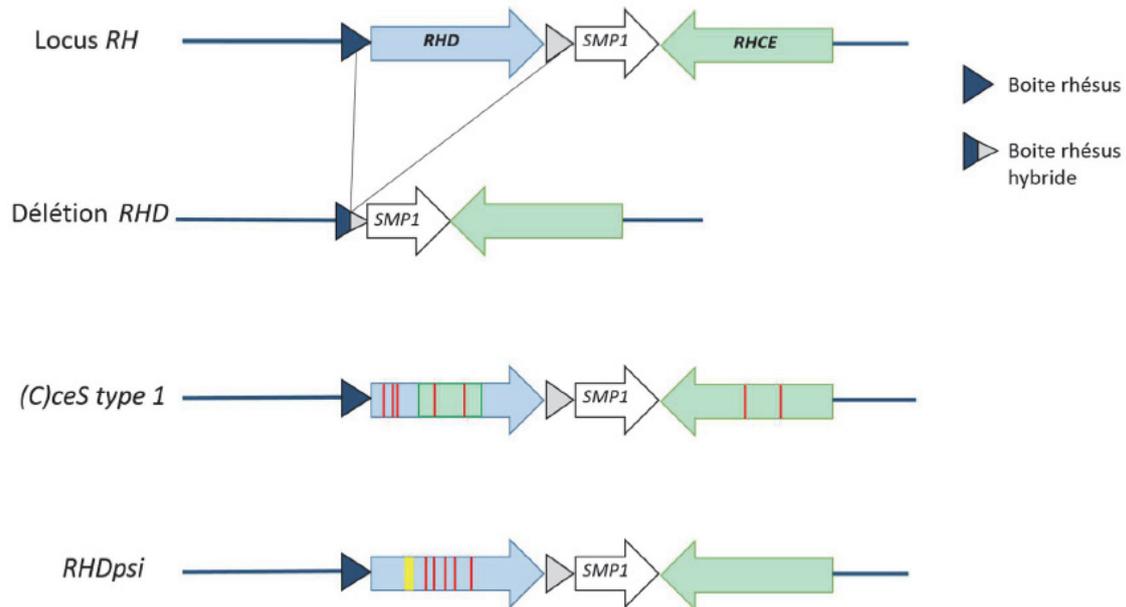
Le gène *RHD* code pour l'antigène RH1 (D). Les deux allèles principaux de ce gène sont *RHD\*01*, l'allèle sauvage, produisant l'antigène RH1 (D) normal, et *RHD\*01N.01*, une délétion de l'ensemble de la séquence codante du gène, responsable d'un phénotype RH : -1 (D négatif) (42).

Dans les populations d'origine Caucasienne, 85% des sujets sont D positif (43). Le phénotype D négatif, observé chez 15% des individus, est principalement associé à une délétion du gène *RHD*. Cette délétion est le résultat d'un *crossing over* inégal entre les deux boîtes rhésus, facilité par leur grande homologie, ce qui entraîne l'apparition d'une boîte rhésus hybride (Figure 5). Dans ces populations, le phénotype D positif est donc associé à la présence soit de deux allèles *RHD* (homozygote), soit d'un seul allèle *RHD* en *trans* de la délétion du gène *RHD* (hémizygote).

Concernant les populations d'Afrique Subsaharienne, le phénotype D négatif est observé chez environ 8% des individus (43). Il peut résulter, en dehors de la délétion, de deux autres gènes *RHD* inactivés. Le plus fréquent est le pseudogène *RHD* (*RHD-ψ* (*psi*) - *RHD\*08N.01*) observé chez 66% des phénotypes D négatifs (44). Cet allèle est caractérisé par une duplication de 37 pb dans les régions intron 3 – exon 4, ainsi que plusieurs polymorphismes dans les exons 5 et 6. La duplication génère un décalage du cadre de lecture et la protéine traduite présente un codon stop prématuré en position 210, ce qui assure qu'aucune protéine RhD n'est présente au niveau de la membrane des globules rouges.

Le second allèle inactif est codé par le gène hybride *RHDIIIa-CE(4-7)-D* (*RHD\*03N.01*), résultant d'une conversion génique et retrouvé chez 15% des phénotypes D négatifs africains (44). La formation de structures en épingles à cheveux causée par la grande similarité entre les deux gènes *RH* faciliterait les événements de conversion génique en *cis* (échange intergénique non réciproque) (45,46). Dans cet haplotype hybride, une partie de l'exon 3 et les exons 4 à 7 du gène *RHD* sont remplacés par les exons correspondants du gène *RHCE*. Cinq substitutions nucléotidiques sont également présentes. Trois substitutions sont situées dans le gène *RHD* : 186 G>T (Leu62Phe) dans l'exon 2, 410 C>T (Ala137Val) et 455 A>C (Asn152Thr) dans l'exon 3, et deux substitutions sont situées dans le gène *RHCE* : 733 G>C (Leu245Val) dans l'exon 5 et 1006 G>C (Gly336Cys) dans l'exon 7. En association avec l'allèle *ce<sup>S</sup>(1006)*, il constitue l'haplotype hybride (*C*)*ce<sup>S</sup>* de type 1 qui présente un profil antigénique RhD négatif avec une expression faible et partielle des antigènes RH2 (C), RH4

(c) et RH5 (e), l'expression d'antigène de faible fréquence RH20 (VS), ainsi qu'une perte des antigènes de haute fréquence RH : -31 (hr<sup>B</sup>), et RH : -34 (Hr<sup>B</sup>) (47–49).

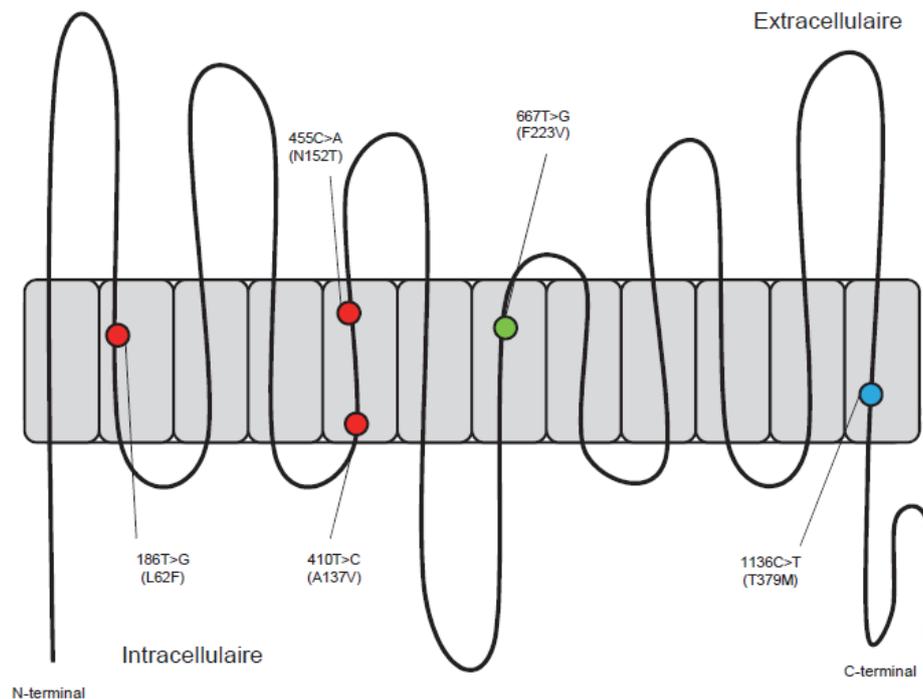


**Figure 5 : Bases moléculaires des phénotypes D négatifs (32)**

Chez les personnes d'origine Asiatique, le phénotype D négatif est moins répandu et représente environ 0,5% des individus (43). Dans cette population, il est important de se méfier des phénotypes qui semblent D négatifs en sérologie, car un allèle produisant un antigène RhD d'expression très affaiblie (phénotype DEL) est courant (50,51). Le phénotype DEL (D-elute) est caractérisé par un très faible nombre de sites RhD par GR (< 200 molécules RhD/hématie), et apparaît D négatif avec les réactifs sérologiques classiques. L'antigène D est alors mis en évidence par une technique de fixation / élution (52).

## b. Phylogénie *RHD*

L'étude phylogénétique des allèles *RHD* identifie 4 « *clusters* » (53). Chaque *cluster* est défini par des allèles ayant en commun un polymorphisme racine et dérivant les uns des autres par l'addition successive de nouveaux polymorphismes (Figure 6). On distingue ainsi le *cluster* RhD eurasien et trois *clusters* africains, à savoir le DIVa, le DAU et le D faible type 4. L'arbre phylogénétique est présenté en figure 7.



**Figure 6 :** Modèle en deux dimensions de la protéine RhD montrant la localisation des polymorphismes caractéristiques des clusters DIVa (rouge), D faible type 4 (vert) et DAU (bleu)

Chacun des *clusters* africains est caractérisé par une substitution d'acide aminé par rapport à l'allèle *RhD* complet tel qu'il est défini comme référence :

- 186G>T (Leu62Phe), 410C>T (Ala137Val) et 455A>C (Asn152Thr) pour le *cluster* DIVa. La grande majorité des allèles présents dans ce *cluster* codent des phénotypes RHD partiels, notamment l'haplotype (*C*)ces de type 1.
- 667T>G (Phe223Val) pour le *cluster* D faible type 4. Il comprend de nombreux allèles cliniquement pertinents comme le D faible type 4.2 (*DAR*) et le pseudogène *RHD* $\psi$ .
- 1136C>T (Thr379Met) pour le *cluster* DAU, qui code pour des antigènes D faibles ou partiels, par exemple le *DAU0*.



### c. Polymorphismes RHCE

Dans la population européenne, l'antigène RH2 (C) est présent chez 70% des individus, l'antigène RH3 (E) chez 30%, l'antigène RH4 (c) chez 80% et enfin l'antigène RH5 (e) chez 98%. Les antigènes C et c d'une part, et les antigènes E et e d'autre part sont antithétiques, cela signifie que si l'un est absent, l'autre est forcément présent.

Les différents haplotypes existants dérivent de l'haplotype ancestral *Dce* par divers mécanismes (Figure 4).

L'haplotype *DCe* est obtenu par un mécanisme de conversion génique, avec le transfert de l'exon 2 du gène *RHD* dans le gène *RHCE*. Bien que cet exon 2 soit presque identique à celui de *RHD*, l'antigène RH2 (C) est conformationnel et ne s'exprime que sur la protéine RhCE et pas sur la protéine RhD. L'haplotype *DCe* possède les polymorphismes suivants :

- 48 G>C (Trp16Cys) dans l'exon 1
- 150 C>T (Val50Val) ; 178 C>A (Leu60Ile) ; 201 A>G (Ser67Ser) ; 203 A>G (Asn68Ser) ; 307 C>T (Pro103Ser) dans l'exon 2
- Insertion 109 pb dans l'intron 2 (IVS2Ins109)

L'haplotype *DcE* est obtenu à partir de l'haplotype ancestral *Dce* par une mutation dans l'exon 5 : 676 G>C (Ala226Pro). L'antigène RH5 (e) est lui aussi conformationnel. L'Alanine en position 226 fait donc apparaître l'antigène RH5 (e) en contexte RhCE et pas en contexte RhD. Ces différents haplotypes sont représentés dans la figure 8.

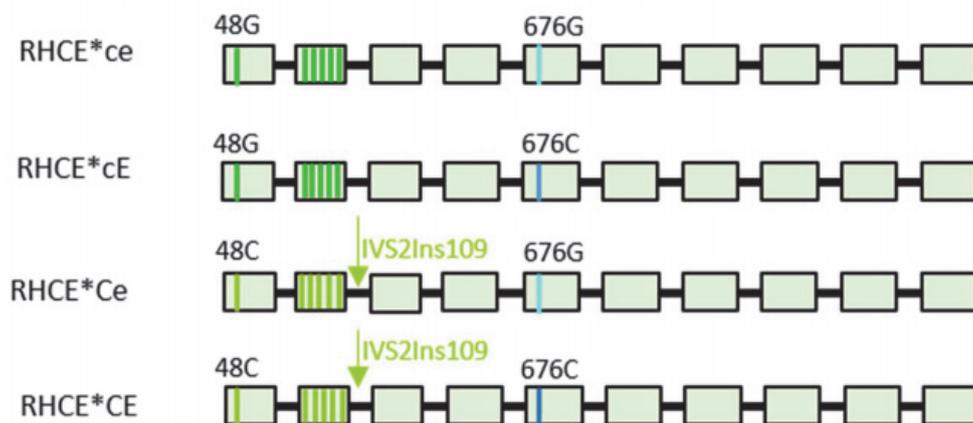


Figure 8 : Représentation des allèles RHCE (32)

#### **d. Variants *RHD***

Chacun des antigènes RhD est constitué d'une mosaïque d'épitopes, tous présents lorsque le sujet est RhD positif, et tous absents chez le « vrai » sujet RhD négatif.

##### ***i. Phénotype D partiel***

Certains sujets peuvent manquer d'un ou plusieurs épitopes, ils possèdent alors un antigène D partiel. S'ils sont exposés à l'antigène complet par transfusion ou grossesse, ils peuvent produire des anticorps contre des épitopes qu'ils n'expriment pas. Ainsi les individus présentant un antigène D partiel seront considérés RH : -1 (D négatif) en tant que receveurs, et RH : 1 (D positif) en tant que donneurs de sang. Les antigènes D variants résultent généralement de mutations ponctuelles du gène *RHD* avec modifications d'acides aminés au niveau des domaines extracellulaires de la protéine RhD ou de réarrangements géniques entre *RHD* et *RHCE*, notés *RHD-CE-D* (54).

##### ***ii. Phénotype D faible***

Classiquement, une hématie RH1 possède entre 10 000 et 30 000 sites antigéniques D. Le phénotype RH1 faible est caractérisé par un déficit quantitatif en sites antigéniques RH1 : 70 à 4000 sites par GR (55). Il provient de mutations situées au niveau des domaines transmembranaires et intracellulaires de la protéine RhD (54). Ce déficit aboutit à une faible immunogénicité et à une diminution de la réactivité voire une absence de détection de cet antigène en fonction du seuil de sensibilité de la technique utilisée lors de la réalisation du phénotype. Les individus présentant un D faible ne produiront classiquement pas d'allo-anticorps anti-D s'ils sont exposés à l'antigène D normal. Il est cependant accepté en consensus que seuls les D faibles types 1, 2 ou 3 sont à considérer comme D positifs (56).

### *iii. Phénotype DEL*

Le phénotype DEL représente l'extrême forme du phénotype D faible, ce variant est caractérisé par une très faible expression de l'antigène D (< 200 sites / hématie). Sa mise en évidence n'est possible que par des techniques de fixation / élution (52,57). Des analyses moléculaires ont montré la présence de différentes mutations (58).

#### **e. Allo-immunisation**

Les antigènes du système RH et surtout l'antigène D sont fortement immunogènes (7). Les anticorps apparaissent classiquement après allo-immunisation suite à une transfusion, une grossesse ou une greffe (59). Il est recommandé de rechercher une éventuelle allo-immunisation entre 30 et 112 jours après la transfusion de CGR (60). L'allo-immunisation anti-érythrocytaire est un phénomène irréversible, comme le dit le proverbe « anticorps un jour, anticorps toujours ». Chaque nouvelle exposition à l'antigène provoque une réactivation de la réponse immunitaire, pouvant engendrer des complications hémolytiques potentiellement mortelles.

La prévention de l'allo-immunisation anti-érythrocytaire est un enjeu majeur en immuno-hématologie. Les protocoles transfusionnels sont adaptés à l'âge et au sexe (femme en âge de procréer), au contexte clinique ou à la pathologie, et au statut d'allo-immunisation. Les CGR sélectionnés peuvent respecter l'antigène RH1 (D), respecter aussi les autres antigènes principaux RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e), KEL1 (K), et respecter un ou plusieurs antigènes du phénotype étendu. Pour tout patient immunisé, pour les patients drépanocytaires et pour les patients présentant un phénotype érythrocytaire rare, des épreuves de compatibilité au laboratoire sont systématiquement réalisées avec le plasma du patient pour chaque CGR à transfuser. Chez les femmes enceintes, l'utilisation d'immunoglobulines anti-RH1 (Rophylac<sup>®</sup>) a permis de réduire considérablement l'incidence de l'allo-immunisation anti-D, et ainsi de réduire l'incidence des maladies hémolytiques du nouveau-né (MHNN) liées à l'anti-RH1 (61).

## II. Objectifs

A l'Établissement Français du Sang, tous les patients atteints de drépanocytose bénéficient d'une exploration systématique des gènes *RHD* et *RHCE* en cas d'ambiguïté sérologique due par exemple à une transfusion récente, ou si le patient présente moins de 12 épisodes transfusionnels. En effet, à partir du moment où un patient a déjà bénéficié de plus de 12 transfusions sanguines au cours de sa vie et n'a jamais développé d'allo-anticorps, il est considéré comme faible répondeur et il n'est plus nécessaire d'effectuer de génotypage *RHD* et *RHCE* (5).

En France, trois laboratoires d'immuno-hématologie réalisent le génotypage des groupes sanguins par biologie moléculaire : Créteil, Brest et Marseille. La recherche des variants *RHD* et *RHCE* est réalisée à l'aide de puces dédiées (kits Beadchip™ / Immucor®). Ce sont des tests de diagnostic *in vitro* qualitatifs conçus pour la détermination moléculaire de nombreux polymorphismes nucléotidiques conduisant à différents allèles d'intérêt, responsables de l'expression normale ou altérée, voire une absence d'expression des antigènes sur l'érythrocyte humain. Ces tests sont effectués grâce à l'analyse de l'ADN génomique.

Le premier objectif de ce travail concerne le kit BioArray RHD Beadchip™. Ce kit détecte 35 marqueurs génétiques et permet d'identifier 68 variants du gène *RHD*. Mais les polymorphismes recherchés par cette technique sont-ils adaptés à la population drépanocytaire ? Pouvons-nous nous arrêter à un allèle *RHD* sauvage rendu après exploration de ces 35 polymorphismes seulement ? En effet la drépanocytose est une pathologie très répandue en Afrique et les populations originaires d'Afrique Subsaharienne sont connues pour avoir un niveau élevé de diversité génétique (8).

La seconde partie de ce travail est une étude des variants du système RH dans la population drépanocytaire de PACA – Corse entre 2011 et 2019, afin de faire un état des lieux des polymorphismes les plus fréquents dans cette région, d'étudier l'état d'allo-immunisation des patients et les spécificités d'anticorps développés en fonction des types de CGR transfusés et également de déterminer l'intérêt du génotypage systématique chez les drépanocytaires.

### III. Matériels et méthodes

Les échantillons de sang de patients drépanocytaires sont envoyés par différentes régions (Occitanie, Auvergne-Rhône-Alpes et l'Île de la Réunion) au laboratoire IHR (Immuno-Hématologie Receveur) de l'EFS PACA-Corse afin de réaliser un génotypage érythrocytaire systématique, dans le but de définir le phénotype RhD et RhCE des patients, et pouvoir adapter leur consigne transfusionnelle. Le génotypage érythrocytaire *RHD* et *RHCE* est réalisé par une PCR multiplexée (BioArray®) qui permet de rechercher un panel de mutations connues. Si le résultat est indéterminé, ou si le patient présente une ambiguïté sérologique sans variant identifié, le séquençage des dix exons du gène *RHD* ou du gène *RHCE* est réalisé dans un second temps.

#### 1. Analyse des D sauvages identifiés par BioArray

Nous avons réalisé le séquençage des dix exons du gène *RHD* chez 42 patients drépanocytaires pour lesquels le résultat du génotypage BioArray® RHD Beadchip™ est un « probable *RHD* sauvage ».

##### a. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN génomique (ADNg) est réalisée à partir de 200 µL de sang total prélevé sur tube EDTA. L'extraction est réalisée à l'aide de l'automate QIACUBE (Qiagen) en utilisant le kit QIAmp DNA Blood Mini kit (Qiagen) en suivant la notice fournisseur. Ce kit est basé sur l'adsorption sélective des ADNg sur une matrice de silice. Les ADNg sont élués dans de l'eau. La mesure de la concentration d'ADNg est réalisée par spectrophotométrie sur un Nanodrop 2000.

## b. Génotypage BioArray

La recherche des variants du gène *RHD* et du gène *RHCE* est réalisée par la technique eMAP® (Elongation-mediated Multiplexed Analysis of Polymorphisms) à l'aide des kits BioArray RHD Beadchip et BioArray RHCE Beadchip (Immucor®).

Le kit RHD détecte 35 marqueurs génétiques et permet d'identifier 68 variants du gène *RHD* dans les exons 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, tandis que le kit RHCE détecte 25 marqueurs génétiques et permet d'identifier 48 variants du gène *RHCE*, dans les exons 1, 3, 4, 5, 6, 7. Les listes des polymorphismes recherchés et des variants identifiés par les kits se trouvent en annexes 1 et 2.

Principe : cette technique se déroule en plusieurs étapes : (Figure 9)

- PCR multiplexée réalisée à l'aide de couples d'amorces dont l'une est phosphorylée en 5' pour chaque couple.
- Purification de la réaction de PCR par un mélange d'exonucléase-I (exo-I), et de phosphatase alcaline de crevette (SAP, Shrimp alcalin phosphatase) qui dégradent les amorces résiduelles et les dNTP (désoxynucléotides) en excès.
- Génération d'ADN simple-brin à partir des amplicons de PCR grâce à l'exonucléase Lambda qui va dégrader le brin phosphorylé.
- Hybridation du simple brin sur une puce comportant des billes colorées sur lesquelles sont greffées des sondes spécifiques des SNP d'intérêts ; à chaque couleur de bille correspond une sonde. Cette étape d'hybridation est réalisée dans une chambre humide à une température contrôlée de 55°C en présence d'une ADN polymérase, de dCTP-TAMRA et de dNTP.

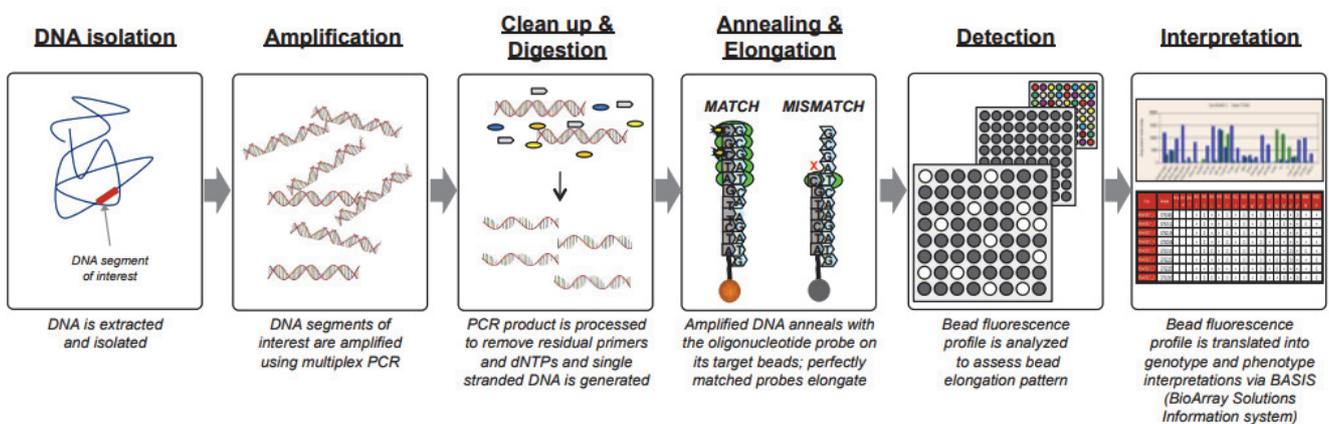
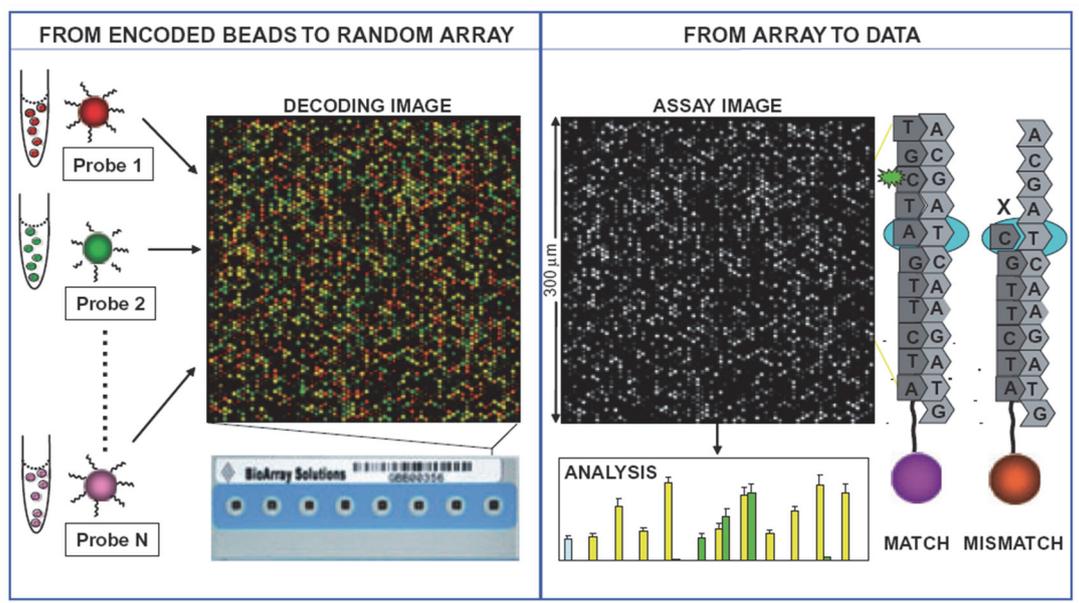


Figure 9 : Processus d'analyse avec les puces BioArray RH eMAP®

Lorsque l'hybridation est parfaite entre l'amplicon simple brin et la sonde portée par la bille colorée, l'élongation va permettre l'incorporation du nucléotide dCTP-TAMRA. En l'absence d'hybridation complète il n'y a pas d'élongation. Après lavage, la puce est soumise à une optique de fluorescence associée à une caméra pour visualiser les billes marquées par le dCTP-TAMRA et mesurer l'intensité du signal. La lecture est réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence en superposant les images de codage des billes colorées avec celles de la fluorescence associée pour chaque bille (Figure 10). Le logiciel BASIS (*BioArray Solution Information System*) interprète les données de fluorescence et permet, pour chaque SNP, de définir un génotype homozygote sauvage (AA), homozygote muté (BB), ou hétérozygote (AB).



**Figure 10 : Lecture des puces Bioarray par superposition des images de codages des billes colorées (à gauche) avec les images de fluorescence obtenues (à droite)**

Réalisation :

Quel que soit le kit utilisé (BioArray RHD Beadchip ou BioArray RHCE Beadchip) la PCR multiplex est réalisée en présence de 16 µL du mix de PCR spécifique, 1 µL d'ADN polymérase HotStarTaq et 8 µL d'ADNg dont la concentration est comprise entre 10 et 80 ng/µL. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur GeneAmp® PCR system 9700 ou Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystem).

Étapes des techniques Bioarray RHD et RHCE Beadchip :

Le protocole est identique : le programme de PCR commence par une étape de dénaturation initiale avec activation de la polymérase à 95°C pendant 15 minutes. Cette étape est suivie de 35 cycles d'amplifications composés comme suit : [95°C - 30 sec ; 65°C - 45 sec ; 72°C - 45 sec] pendant 10 cycles, puis [95°C - 30 sec ; 61°C - 45 sec ; 72°C - 45 sec] pendant 25 cycles.

Le produit de PCR (6,5 µL) est purifié en présence de 2 µL de réactif de nettoyage Clean-Up (exonucléase-I + SAP) pendant 15 min à 37°C, puis 8 min à 85°C pour inactiver l'enzyme.

Le simple brin est ensuite généré par addition de 2 µL de Lambda Exonucléase et incubation à 37°C pendant 20 min. Puis, l'enzyme est inhibée par incubation 8 min à 85°C.

Enfin, l'étape d'hybridation / élongation est réalisée en ajoutant 10 µL du mix d'élongation eMAP au produit de PCR simple brin. Un volume de 18 µL de ce mélange est déposé sur une puce qui est ensuite incubée 30 min à 55°C dans une atmosphère humide. Après lavage et lecture des puces les résultats sont interprétés via le logiciel BASIS.

Le résultat du génotypage BioArray RHD Beadchip est représenté sous la forme d'un histogramme (chart) représentant les différents polymorphismes recherchés dans le kit RHD (Figure 11).

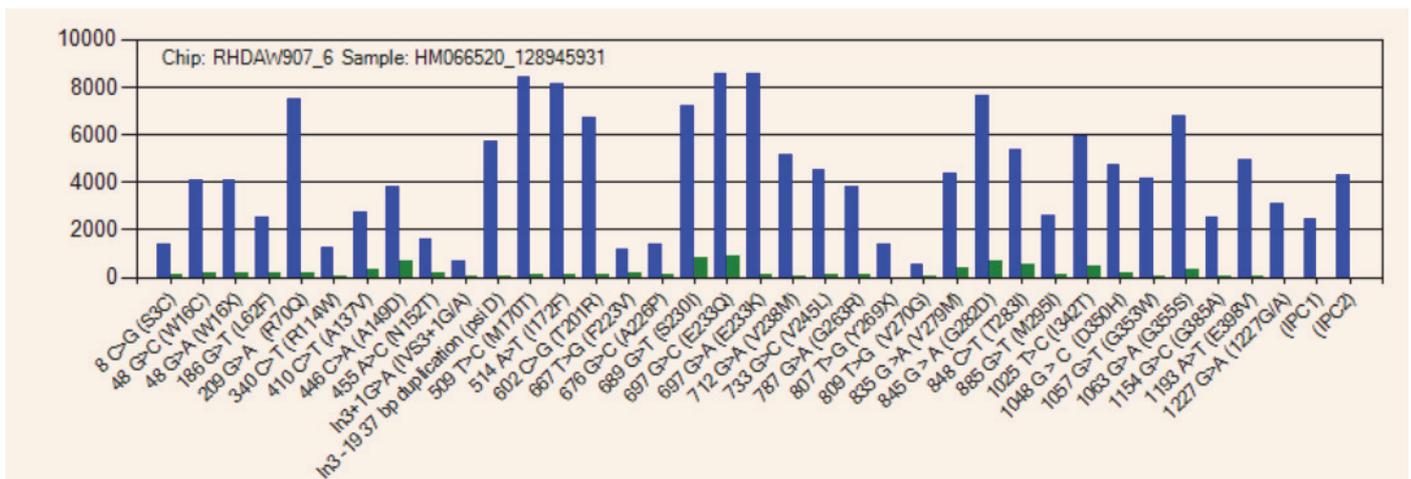


Figure 11 : Résultat BioArray représentant un allèle RHD sauvage

Les deux derniers rectangles, nommés IPC1 et IPC2 correspondent aux témoins internes, ils doivent être amplifiés et présents à l'état homozygote sauvage (AA) pour valider le contrôle qualité interne.

Pour l'interprétation des polymorphismes, lorsqu'il n'y a qu'un rectangle bleu, l'allèle est sauvage à l'état homozygote (AA), s'il y a un rectangle bleu et un rectangle vert, l'individu est hétérozygote avec un allèle sauvage et un allèle muté (AB), et lorsqu'il n'y a qu'un rectangle vert, l'allèle est muté à l'état homozygote (BB).

Le logiciel BASIS génère également un « Genotype report » qui retranscrit les polymorphismes détectés (AA, AB, ou BB).

### **c. Amplification et séquençage du gène *RHD***

L'amplification des 10 exons du gène *RHD* est réalisée sur 100 ng d'ADNg dans un volume final de 50 µL, contenant 5 µL de tampon de PCR, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 80 ng d'Albumine Sérique Bovine (BSA), 0,2 mM de chaque dNTP, 0,05 unités de Taq polymérase (Invitrogen) et 200 mM de chaque amorce (les séquences des amorces sont listées en annexe 3). Il s'agit d'une PCR « Touch-down » réalisée dans un thermocycleur GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9700 (Applied Biosystem). Le programme de PCR est constitué de 42 cycles répartis comme suit : pendant les douze premiers cycles la température d'hybridation (T°C) décroît de 66°C à 61°C tous les deux cycles, [94°C - 30 sec ; T°C - 30 sec ; 72°C - 1 min], les trente derniers cycles sont ensuite réalisés à une température d'hybridation de 60°C [94°C - 30 sec ; 60°C - 30 sec ; 72°C - 1 min].

Après l'amplification, les produits de PCR sont contrôlés par migration sur gel d'agarose à 2 % en présence d'un intercalant de l'ADN (ClearSight DNA Stain, Euromedex).

Les produits de PCR sont ensuite séquencés suivant la technique de Sanger, à l'aide des amorces citées en annexe 4, *via* le prestataire Eurofins Genomics (GATC Services, Ebersberg, Allemagne).

Les séquences d'ADN obtenues sont assemblées et analysées à l'aide du logiciel SeqMan Pro<sup>®</sup> (DNASTAR).

#### d. Fréquence allélique

A partir des résultats de génotypage, des fréquences alléliques ont été calculées à partir de la formule : soit  $x$  l'allèle,  $p(x)$  sa fréquence allélique,  $n_x$  le nombre d'allèles  $x$  identifiés, et  $N$  le nombre d'individus total.

$$p(x) = \frac{n_x}{2N}$$

Les techniques utilisées (BioArray ou séquençage) ne déterminent pas la zygote du gène *RHD*. La zygote peut être déterminée uniquement dans l'une des conditions suivantes :

- Présence de 2 allèles variants : hétérozygotie identifiée
- Présence d'un allèle sauvage en *trans* d'un allèle variant : hétérozygotie identifiée
- Détection d'un haplotype à l'aide des résultats du gène *RHCE*
  - Exemple : cas de l'haplotype *(C)ce<sup>s</sup>* qui correspond à l'association d'un gène *RHD\*DIIIa-CE(4-7)-D* et d'un gène *RHCE\*ce<sup>s</sup>1006*. Si un gène *RHD* hybride : *DIIIa-CE(4-7)-D* est identifié, la zygote est alors non déterminée : soit l'allèle hybride est à l'état homozygote, soit à l'état hétérozygote avec un gène *RHD* délété en *trans*. Au niveau du gène *RHCE*, le fait que l'allèle *ce<sup>s</sup>1006* soit à l'état hétérozygote confirme l'hétérozygotie au niveau du gène *RHD* : hybride / *RHD* délété.

Lorsqu'un allèle apparaît sans autre variant en *trans*, il est impossible de déterminer, avec les outils utilisés, s'il est présent à l'état homozygote ou hétérozygote face à un gène *RHD* délété. Ainsi dans les calculs de fréquences alléliques, pour certains allèles il apparaît 2 valeurs, une minimale correspondant au calcul de l'allèle à l'état hétérozygote avec un allèle *RHD* délété en *trans*, et une valeur maximale correspondant au calcul de l'allèle à l'état homozygote.

## **2. Analyse rétrospective des phénotypes RHD / RHCE des drépanocytaires en PACA – Corse**

Le génotypage systématique des gènes *RHD* et *RHCE* chez les patients drépanocytaires est réalisé en France depuis fin 2014 (5). La connaissance de l'expression normale ou altérée, voire de l'absence d'expression des antigènes sur l'érythrocyte permet d'adapter la consigne transfusionnelle des patients, afin de respecter au mieux la compatibilité antigénique des CGR transfusés et ainsi diminuer les risques d'allo-immunisation.

Une analyse rétrospective des phénotypes RHD / RHCE dans notre région a été réalisée dans le but d'évaluer l'importance de ce génotypage systématique.

Nous avons réalisé une extraction à l'aide du logiciel LogiBM et du fichier Excel précédent ce logiciel, qui s'étend sur 9 années (début 2011 à fin 2019), et nous avons identifié 351 patients drépanocytaires issus de la région PACA-Corse ayant eu un génotypage érythrocytaire. Cette analyse a été réalisée à l'aide des kits BioArray RHD Beadchip et BioArray RHCE Beadchip (Immucor®), et complétée par le séquençage des 10 exons des gènes *RHD* et/ou *RHCE* en cas de résultat indéterminé aux kits BioArray, ou si le patient présente une ambiguïté sérologique sans variant identifié. Les allèles *RHCE\*CeRN* et *RHCE\*ceAG (ce254)* ont été recherchés par PCR temps réel et PCR allèle spécifique.

Nous avons également recherché pour chacun de ces patients une éventuelle allo-immunisation, traduite par une RAI positive avec identification de l'allo-anticorps.

## IV. Résultats

### 1. Séquençage du gène *RHD* des génotypes « *RHD* sauvages » rendus par BioArray

La cohorte se compose de 42 patients drépanocytaires issus de différentes régions françaises. L'analyse réalisée par le kit RHD Beadchip n'a identifié aucun polymorphisme, le logiciel interprète les résultats comme des « probables allèles *RHD* sauvages » pour tous ces patients (zygotie non déterminée), aboutissant à des phénotypes déduits D positifs. Les 10 exons du gène *RHD* ont été séquencés chez ces 42 patients.

Le séquençage a permis d'identifier des variants du gène *RHD* déjà décrits mais non recherchés par la technique BioArray, nous avons ainsi identifié 11 allèles DAU0, 1 DAU0.1, une délétion de l'exon 10, et différents polymorphismes dans les régions non codantes du gène *RHD* : intron 1, intron 3, intron 4, intron 8, région 3' UTR. Nous avons également identifié cinq nouveaux allèles variants du *RHD* : trois polymorphismes dans les exons et deux polymorphismes dans les introns proches des exons. Les 3 nouveaux polymorphismes mis en évidence dans les exons aboutissent chacun à une mutation silencieuse : l'acide aminé n'est pas modifié.

Différentes mutations introniques ont été identifiées et nous avons considéré comme allèles D sauvages les allèles porteurs de mutations introniques situées loin des exons (IVS1-29 g>c ; IVS3+117 c>t ; IVS3 +124 a>g ; IVS4+33 t>c ; IVS8-31 c>t ; 3'UTR+93 A>G). Ceci concerne 23 patients.

Vingt-six individus soit 62% de la cohorte ne présentent pas de variant du gène *RHD* après séquençage (absence de polymorphismes dans les 10 exons, et absence de mutation intronique proche des exons). Douze individus soit 29% présentent 1 allèle variant à l'état hétérozygote avec un gène *RHD* sauvage en *trans*, dont 3 aboutissent à des mutations silencieuses. Quatre individus soit 9% présentent un allèle variant face à un gène *RHD* délété ou l'allèle variant à l'état homozygote. Les différents allèles *RHD* identifiés sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Allèles RHD identifiés par séquençage

Allèles	Nomenclature internationale	Antigène	Exon	Polymorphisme	Changement d'acide aminé	Allèle en <i>trans</i>	Nombre de patients
<i>D sauvage</i>	<i>RHD*01</i>	D+	/	/	/	<i>D sauvage ou RHD délété</i>	26
<i>DAU0</i>	<i>RHD*10.00</i>	D+	8	1136 C>T	T379M	/	3
						<i>D sauvage</i>	7
						<i>RHD (IVS3+4a&gt;t)*</i>	1
<i>DAU0.01</i>	<i>RHD*10.00.01</i>	D+	4 8	579 G>A 1136 C>T	E193E T379M	<i>D sauvage</i>	1
<i>RHD ex10del</i>	/	D partiel	10	/	/	/	1
<i>RHD (255 G&gt;A)</i>	Nouvel allèle	D+	2	255 G>A	A85A	<i>D sauvage</i>	1
<i>RHD (384 T&gt;C)</i>	Nouvel allèle	D+	3	384 T>C	D128D	<i>D sauvage</i>	1
<i>RHD (541C&gt;T)*</i>	Nouvel allèle	D+	4	541 C>T	L181L	<i>D sauvage</i>	1
<i>RHD (IVS5+12 g&gt;a)*</i>	Nouvel allèle	D+	4	541 C>T	L181L	<i>D sauvage</i>	1

Acides aminés : A = Alanine ; D = Acide aspartique ; E = Acide glutamique ; L = Leucine ; M = Méthionine ; T = Thréonine

\*colinéarité non démontrée

## 2. Analyse rétrospective des génotypes *RHD* / *RHCE* des patients drépanocytaires issus de la région PACA – Corse

Entre janvier 2011 et décembre 2019, nous avons réalisés 351 génotypages *RHD/RHCE* de patients drépanocytaires issus de la région PACA – Corse. Les phénotypes Rh de ces 351 individus sont représentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Phénotype Rh des 351 individus drépanocytaires

Phénotype	Nomenclature ISBT	Nombre d'individus
<b>D+C-E-c+e+</b>	RH : 1, -2, -3, 4, 5	152 (43,3%)
<b>D+C+E-c+e+</b>	RH : 1, 2, -3, 4, 5	100 (28,5%)
<b>D+C-E+c+e+ *</b>	RH : 1, -2, 3, 4, 5	37 (10,5%)
<b>D+C+E-c-e+</b>	RH : 1, 2, -3, -4, 5	23 (6,6%)
<b>D+C+E+c+e+</b>	RH : 1, 2, 3, 4, 5	17 (4,8%)
<b>D-C-E-c+e+</b>	RH : -1, -2, -3, 4, 5	16 (4,6%)
<b>D-C+E-c+e+</b>	RH : -1, 2, -3, 4, 5	4 (1,1%)
<b>D+C-E+c+e-</b>	RH : 1, -2, 3, 4, -5	2 (0,6%)

\* Parmi les phénotypes *D+C-E+c+e+*, 2 affaiblissements du e étaient présents.

### a. Génotype *RHD*

Les analyses ont été réalisées par le kit *RHD* Beadchip™. Les résultats montrent la présence d'allèles *D* sauvages, *RHD* délétés ainsi que d'autres allèles nuls principalement retrouvés dans les populations africaines : le *Pseudogène RHD* (ou *RHDpsi*) et l'hybride *DIIIa-CE(4-7)-D*, qui aboutissent à des phénotypes *D* négatifs. Des allèles à l'origine d'antigènes *D* partiels ont également été identifiés.

Dans notre cohorte de 351 patients :

- 13 individus présentent une délétion du gène *RHD*.
- 338 individus possèdent un gène *RHD* :
  - 265 individus (soit 75% de la cohorte) ne présentent pas de variant du gène *RHD* (*D* sauvage = *Dwt*).
  - 3 patients (1%) possèdent un allèle nul (pseudogène ou gène hybride) à l'état homozygote ou face à un gène délété.  
→ *Ce chiffre est sous-estimé par le fait que ces allèles nuls apparaissent D négatifs en technique sérologique, le génotypage RHD n'est pas forcément réalisé chez ces patients car aucune ambiguïté n'est présente.*
  - 53 individus soit 16% présentent un allèle variant à l'état hétérozygote avec un gène *RHD* sauvage en *trans*.  
→ *Résultat n'impactant pas la consigne transfusionnelle*
  - 17 individus soit 5% présentent un allèle variant soit face à un allèle nul (*RHD* délété, pseudogène, gène hybride) soit 2 allèles variants (hétérozygotie composite) soit l'allèle variant à l'état homozygote. Ces 17 drépanocytaires sont à considérer *D* négatif, et possèdent une consigne transfusionnelle en antigène *D* négatif.  
→ *Résultat impactant la consigne transfusionnelle*

Au total, 70 individus présentent au moins un allèle *RHD* variant, soit 20% de la cohorte (Figure 12). Les différents allèles *RHD* identifiés et leurs fréquences alléliques calculées sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Allèles RHD identifiés en technique BioArray et/ou séquençage et fréquences alléliques associées

Allèles	Nomenclature internationale	Antigène	Fréquence allélique
<i>Dwt*</i>	<i>RHD*01</i>	D+	45,3% – 83,1%
<b>Délétion du gène RHD</b>	<i>RHD*01N.01</i>	D-	1,8% – 3,7%
<b>Pseudogène (RHD<math>\psi</math>)</b>	<i>RHD*08N.01</i>	D-	2,4% – 2,7%
<i>DIIIa</i>	<i>RHD*03.01</i>	D partiel	1,6% – 1,7%
<b>DIIIa-CE(4-7)-D</b>	<i>RHD*03N.01</i>	D-	1,3% – 1,4%
<b>D faible type 4.0 ou 4.3</b>	<i>RHD*09.03</i> ou <i>RHD*09.05</i>	D partiel/faible (en fonction de la littérature)	1,4%
<b>DAU3 (ou DAU7 ou DAU11)</b>	<i>RHD*10.03</i> (ou <i>10.07</i> ou <i>10.11</i> )	D partiel	1,3% – 1,4%
<b>DAU5 (ou DV type 1)</b>	<i>RHD*10.05</i> (ou <i>RHD*05.01</i> )	D partiel	0,7%
<b>DIVa</b>	<i>RHD*04.01</i>	D partiel	0,7% – 1,0%
<b>DAR</b>	<i>RHD*09.01</i>	D partiel	0,6% – 0,7%
<b>D faible type 3</b>	<i>RHD*01W.3</i>	D faible	0,1% – 0,3%
<b>D faible type 5</b>	<i>RHD*01W.5</i>	D faible	0,1%
<b>DIV type 4</b>	<i>RHD*04.04</i>	D partiel	0,1% – 0,3%
<b>DAU0</b>	<i>RHD*10.00</i>	D partiel	0,1%
<b>DFR (type 1 ou 3)</b>	<i>RHD*17.01</i> ou <i>RHD*17.03</i>	D partiel	0,1%
<b>DIII type 6</b>	<i>RHD*03.06</i>	D partiel	0,1%
<b>DAR1.2 (D type 4.2.2)</b>	<i>RHD*09.01.02</i>	D partiel	0,1%
<b>RHD-CE(7)-D</b>	Nouvel allèle	/	0,1% – 0,3%
<b>RHCE-D(9)-RHCE</b>	Nouvel allèle	/	0,1% – 0,3%
<b>RHD*(744C&gt;T, 1279G&gt;C)</b>	Nouvel allèle	/	0,1% – 0,3%

Lorsque 2 valeurs de fréquence sont présentes, la zygote n'a pas pu être déterminée : la valeur minimale correspond à la valeur considérant l'allèle à l'état hétérozygote avec en trans un gène RHD délété, la valeur maximale considère l'allèle à l'état homozygote.

\*Dwt : D wild-type = D sauvage

Les différents génotypes *RHD* obtenus sont représentés dans le tableau 5, associés ou non à un impact transfusionnel, c'est-à-dire à un changement de consigne en antigène D négatif.

**Tableau 5 : Répartition des différents génotypes *RHD* dans la population drépanocytaire**

<b>Génotype</b>	<b>Nombre d'individus (N = 351)</b>	<b>Impact transfusionnel ?</b>
<i>Dwt</i> *	278	/
d/d (délétion des 2 gènes <i>RHD</i> )	13	/
<i>D psi</i> / <i>Dwt</i>	13	/
<i>DIIIa-CE(4-7)-D</i> / <i>Dwt</i>	8	/
<i>DAU3</i> (ou <i>DAU7</i> ou <i>DAU11</i> ) / <i>Dwt</i>	7	/
<i>DIIIa</i> / <i>Dwt</i>	6	/
<i>D faible type 4.0</i> ou <i>4.3</i> / <i>Dwt</i>	6	/
<i>DIVa</i> / <i>Dwt</i>	4	/
<i>DAU5</i> (ou <i>DV type 1</i> ) / <i>Dwt</i>	3	/
<i>DIIIa</i> *	2	oui
<i>DAR</i> / <i>Dwt</i>	2	/
<i>D psi</i> *	2	/
<i>DIVa</i> *	2	oui
<i>RHD-CE(7)-D</i> / <i>DAR1.2</i> ( <i>D type 4.2.2</i> )	1	oui
<i>RHD</i> *(744C>T, 1279G>C)*	1	oui
<i>RHCE-D(9)-CE</i> *	1	oui
<i>DIV type 4</i> *	1	oui
<i>DIIIa-CE(4-7)-D</i>	1	/
<i>DIIIa</i> / <i>DAU3</i> (ou <i>DAU7</i> ou <i>DAU11</i> )	1	oui
<i>DIIIa</i> / <i>D faible type 4.0</i> ou <i>4.3</i>	1	oui
<i>DIII type 6</i> / <i>Dwt</i>	1	/
<i>DFR</i> ( <i>type 1</i> ou <i>3</i> ) / <i>Dwt</i>	1	/
<i>DAU3</i> *	1	oui
<i>DAU0</i> / <i>Dwt</i>	1	/
<i>DAR</i> *	1	oui
<i>D psi</i> / <i>DIIIa</i>	1	oui
<i>D psi</i> / <i>DAU5</i> (ou <i>DV type 1</i> )	1	oui
<i>D faible type 4.0</i> ou <i>4.3</i> *	1	oui
<i>D faible type 4.0</i> ou <i>4.3</i> / <i>DAU5</i> (ou <i>DV type 1</i> )	1	oui
<i>D faible type 4.0</i> ou <i>4.3</i> / <i>D faible type 5</i>	1	oui
<i>D faible type 3</i> / <i>Dwt</i>	1	/

\*zygotie non déterminée

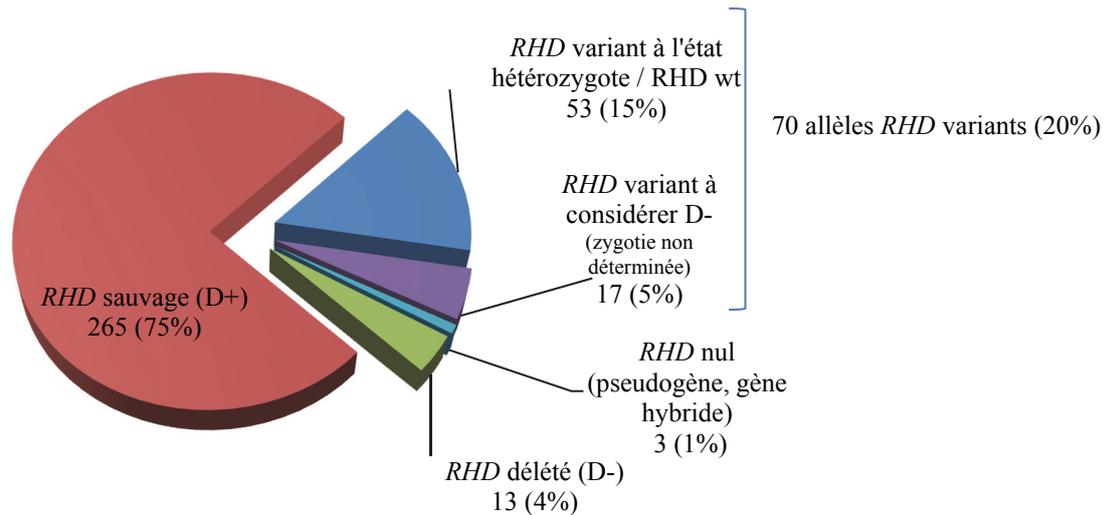


Figure 12 : Répartition des génotypes RHD des drépanocytaires

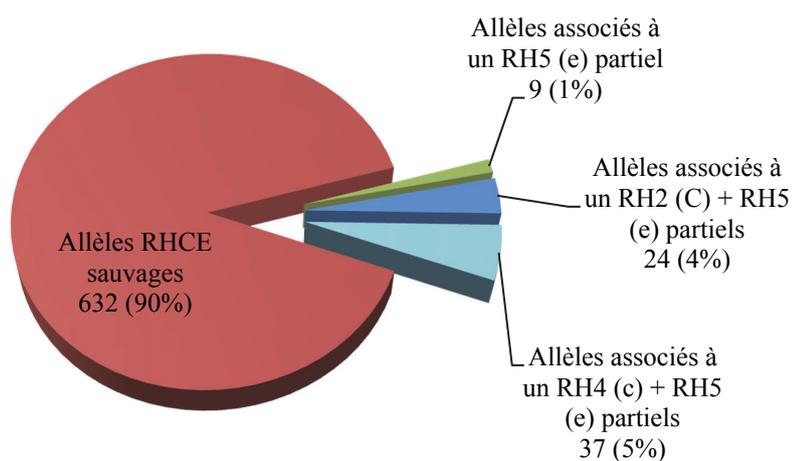
### b. Génotype RHCE

L'étude du gène *RHCE* a permis de retrouver les 4 allèles « classiques » : *RHCE\*01* (*RHCE\*ce*), *RHCE\*02* (*RHCE\*Ce*), *RHCE\*03* (*RHCE\*cE*), *RHCE\*04* (*RHCE\*CE*), ainsi que de nombreux allèles variants. Les principaux variants concernent l'allèle *RHCE\*ce*. Les différents allèles *RHCE* identifiés et leurs fréquences alléliques calculées sont présentés dans le tableau 3 et la figure 13.

De par son caractère non c partiel et non e partiel, l'allèle *RHCE\*48C* (*RHCE\*01.01*) est considéré comme un allèle classique *RHCE\*ce* (*RHCE\*01*) (62,63). Cet allèle est souvent retrouvé dans l'haplotype R<sup>0</sup> (Dce), principalement représenté par la population Africaine.

**Tableau 6 : Allèles RHCE identifiés en technique BioArray et/ou séquençage et fréquences alléliques associées**

Allèles	Nomenclature internationale	Antigène(s) partiel(s)	Fréquence allélique
<i>ce</i> ou <i>ce48C</i>	<i>RHCE*01</i> ou <i>RHCE*01.01</i>	/	43,87%
<i>Ce</i>	<i>RHCE*02</i>	/	20,23%
<i>cE</i>	<i>RHCE*03</i>	/	7,83%
<i>CE</i>	<i>RHCE*04</i>	/	0,14%
<i>ce<sup>S</sup></i> ( <i>ces733</i> )	<i>RHCE*01.20.01</i>	/	18,04%
<i>ce<sup>S</sup>1006</i>	<i>RHCE*01.20.03</i> avec <i>DIIIa-CE(4-7)-D</i> en cis	c, e C, e	0,99% 1,70%
<i>RN</i>	<i>RHCE*02.10.01</i>	C, e	1,56%
<i>ceMO</i>	<i>RHCE*01.07.01</i>	c, e	1,42%
<i>ceAG</i> ( <i>ce254</i> )	<i>RHCE*01.06.01</i>	e	1,14%
<i>ceTI</i>	<i>RHCE*01.02.01</i>	c, e	1,14%
<i>ceTI type 2-like</i>	<i>RHCE*01.20.04.02</i>	c, e	0,71%
<i>ceAR</i>	<i>RHCE*01.04.01</i>	c, e	0,57%
<i>ceEK</i>	<i>RHCE*01.05.01</i>	c, e	0,43%
<i>CeCW</i>	<i>RHCE*02.08.01</i>	C, e	0,14%
<i>ceBI</i> ou <i>ceSM</i>	<i>RHCE*01.08</i> ou <i>RHCE*01.09</i>	e	0,14%



**Figure 13 : Répartition des différents allèles RHCE**

Les différents génotypes RHCE obtenus sont représentés dans le tableau 7.

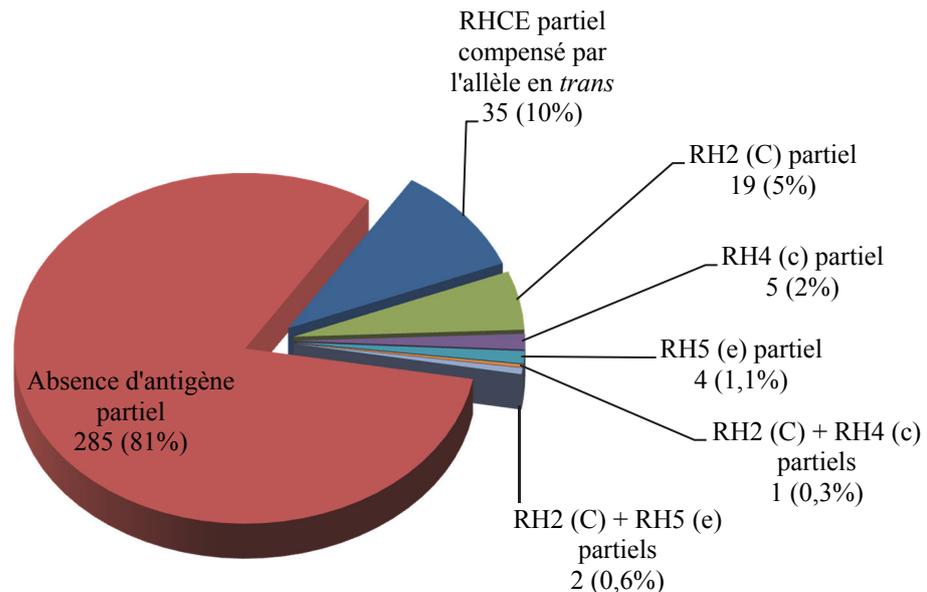
De par son caractère non c partiel et non e partiel, l'allèle  $ce^S(ceS733)$   $RHCE*01.20.01$  est considéré comme un allèle classique  $RHCE*ce$  ( $RHCE*01$ ), c'est pourquoi il n'apparaît pas dans le tableau suivant. Cet allèle a la particularité d'exprimer deux antigènes de faible fréquence RH10 (V) et RH20 (VS) (64).

**Tableau 7 : Répartition des différents génotypes  $RHCE$  dans la population drépanocytaire**

Génotype	Nombre d'individus	Antigène partiel
$(C)ces\ type1 / ce$	10	C
$ce^S1006 / ce$	4	/
$RN / ce$	9	C
$ceAG (ce254) / ce$	8	/
$ceMO / ce$	7	/
$ceTI / ce$	5	/
$ceAR / ce$	3	/
$ceTI\ type\ 2-like / Ce$	3	c
$ceMO / cE$	2	e
$ceEK / ce$	2	/
$ceTI\ type\ 2-like / ce$	2	/
$ce^S1006 / Ce$	1	c
$(C)ces\ type\ 1 / Ce$	1	/
$ce^S1006 / cE$	1	e
$(C)ces\ type\ 1 / cE$	1	C, e
$ce^S1006 / ceMO$	1	/
$ceEK / ceTI$	1	/
$RN / RN$	1	C, e
$ceAR / CeCW$	1	C, c
$ceTI / cE$	1	e
$ceTI / Ce$	1	c
$ceBI (ou\ ceSM) / ce$	1	/

Au total, 66 individus présentent au moins un allèle *RHCE* variant, soit 19% de la cohorte :

- 35 drépanocytaires (10%) possèdent un variant compensé par l'allèle *RHCE* en *trans*,
- tandis que 31 patients (9%) ont un ou plusieurs variants non compensés par l'allèle en *trans* (Figure 14).



**Figure 14 : Phénotypes *RHCE* déduits du génotype**

Parmi les 31 patients ayant un ou plusieurs variants non compensés par l'allèle en *trans* :

- 29 patients ont vu leur consigne transfusionnelle modifiée afin de considérer l'antigène variant comme négatif, soit un changement de consigne transfusionnelle pour 8,3% de la population drépanocytaire étudiée.
- Les 2 patients restants possèdent des polymorphismes soit à l'état homozygote (RN / RN : C et e partiels), soit sur les deux antigènes antithétiques (C et c partiels). Les épitopes manquants ne sont pas compensés, l'interprétation impose une surveillance régulière de la RAI et une transfusion avec des CGR hétérozygotes pour les antigènes partiels en question.

Au total, parmi la population de 351 drépanocytaires : (Figure 15)

- 335 sont testés RH1 (D) positif, 17 possèdent un antigène D partiel déduit du génotype, soit 5%.
- 144 sont testés RH2 (C) positif sans ambiguïté réactionnelle en technique sérologique, 22 individus possèdent un antigène C partiel, soit 15,3%.
- 328 individus sont testés RH4 (c) positif sans ambiguïté réactionnelle en technique sérologique, 6 individus possèdent un antigène c partiel, soit 1,8%.
- 349 individus sont testés RH5 (e) positif en technique sérologique, 6 individus possèdent un allèle e partiel (soit 1,7%), et seulement 2 présentaient un affaiblissement réactionnel (2 ceMO (*RHCE\*ce.07.01*) / cE)

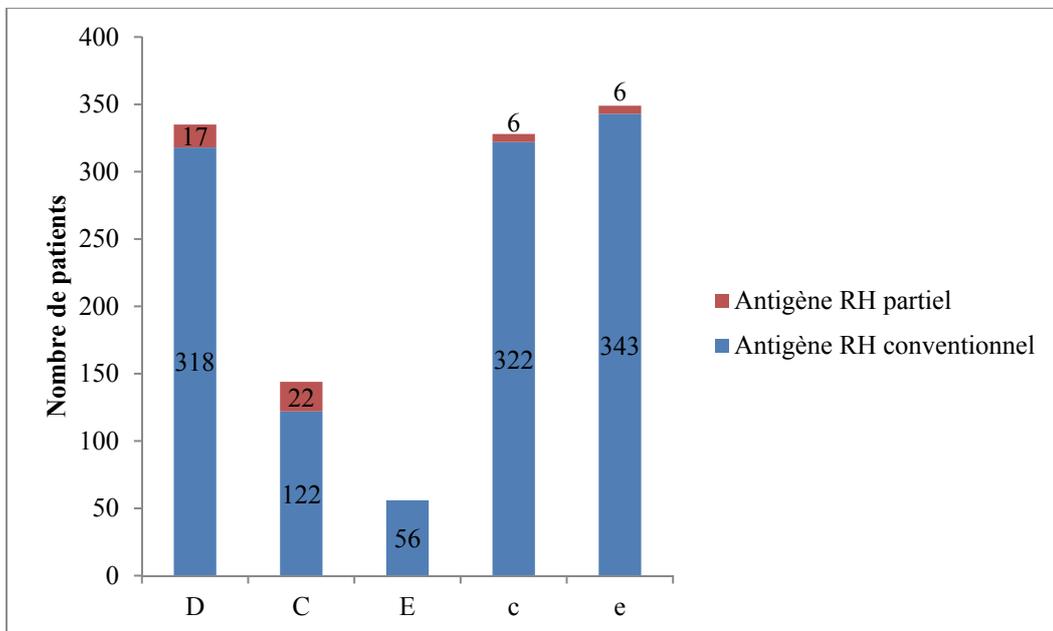


Figure 15 : Proportions d'antigènes RH partiels et conventionnels

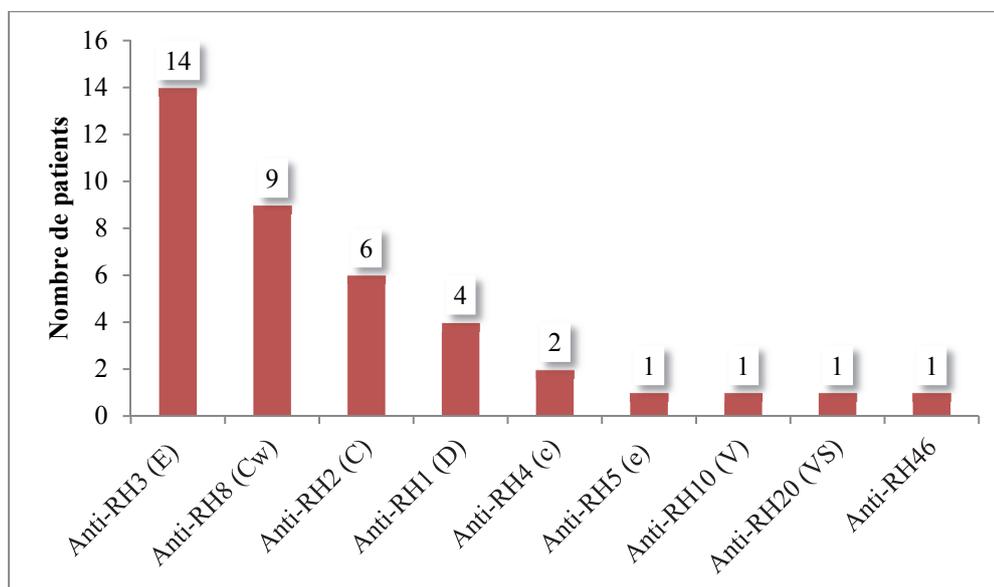
### c. Allo-immunisation

Dans la cohorte de 351 drépanocytaires, 69 individus (soit 19,7%) ont développé un ou plusieurs allo-anticorps. Les différents allo-anticorps identifiés et leur fréquence calculée sont présentés dans le tableau 8.

*Tableau 8 : Allo-anticorps identifiés et leur fréquence associée*

<b>Noms de l'anticorps</b>	<b>Nombre</b>	<b>Fréquence (N = 351)</b>
<b>Auto-Ac</b>	17	4,8%
<b>RH3 (E)</b>	14	4,0%
<b>MNS1 (M)</b>	13	3,7%
<b>MNS3 (S)</b>	11	3,1%
<b>RH8 (Cw)</b>	9	2,6%
<b>LE1 (Lea)</b>	9	2,6%
<b>JK1 (Jka)</b>	7	2,0%
<b>RH2 (C)</b>	6	1,7%
<b>FY1 (Fya)</b>	6	1,7%
<b>KEL3 (Kpa)</b>	6	1,7%
<b>JK2 (Jkb)</b>	5	1,4%
<b>KEL1 (K)</b>	4	1,1%
<b>RH1 (D)</b>	4	1,1%
<b>RH4 (c)</b>	2	0,6%
<b>FY3</b>	2	0,6%
<b>LE2 (Leb)</b>	2	0,6%
<b>MNS2 (N)</b>	2	0,6%
<b>LU1 (Lua)</b>	2	0,6%
<b>YT2 (Ytb)</b>	2	0,6%
<b>RH5 (e)</b>	1	0,3%
<b>RH10 (V)</b>	1	0,3%
<b>RH20 (VS)</b>	1	0,3%
<b>RH46</b>	1	0,3%
<b>FY2 (Fyb)</b>	1	0,3%
<b>MNS5 (U)</b>	1	0,3%
<b>CO2 (Cob)</b>	1	0,3%
<b>KEL7 (Jsb)</b>	1	0,3%
<b>KN</b>	1	0,3%
<b>CHRG</b>	1	0,3%

Parmi les 115 anticorps identifiés, 39 anticorps (soit 34%) sont dirigés contre des antigènes du système RH, développés par 30 patients (Figure 16).



**Figure 16 : Anticorps anti-RH**

L'association des anticorps anti-RH avec les génotypes *RHD* et *RHCE* est représentée dans le tableau 9.

**Tableau 9 : Anticorps anti-RH associés aux génotypes *RHD* et *RHCE***

Génotype RHD	Génotype RHCE	Allo-anticorps anti-RH	Nombre
<i>d</i> délété	<i>ceAG (ce254) / ce</i>	RH1	1
<i>d</i> négatif non exploré	(C) <i>ces de type 1 / ce</i>	RH1	1
<i>D</i> faible type 4.0 ou 4.3 / <i>D</i> faible type 5	<i>ce<sup>S</sup>(733) / ce</i>	RH1	1
<i>d</i> délété	<i>ce / ce</i>	RH1, RH2	1
<i>Dwt*</i>	<i>ceMO / ce</i>	RH10, RH20	1
<i>Dwt*</i>	<i>ce<sup>S</sup>(733) / ce</i>	RH2	1
<i>Dwt*</i>	<i>ce / cE</i>	RH2	1
<i>DAU0 / Dwt</i>	<i>ceMO / ce<sup>S</sup>(733)</i>	RH2, RH3	1
<i>Dwt*</i>	<i>ce<sup>S</sup>(733) / ce</i>	RH2, RH3	1
<i>DAU3 / Dwt</i>	<i>ce / ce</i>	RH2, RH3	1
<i>Dwt*</i>	<i>ceEK / ce</i>	RH3	1
<i>Dwt*</i>	<i>Ce / ce</i>	RH3	2
<i>Dwt*</i>	<i>ce<sup>S</sup>(733) / ce</i>	RH3	1
<i>Dwt*</i>	<i>Ce / Ce</i>	RH3	2
<i>Pseudogène (psi) / Dwt</i>	<i>ce / Ce</i>	RH3	1
<i>D</i> faible type 4.0 ou 4.3 / <i>Dwt</i>	<i>ce<sup>S</sup>(733) / ce</i>	RH3	1
<i>Dwt*</i>	<i>Ce / Ce</i>	RH3, RH4	1
<i>Dwt*</i>	<i>ce<sup>S</sup>(733) / Ce</i>	RH3, RH8	1
<i>Dwt*</i>	<i>Ce / ce</i>	RH3, RH8	1
<i>Dwt*</i>	<i>Ce / Ce</i>	RH4	1
<i>Dwt*</i>	<i>RN / RN</i>	RH5, RH46	1
<i>D</i> faible type 4.0 ou 4.3 / <i>Dwt</i>	<i>ceTI type 2-like / Ce</i>	RH8	1
<i>Dwt*</i>	<i>ce<sup>S</sup>(733) / Ce</i>	RH8	1
<i>Dwt*</i>	<i>Ce / ce</i>	RH8	4
<i>Dwt*</i>	<i>ce<sup>S</sup>(733) / ce</i>	RH8	1

\* : la zygote n'a pas pu être déterminée : l'allèle est soit à l'état hétérozygote avec en trans un gène *RHD* délété ou un allèle nul, soit à l'état homozygote.

Nous avons étudié l'historique transfusionnel des 30 patients drépanocytaires ayant développé des anticorps anti-RH, afin de déterminer les causes éventuelles de leur(s) allo-immunisation(s). Certains patients n'ont jamais été transfusés à l'EFS PACA, d'autres ont été transfusés, toujours avec des CGR respectant leur phénoype RHK. Les allo-immunisations rencontrées peuvent être expliquées par des transfusions de CGR antérieures à leur arrivée dans la région, souvent réalisées dans d'autres pays (Algérie, Portugal, ...) où les protocoles d'appariement des antigènes RH ne sont pas effectués, ou suite à des grossesses suivies hors de la région PACA.

Au total, parmi les 69 individus immunisés toutes spécificités d'anticorps confondues, 10 possèdent un allèle *RHD* variant, 9 possèdent un allèle *RHCE* variant, et 3 individus possèdent à la fois un allèle *RHD* variant et un allèle *RHCE* variant. Ceci est représenté dans le tableau 10.

**Tableau 10 : Association des allèles *RHD* et *RHCE* variants et de leurs allo-anticorps**

Génotype <i>RHD</i>	Génotype <i>RHCE</i>	Allo-anticorps
<i>D</i> faible type 4.0 (ou 4.3) / <i>Dwt</i>	<i>ceTI</i> type 2-like / <i>Ce</i>	JK2 ; RH8
<i>RHD-DIIIa-CE(4-7)-D</i> / <i>Dwt</i>	( <i>C</i> ) <i>ce<sup>S</sup></i> type / <i>ce</i>	MNS2
<i>DAU0</i> / <i>Dwt</i>	<i>ceMO</i> / <i>ce<sup>S</sup></i> ( <i>ce733</i> )	FY1 ; JK1 ; LU1
<i>D</i> faible type 4.0 (ou 4.3) / <i>DAU5</i> (ou <i>DV</i> type 1)	<i>ce</i> / <i>ce</i>	LE1
<i>DAU3</i> / <i>Dwt</i>	<i>ce</i> / <i>ce</i>	MNS3 ; RH2 ; RH3
<i>RHD psi</i> / <i>Dwt</i>	<i>Ce</i> / <i>ce</i>	KN ; RH3
<i>RHD psi</i> / <i>Dwt</i>	<i>ce<sup>S</sup></i> ( <i>ce733</i> ) / <i>ce</i>	MNS1
<i>DIIIa</i> / <i>Dwt</i>	<i>ce<sup>S</sup></i> ( <i>ce733</i> ) / <i>ce</i>	JK2 ; MNS3
<i>D</i> type 4.0 (ou 4.3) / <i>D</i> faible type 5	<i>ce<sup>S</sup></i> ( <i>ce733</i> ) / <i>ce</i>	KEL7 ; RH1**
<i>D</i> faible type 4.0 (ou 4.3) / <i>Dwt</i>	<i>ce<sup>S</sup></i> ( <i>ce733</i> ) / <i>ce</i>	RH3
<i>Dwt</i> *	<i>RN</i> / <i>RN</i> ( <i>RH</i> : -46)	RH46 ; RH5
<i>Dwt</i> *	<i>ce<sup>S</sup></i> ( <i>ce733</i> ) / <i>ceMO</i>	LE1
<i>d</i> délété	<i>ceAG</i> ( <i>ce254</i> ) / <i>ce</i>	RH1**
<i>Dwt</i> *	<i>ceMO</i> / <i>ce</i>	CO2 ; KEL3
<i>Dwt</i> *	<i>ceEK</i> / <i>ce</i>	RH3
<i>d</i> négatif non exploré	( <i>C</i> ) <i>ces</i> type 1 / <i>ce</i>	MNS1 ; RH1**

\* : la zygote n'a pas pu être déterminée : l'allèle est soit à l'état hétérozygote avec en trans un gène *RHD* délété ou un allèle nul, soit à l'état homozygote.

\*\* non transfusé à l'EFS PACA

#### d. Transfusion

D'après les données des EFS de la région PACA-Corse, 120 patients sur les 351 de la cohorte n'ont jamais été transfusés entre 2011 et 2020.

231 patients drépanocytaires ont été transfusés en CGR : 17 ont été transfusés uniquement par des CGR de phénotype R<sup>0</sup> (phénotype africain Dccee), 103 ont été transfusés uniquement par des CGR D positif ou D négatif (phénotype européen), et 111 ont été transfusés à la fois par des CGR de phénotype R<sup>0</sup> et des CGR de phénotype européen.

Parmi les 231 drépanocytaires transfusés, 52 patients ont développé des allo-anticorps :

- 1 seul patient a été transfusé uniquement avec des CGR issus de donneurs ayant un phénotype R<sup>0</sup> ; il a développé un anti-LE1.
- 23 patients ont été transfusés uniquement avec des CGR issus de donneurs de phénotype européen, ils ont développé les allo-anticorps décrits dans le tableau 11.
- 28 patients ont reçu à la fois des CGR de phénotype R<sup>0</sup> et de phénotype européen.

**Tableau 11 : Allo-anticorps identifiés et nombre de CGR de phénotype européen transfusés entre 2011 et 2020**

<b>Allo-anticorps</b>	<b>Nombre de CGR européens transfusés</b>
<b>RH4</b>	1138
<b>LE2, MNS3</b>	1028
<b>KEL3, LE1</b>	898
<b>KEL3</b>	890
<b>RH3</b>	352
<b>RH1</b>	324
<b>RH3</b>	212
<b>RH3, RH4</b>	212
<b>RH8</b>	78
<b>LE1</b>	40
<b>RH3</b>	28
<b>JK2</b>	26
<b>JK1</b>	20
<b>RH46, RH5</b>	18
<b>FY2, RH8</b>	16
<b>MNS1</b>	14
<b>RH1, RH2</b>	12
<b>KN, RH3</b>	12
<b>LE1</b>	12
<b>RH8</b>	8
<b>JK1, KEL1, MNS3</b>	8
<b>MNS1</b>	6
<b>JK2, MNS3</b>	6

Dans la population drépanocytaire transfusée étudiée, 103 ont un phénotype « berbère » ( $R^0r$ ), c'est-à-dire un phénotype Dccee, dont 17 ont développé des allo-anticorps. Parmi ces 17 patients :

- 14 ont été transfusés à la fois avec des CGR issus de donneurs ayant un phénotype  $R^0$ , correspondant plutôt à un phénotype africain, et à la fois avec des CGR issus de donneurs D négatif, correspondant plutôt à un phénotype européen.
- 1 patient a été transfusé uniquement avec des CGR issus de donneurs ayant un phénotype  $R^0$ , il a tout de même développé un anticorps anti-LE1.
- 2 patients ont été transfusés uniquement avec des CGR issus de donneurs D négatif (phénotype européen), ils ont alors développé un anti-LE1 pour l'un, et un anti-MNS1 pour l'autre.

## V. Discussion

### 1. Séquençage du gène *RHD* des génotypes « *RHD* sauvages » rendus par BioArray

Nous avons réalisé un séquençage du gène *RHD* chez 42 patients pour lesquels le kit RHD BeadChip n'avait identifié aucun polymorphisme, aboutissant à des phénotypes D positifs. 26 de ces patients ont été identifiés avec un gène *RHD* sauvage, tandis que 16 présentaient des polymorphismes du gène *RHD*.

Nous avons identifiés 11 patients porteurs d'un *DAU-0* (*RHD\*10.00*), ce polymorphisme est connu et exprime un phénotype D normal avec une densité antigénique > 15 000 (65). À ce jour, aucune immunisation anti-D n'a été rapportée chez les personnes porteuses de ce polymorphisme. L'allèle *DAU-0* est répandu dans les populations d'origine Africaine, son nom dérive d'ailleurs de « D d'origine Africaine » en allemand « D afrikanischen Ursprungs » (66).

Nous avons mis en évidence un allèle *DAU-0.1* (*RHD\*10.00.01*) chez un seul patient. Ce polymorphisme contient la même mutation que le polymorphisme *DAU-0* (1136 C>T) avec une deuxième mutation dans l'exon 4 (579 G>A) qui correspond à une mutation silencieuse. En effet l'acide aminé concerné est l'acide glutamique et il n'est pas modifié. L'allèle *DAU-0.1* est à considérer comme l'allèle *DAU-0*, exprimant un phénotype D normal et n'apportant pas d'immunisation anti-D (67).

Nous n'avons pas réussi à amplifier l'exon 10 du gène *RHD* chez un des patients drépanocytaires, nous avons conclu à une délétion de l'exon 10 à l'état homozygote ou avec une délétion du gène *RHD* en *trans*. Aucun polymorphisme n'a été révélé dans les 9 autres exons du gène *RHD*. Cette délétion n'a pas pu être détectée lors du séquençage par la technique BioArray RHD Beadchip car elle n'étudie pas les exons 8 et 10 du gène *RHD*. Dans la population caucasienne, la délétion de l'exon 10 a été décrite chez environ 3% des personnes présentant une ambiguïté sérologique au niveau de l'antigène D. Fichou *et al.* (68) suggèrent que la suppression de l'exon 10 conduirait au remplacement des huit derniers acides aminés de la protéine RhD de type sauvage par quatre autres acides aminés. En d'autres termes, la protéine mutante différerait de la protéine de type sauvage à l'extrémité C-terminale. Etant donné que les 27 derniers acides aminés de la protéine sont situés au niveau intracellulaire, et que plusieurs mutations faux-sens situées dans ce segment intracellulaire C-terminal sont associées à un D faible (54), il semblerait que la délétion de

l'exon 10 représente un allèle D faible plutôt qu'un D partiel. De plus, aucun des patients porteurs de cette délétion n'était connu pour avoir développé un allo-anticorps anti-D. Cependant, il est préférable de rester prudent et de surveiller une éventuelle allo-immunisation anti-D chez ce patient, avec des RAI régulières. En effet, il existe un consensus qui permet de considérer les D faibles types 1, 2 et 3 comme des antigènes D positifs (69), mais il n'existe pas de consensus semblable pour une délétion de l'exon 10 dans le gène *RHD*.

Dans notre cas, la réaction au niveau de l'antigène D en technique sérologique ne montrait pas d'ambiguïté, elle était positive à 4+. On peut se poser la question de la sensibilité des différents réactifs utilisés en technique sérologique sur les automates de détermination de groupes sanguins (70). En effet, quels épitopes les clones d'anticorps monoclonaux utilisés comme réactifs reconnaissent-ils sur l'antigène D, et au niveau de quels exons du gène *RHD* sont codés ces épitopes ?

Nous avons découvert 3 nouveaux allèles à l'état hétérozygote chez trois patients différents :

- Une substitution d'un nucléotide G par un A en position 255 dans l'exon 2, qui conduit à une mutation silencieuse, l'acide aminé concerné est une Alanine
- Une substitution d'un nucléotide T par un C en position 384 dans l'exon 3, qui conduit également à une mutation silencieuse, l'acide aminé est l'Acide Aspartique
- Et une substitution d'un nucléotide C par un T en position 541 dans l'exon 4, conduisant aussi à une mutation silencieuse, l'acide aminé concerné est la Leucine. Cet individu possède aussi une substitution intronique : IVS5 +12g>a, la colinéarité allélique n'est pas déterminée.

Ces trois mutations silencieuses n'impactent pas la protéine RhD, on peut donc les considérer comme des allèles D positifs, ce qui rend l'immunisation anti-D chez ces patients peu probable (67). De plus, ces 3 polymorphismes sont nouveaux mais sont à l'état hétérozygote face à un allèle D sauvage, ils n'ont donc pas d'intérêt transfusionnel.

Nous avons mis en évidence plusieurs polymorphismes dans les régions non codantes du gène *RHD* : introns 1, 3, 4, 5, 8 et région 3' UTR. La variation intronique la plus fréquemment retrouvée est la substitution G>C en position -29 dans l'intron 1, présente chez 20 patients. Une substitution C>T en position -31 dans l'intron 8 a été trouvée chez 18 drépanocytaires. Ces deux polymorphismes sont fréquents et n'ont pas d'impact sur la protéine RhD (71).

Une association de deux substitutions dans l'intron 3 a été mise en évidence chez 13 personnes : C>T en position +117 et A>G en position +124. A ce jour, toutes les mutations introniques responsables de phénotypes D variants sont situées près des sites d'épissage dans le gène *RHD*, entre les positions 1 et 38 des jonctions exon – intron (72,73). Von Zabern et al. (73) rapportent une délétion de 4 paires de bases aux positions -38 à -41 avant le premier nucléotide de l'exon 6 (IVS5-38delCTCT) qui n'a aucune influence sur l'expression de l'antigène D. Dans notre étude, les substitutions en position +117 et +124 semblent trop éloignées de la jonction intron – exon pour être responsables d'une modification d'expression de l'antigène D.

Enfin, les autres mutations retrouvées dans les régions non codantes sont restreintes à un seul échantillon chacune.

Le principal risque lors de la transfusion de CGR D positifs chez des patients ayant un D faible ou partiel est l'allo-immunisation anti-D. La technique BioArray Beadchip pour le génotypage systématique des nouveaux patients drépanocytaires est efficace pour détecter les polymorphismes les plus connus, mais elle présente l'inconvénient de ne rechercher qu'un panel défini de variants, ce qui laisse penser que d'éventuels allèles rares et nouveaux ayant un intérêt transfusionnel ne soient pas détectés. D'après les résultats obtenus dans notre étude, nous pouvons supposer que le kit RHD BioArray est suffisant pour détecter les allèles d'intérêt transfusionnel dans la population drépanocytaire. En effet, nous n'avons mis en évidence aucun nouveau polymorphisme susceptible de produire un antigène D partiel, et ainsi une faible probabilité pour nos patients de développer un allo-anticorps anti-D.

## 2. Analyse rétrospective des génotypes *RHD* / *RHCE* des patients drépanocytaires issus de la région PACA – Corse

La population étudiée dans cette étude est constituée de 351 patients drépanocytaires suivis dans la région PACA – Corse. Le phénotype RH le plus fréquemment retrouvé est le phénotype D+C-E-c+e+ (43,3% de notre population), il correspond au phénotype « berbère » qui est le phénotype ancestral descendant de l'Africain.

Sur 335 patients ayant un phénotype D positif, nous avons identifié 17 patients (5,1%) porteurs d'un antigène D partiel ; 22 (15,3%) des 144 patients C positifs possèdent un antigène RH2 partiel ; 6 (1,8%) des 328 patients c positifs possèdent un antigène RH4 partiel ; et 6 (1,7%) des 349 patients e positifs possèdent un antigène RH5 partiel. Ces pourcentages sont comparés à ceux d'autres études françaises dans le tableau 12.

**Tableau 12 : Prévalence des antigènes RH partiels chez les patients drépanocytaires en France**

	Notre étude	Tournamille <i>et al.</i> (74)	Silvy <i>et al.</i> (75)	Floch <i>et al.</i> (5)		
Année de publication	/	2010	2014	2018		
Nombre de patients inclus	N = 351	N = 177	N = 403	N = 466	N = 394	N = 221
Région (EFS)	PACA – Corse	Ile-de-France	Ile-de-France et PACA – Corse	Ile-de-France	Guadeloupe	Guyane
<b>RH1 (D)</b>	5,1%	NA	8,4%	10,4%	12,3%	15,0%
<b>RH2 (C)</b>	15,3%	27,7%	20,8%	37,8%	16,7%	13,3%
<b>RH3 (E)</b>	0%	NA	NA	0%	0%	0%
<b>RH4 (c)</b>	1,8%	NA	NA	1,6%	0,5%	1,4%
<b>RH5 (e)</b>	1,7%	NA	3,5%	5,6%	6,4%	5,9%

NA : non applicable

Nos pourcentages d'antigènes variants se rapprochent de ceux de Silvy *et al.* (75), ce qui peut s'expliquer par le fait qu'ils aient inclus des patients drépanocytaires issus de la région PACA – Corse dans leur étude, comme notre population.

Les antigènes partiels RH2 (C) semblent être particulièrement répandus en France métropolitaine, tandis que les antigènes partiels RH1 (D) sont plus fréquents en Guadeloupe et en Guyane française.

Dans l'étude de Tournamille *et al.* (74), les patients drépanocytaires résidant en Ile-de-France sont connus pour être originaires des Antilles et d'Afrique de l'Ouest et centrale. Leur pourcentage de variants de l'antigène RH2 (C) (27,7%) est bien supérieur à celui de notre population (15,3%), avec notamment l'allèle (*C*)*ces de type 1* à une fréquence de 24,3% et l'allèle *RN* à une fréquence de 7,3%.

D'après l'étude la plus récente réalisée par Floch *et al.* (5), la prévalence des antigènes RH2 partiels varie considérablement dans les différentes régions françaises couvertes par le laboratoire d'immuno-hématologie moléculaire de Créteil. La différence de prévalence des haplotypes *RN* et (*C*)*ces de type 1* chez les patients drépanocytaires de phénotype RH2 (C) est particulièrement frappante : 11,8% en région parisienne contre 1,1% en Guadeloupe et 1,6% en Guyane française pour *RN* et 21,5% en région parisienne contre 18,8% en Guadeloupe et 11,5% en Guyane française pour (*C*)*ces de type 1*. Ces différences découlent des spécificités de chaque région géographique, avec des différences de flux migratoires.

Dans la population drépanocytaire de Philadelphie (76), 5,8% présentent un haplotype (*C*)*ces de type 1* et seulement 0,2% présentent un haplotype *RN*.

Une étude réalisée par Silvy *et al.* (77) chez des individus d'origine Afro-caribéenne nés en Martinique, et d'origine Comorienne nés sur l'Île de Grande Comore montre une fréquence de l'allèle (*C*)*ces de type 1* de 2,64% et 7,33% respectivement.

Dans les populations d'Afrique Subsaharienne, l'allèle (*C*)*ces de type 1* est présent entre 2,7% et 3,5% selon les différentes ethnies du Congo, tandis que l'allèle *RN* n'a pas été retrouvé (8).

Chez les drépanocytaires de phénotype RH2 (C) de notre cohorte, les fréquences des haplotypes *RN* et (*C*)*ces de type 1* sont respectivement de 7,6% et 8,3%. Ces fréquences diffèrent de celles de certaines régions citées précédemment, nous pouvons supposer que les drépanocytaires en PACA – Corse n'ont pas les mêmes origines que ceux de la région parisienne ou des États-Unis, et seraient plutôt d'origine Comorienne.

Un individu de notre étude présente un allèle *RN* à l'état homozygote. Il en résulte le phénotype rare RH : -46, et des antigènes RH2 (C) et RH5 (e) partiels. Ce patient est immunisé et possède un allo-anticorps anti-RH46, ainsi qu'un allo-anticorps anti-RH5. Il est alors nécessaire de transfuser ce patient uniquement avec des CGR rares RH : -46. Ce patient est enregistré au centre national de référence pour les groupes sanguins (CNRGS) dans la base

de données des phénotypes érythrocytaires rares, pour prévoir un programme de congélation de ses GR.

Les drépanocytaires provenant de la région parisienne (Île-de-France) présentent une diversité génétique élevée liée aux différentes vagues d'immigration récentes. Ceux de Guyane française (Amérique du Sud) possèdent la plus grande proportion d'ascendance Africaine de tous les peuples africains d'Amérique (78), en raison de siècles d'isolement génétique suite aux déportations d'esclaves dans les colonies américaines entre le 16<sup>ème</sup> et le 19<sup>ème</sup> siècle. Enfin les drépanocytaires de Guadeloupe (Caraïbes), présentent plutôt des ascendances européennes et amérindiennes en raison de brassages génétiques suite à l'abolition de l'esclavage. Dans l'étude de Reid *et al.* (79) réalisée chez des donneurs de sang afro-américains de New-York et des patients drépanocytaires d'Oakland, la fréquence des allèles RH ne semble pas différer à travers les États-Unis.

Au Brésil, Sippert *et al.* (80) ont étudié les variants du système RH chez 48 patients brésiliens-africains atteints de drépanocytose ayant développé des allo-anticorps. Les allèles *RHD* les plus fréquemment retrouvés sont *RHD\*<sup>DAR</sup>*, *RHD\*D faible type 4.0*, *RHD\*<sup>DIIIa</sup>*, et *RHD\*<sup>DAU0</sup>*. Dans notre population, les allèles *RHD\*<sup>DIIIa</sup>* et *RHD\*D faible type 4.0* se situent également parmi les plus fréquents (1,6% et 1,4%). Cependant l'allèle *RHD\*<sup>DAR</sup>* n'est retrouvé qu'à 0,6% et l'allèle *RHD\*<sup>DAU0</sup>* qu'à 0,1%. Concernant ce dernier, un biais est présent car il ne fait pas partie du panel de variants recherchés par la technique BioArray, et étant considéré comme un antigène D normal en France (65), on ne le recherche pas chez les patients drépanocytaires.

Concernant les allèles variants *RHCE* chez les brésiliens, les plus fréquents sont *RHCE\*<sup>ceS (1006)</sup>*, *RHCE\*<sup>ce48</sup>*, *RHCE\*<sup>ce733G</sup>*, *RHCE\*<sup>ceAR</sup>* et *RHCE\*<sup>ceTI</sup>*. Dans notre population, nous avons considéré l'allèle *RHCE\*<sup>ce48</sup>* indifféremment de l'allèle *RHCE\*<sup>ce</sup>* classique, estimant qu'il ne produit pas d'antigène partiel et ne conduit pas à une allo-immunisation (62,63). Nous savons cependant qu'il est très fréquent dans la population issue de PACA – Corse, avec une fréquence allélique de 14,1%. Les allèles *RHCE\*<sup>ce733G</sup>* et *RHCE\*<sup>ceS (1006)</sup>* font également partie des allèles les plus fréquents dans notre population avec respectivement 18,07% et 2,7% de fréquence allélique. Par contre les allèles

*RHCE\*ceAR* et *RHCE\*ceTI* ne font pas partie des plus fréquents dans la région PACA – Corse.

Dans notre étude, certains drépanocytaires sont hétérozygotes composites, aboutissant à des phénotypes rares.

Un patient drépanocytaire de notre cohorte possède un allèle *ceAR* (*RHCE\*ce.04.01*) face à un allèle *CeCW* (*RHCE\*Ce.08.01*), il possède à la fois un allèle RH2 (C) partiel et un allèle RH4 (c) partiel. Les épitopes manquants ne sont pas compensés et ce phénotype impose une surveillance régulière de la RAI. Ce patient est régulièrement transfusé avec des CGR de phénotype hétérozygote (RH2 (C) / RH4 (c)) et n'est pas immunisé à ce jour.

Deux individus possèdent deux variants différents du gène *RHCE\*ce* :

- 1 allèle *ce<sup>S</sup>(1006)* (*RHCE\*ce.20.03*) avec un allèle *ceMO* (*RHCE\*ce.07.01*) en *trans*
- 1 allèle *ceEK* (*RHCE\*ce.05.01*) avec un allèle *ceTI* (*RHCE\*ce.02.02*) en *trans*

Chaque individu possède alors deux variants différents de l'antigène RH4 (c) et deux variants différents de l'antigène RH5 (e). Ce sont des situations à risque inconnu d'allo-immunisation, mais on peut considérer que les deux variants de chaque antigène se « complètent » au niveau des épitopes manquants, ce qui permettrait à ces individus de connaître la totalité des épitopes des antigènes RH4 (c) et RH5 (e) et de ne pas s'immuniser. Ils ne nécessitent pas d'adaptation de leur consigne transfusionnelle. Cependant, il est tout de même nécessaire de surveiller l'apparition d'allo-anticorps anti-RH4 (c) ou anti-RH5 (e) par des RAI régulières.

En France, l'allèle *ce<sup>S</sup>(ces733)* (*RHCE\*01.20.01*) n'est pas considéré comme exprimant des antigènes partiels (5). Il est caractérisé par l'absence d'un antigène de haute fréquence RH :-31 (hr<sup>B-</sup>) et l'expression des antigènes RH10 (V+) et RH20 (VS+). Ces deux antigènes sont de faible fréquence dans la population européenne (<1%), tandis que dans la population africaine, l'antigène RH10 (V) est retrouvé chez 30% des personnes en moyenne et RH20 (VS) chez 30 à 70% (43,64,81), ce qui est expliqué par la fréquence de l'allèle *ce<sup>S</sup>(ces733)*. Dans notre population de drépanocytaires issus de la région PACA – Corse, la fréquence de cet allèle est de 18%, comme chez les drépanocytaires afro-américains

d'Oakland (79). Dans la population drépanocytaire afro-brésilienne, l'allèle  $ce^S$ (ces733) a une fréquence de 23,8% (82), tandis que dans les populations Afro-caribéennes et Comoriennes, cet allèle a une fréquence de 17,82% et 20,38% respectivement (77), et au Congo, la fréquence de l'allèle  $ce^S$ (ces733) varie de 12,6 à 18,2% selon les différentes ethnies (8).

Les antigènes RH10 (V+) et RH20 (VS+) posent des problématiques spécifiques en contexte de transfusion intrapopulationnelle. En effet, malgré une prévalence largement supérieure à 1% dans les populations Africaines, ces antigènes sont considérés comme à faible fréquence en raison de leur rareté dans la population générale des donneurs, plutôt d'origine Européenne. Ces antigènes de faible fréquence peuvent induire une allo-immunisation et la production d'anticorps spécifiques. L'allo-immunisation contre ces antigènes de faible fréquence n'est pas facile à identifier, elle ne peut être détectée que dans une recherche approfondie d'anticorps, comme suite à une DHTR, une poly-immunisation ou une épreuve de compatibilité au laboratoire positive, car ces antigènes ne sont pas présents sur les GR des panels utilisés en routine dans les RAI.

La prévalence des antigènes varie selon les origines ethniques et les taux d'exposition dépendent de la fréquence à laquelle les patients drépanocytaires sont transfusés avec des CGR de donneurs d'origines géographiques différentes. L'amélioration de la prise en charge des patients drépanocytaires incite à respecter leur phénotype étendu (FY, JK, MNS) notamment lorsqu'ils sont allo-immunisés. Cela implique d'utiliser des CGR de donneurs Africains (transfusions intra-ethniques) et les expose aux antigènes spécifiques des Africains, tandis que ce risque est considéré comme nul pour les CGR de donneurs Caucasiens. La fréquence à laquelle les drépanocytaires sont transfusés avec des CGR de donneurs Africains est estimée à 11,5% en France métropolitaine (83).

C'est le cas pour un patient drépanocytaire de notre cohorte qui a développé des anticorps anti-RH10 (V) et anti-RH20 (VS). Ce patient ne possède pas ces antigènes et a été transfusé avec plus de 130 CGR de phénotype « berbère » issus de donneurs Africains, à la suite desquels il s'est allo-immunisé.

Dans notre étude, 30 patients drépanocytaires ont développé des allo-anticorps anti-RH. Parmi eux, 4 patients ont développé un anti-RH1 (D) : 3 sont D négatifs, et 1 est hétérozygote composite avec deux allèles *RHD* variants. La consigne transfusionnelle de ces patients exige des CGR D négatifs, plus fréquemment retrouvés chez les Européens (15%) que chez les Africains (8%). Par conséquent, la transfusion de CGR D négatifs chez des individus drépanocytaires peut augmenter le risque d'allo-immunisation à d'autres antigènes ( $Fy^a$ ,  $Jk^b$  et S), qui sont plus courants chez les Caucasiens que chez les Africains. Il est aussi possible d'utiliser des CGR de donneurs qui possèdent exactement le même génotype *RHD* qu'eux, mais cela nécessite le génotypage RH d'un grand nombre de donneurs d'ascendance Africaine.

Parmi les individus allo-immunisés RH, 9 patients ont développé un anticorps anti-RH8 ( $C^w$ ). Cet antigène est un antigène de faible fréquence, présent chez environ 2% de la population générale (84) et n'est généralement pas recherché sur les CGR à transfuser, on ne peut donc pas empêcher une allo-immunisation anti-RH8. De plus, cet anticorps fait partie des anticorps naturels comme l'anti-RH3 (E), l'anti-P1, l'anti-M, ce qui signifie que les individus peuvent le développer suite au contact avec l'antigène dans l'environnement. Si un individu développe un anti-RH8, la consigne transfusionnelle demande une épreuve de compatibilité au laboratoire avant la délivrance des CGR.

Au total, le génotypage *RHD* et *RHCE* a révélé que 103 drépanocytaires (29%) de notre étude présentaient au moins un allèle variant, ce qui a permis d'adapter la consigne transfusionnelle de 46 patients drépanocytaires en antigène(s) négatif(s), soit 13,1% de notre cohorte (17 adaptations de consigne pour *RHD* et 29 adaptations de consigne pour *RHCE*).

La possibilité d'identifier les variants *RHD* et *RHCE* et différencier les antigènes partiels à l'aide des méthodes moléculaires a amélioré la pratique de la transfusion sanguine, en particulier pour les patients atteints de drépanocytose. A l'avenir, l'amélioration des techniques de biologie moléculaire et l'augmentation de la facilité d'accès au génotypage RH pourrait permettre de tenir compte des génotypes à la fois du receveur et du donneur pour apparier les CGR à transfuser et finalement, réduire l'allo-immunisation chez les patients drépanocytaires.

## Conclusion

Les gènes *RHD* et *RHCE* sont hautement polymorphes et codent pour le plus complexe des 38 systèmes de groupes sanguins humains. Les tests sérologiques standards ne distinguent pas toujours les antigènes RH variants et ces polymorphismes peuvent contribuer à l'allo-immunisation RH chez les patients atteints de drépanocytose. A ce jour, il existe plus de 140 allèles à l'origine d'un D faible et plus de 100 allèles à l'origine d'un D partiel référencés dans la base de données Rhésus (71), et plus de 140 allèles *RHCE* variants répertoriés par l'ISBT, ce qui témoigne de la complexité du système RH.

La stratégie française de génotypage *RHD* systématique par technique BioArray® chez tout patient drépanocytaire semble suffisante pour détecter les allèles d'intérêt transfusionnel. En effet, dans notre étude, suite au séquençage des 10 exons du gène *RHD* chez 42 patients ayant un « probable D sauvage », aucun polymorphisme d'intérêt transfusionnel n'a été mis en évidence.

L'étude de la population drépanocytaire de PACA-Corse a montré que 29% des individus présentent au moins un allèle variant, dont 5,1% d'allèles RH1 (D) partiels et 15,3% d'allèles RH2 (C) partiels. La consigne transfusionnelle a été adaptée chez 13,1% des patients grâce au génotypage systématique *RHD* et *RHCE*. Celui-ci est donc justifié dans la population drépanocytaire pour optimiser la prise en charge transfusionnelle de ces patients.

Les méthodes moléculaires sont de plus en plus utilisées pour compléter les méthodes sérologiques de prédiction du groupe sanguin et elles ne cessent d'évoluer, notamment avec l'arrivée du séquençage de nouvelle génération (NGS) qui est capable de fournir une vue globale des variations alléliques dans plusieurs gènes. Il peut déterminer la zygote des allèles *RHD* et *RHCE*, la présence d'antigène de faible fréquence ou l'absence d'antigène de haute fréquence (85). Le NGS serait également une méthode intéressante pour étudier d'autres groupes sanguins (Kell, Dombrock, ...) ayant un intérêt transfusionnel dans les populations drépanocytaires. Dans une société dont la multi-ethnicité s'accroît, on pourrait envisager le génotypage systématique des donneurs et des receveurs, notamment d'origine Africaine, afin d'instaurer un appariement au niveau moléculaire pour contribuer à réduire d'avantage le risque d'allo-immunisation en facilitant la sélection de CGR hautement compatibles.

## Bibliographie

1. Dépistage néonatal de la drépanocytose et filières d'organisation des soins [Internet]. Available from: <https://www.larevuedupraticien.fr/article/depistage-neonatal-de-la-drepanocytose-et-filieres-dorganisation-des-soins>
2. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sick cell disease. *The Lancet*. 2010 Dec 11;376(9757):2018–31.
3. Habibi A, Mekontso-Dessap A, Guillaud C, Michel M, Razazi K, Khellaf M, et al. Delayed hemolytic transfusion reaction in adult sick cell disease: presentations, outcomes, and treatments of 99 referral center episodes. *Am J Hematol*. 2016;91(10):989–94.
4. Fasano RM, Booth GS, Miles M, Du L, Koyama T, Meier ER, et al. Red blood cell alloimmunization is influenced by recipient inflammatory state at time of transfusion in patients with sick cell disease. *Br J Haematol*. 2015 Jan;168(2):291–300.
5. Floch A, Tournamille C, Chami B, Pirenne F. Genotyping in Sick Cell Disease Patients: The French Strategy. *Transfus Med Hemotherapy*. 2018 Jul;45(4):264–70.
6. Table of blood group systems. ISBT.pdf [Internet]. Available from: [https://www.isbtweb.org/fileadmin/user\\_upload/Table\\_of\\_blood\\_group\\_systems\\_v6.0\\_6th\\_August\\_2019.pdf](https://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Table_of_blood_group_systems_v6.0_6th_August_2019.pdf)
7. Urbaniak SJ, Robertson AE. A successful program of immunizing Rh-negative male volunteers for anti-D production using frozen/thawed blood. *Transfusion (Paris)*. 1981 Feb;21(1):64–9.
8. Granier T, Beley S, Chiaroni J, Bailly P, Silvy M. A comprehensive survey of both RHD and RHCE allele frequencies in sub-Saharan Africa. *Transfusion (Paris)*. 2013 Nov 1;53(11pt2):3009–17.
9. Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sick cell disease. *The Lancet*. 2017 Jul 15;390(10091):311–23.
10. HAS. PNDS Syndromes drépanocytaires majeurs de l'adulte. 2010.pdf.
11. Bardakdjian-Michau J, Dhondt J-L, Ducrocq R, Galactéros F, Guyard A, Huchet F-X, et al. [Good practices for the study of hemoglobin]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2003 Aug;61(4):401–9.
12. HAS. Dépistage néonatal de la drépanocytose en France [Internet]. Haute Autorité de Santé. Available from: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_1728538/fr/depistage-neonatal-de-la-drepanocytose-en-france](https://www.has-sante.fr/jcms/c_1728538/fr/depistage-neonatal-de-la-drepanocytose-en-france)
13. Itano HA. Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobin. *Arch Biochem Biophys*. 1953 Nov;47(1):148–59.
14. Mario N, Sala N. Diagnostic biologique des hémoglobinopathies. *Rev Francoph Lab*. 2016 Apr 1;2016(481):35–47.
15. Chou ST. Transfusion therapy for sick cell disease: a balancing act. *Hematology*. 2013 Dec 6;2013(1):439–46.
16. Gluckman E, Cappelli B, Bernaudin F, Labopin M, Volt F, Carreras J, et al. Sick cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2017 Mar 16;129(11):1548–56.
17. Yawn BP, John-Sowah J. Management of Sick Cell Disease: Recommendations from the 2014 Expert Panel Report. *Am Fam Physician*. 2015 Dec 15;92(12):1069–76.
18. Danielson CFM. The Role of Red Blood Cell Exchange Transfusion in the Treatment and Prevention of Complications of Sick Cell Disease. *Ther Apher*. 2002;6(1):24–31.
19. Chou ST, Alsawas M, Fasano RM, Field JJ, Hendrickson JE, Howard J, et al. American Society of Hematology 2020 guidelines for sick cell disease: transfusion support. *Blood Adv*. 2020 Jan 28;4(2):327–55.
20. Dessap AM, Pirenne F, Razazi K, Moutereau S, Abid S, Brun-Buisson C, et al. A diagnostic nomogram for delayed hemolytic transfusion reaction in sick cell disease. *Am J Hematol*. 2016;91(12):1181–4.
21. Thein SL, Pirenne F, Fasano RM, Habibi A, Bartolucci P, Chonat S, et al. Hemolytic transfusion reactions in sick cell disease: underappreciated and potentially fatal. *Haematologica*. 2020 Mar;105(3):539–44.
22. Zimring JC, Hendrickson JE. The role of inflammation in alloimmunization to antigens on transfused red blood cells. *Curr Opin Hematol*. 2008 Nov;15(6):631–5.

23. Yazdanbakhsh K, Ware RE, Noizat-Pirenne F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. *Blood*. 2012 Jul 19;120(3):528–37.
24. Garratty G. Autoantibodies induced by blood transfusion. *Transfusion (Paris)*. 2004;44(1):5–9.
25. Levine P, Stetson RE. An unusual case of intra-group agglutination. *J Am Med Assoc*. 1939 Jul 8;113(2):126–7.
26. Landsteiner K, Wiener AS. An Agglutinable Factor in Human Blood Recognized by Immune Sera for Rhesus Blood. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1940 Jan 1;43(1):223–223.
27. Landsteiner K, Wiener AS. Studies on an agglutinogen (Rh) in human blood reacting with anti-Rhesus sera and with human isoantibodies. *J Exp Med*. 1941 Sep 30;74(4):309–20.
28. Grandstaff Moulds MK. The LW blood group system: a review. *Immunohematology*. 2011;27(4):136–42.
29. Chérif-Zahar B, Mattéi MG, Le Van Kim C, Bailly P, Cartron J-P, Colin Y. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3–1p36.1 by in situ hybridization. *Hum Genet*. 1991 Feb 1;86(4):398–400.
30. Mollison PL. The genetic basis of the Rh blood group system. *Transfusion (Paris)*. 1994;34(6):539–41.
31. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*. 2000 Jun 15;95(12):3662–8.
32. DE BOISGROLLIER/FILOSA L. Etude de la variabilité des gènes des groupes sanguins dans la population des patients de l'EFS Alpes Méditerranée. [Internet]. 2017. Available from: <https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01690364/document>
33. Bailly P, Chiaroni J, Roubinet F. Les groupes sanguins érythrocytaires. John Libbey Eurotext; 2015. 416 p.
34. Nicolas V, Mouro-Chanteloup I, Lopez C, Gane P, Gimm A, Mohandas N, et al. Functional interaction between Rh proteins and the spectrin-based skeleton in erythroid and epithelial cells. *Transfus Clin Biol*. 2006 Mar 1;13(1):23–8.
35. Van Kim CL, Colin Y, Cartron J-P. Rh proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev*. 2006 Mar 1;20(2):93–110.
36. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *The Lancet*. 2008 Oct 18;372(9647):1411–26.
37. Ch H. Molecular insights into the Rh protein family and associated antigens. *Curr Opin Hematol*. 1997 Mar 1;4(2):94–103.
38. Nicolas V, Kim CLV, Gane P, Birkenmeier C, Cartron J-P, Colin Y, et al. Rh-RhAG/Ankyrin-R, a New Interaction Site between the Membrane Bilayer and the Red Cell Skeleton, Is Impaired by Rnull-associated Mutation. *J Biol Chem*. 2003 Nov 7;278(28):25526–33.
39. Cartron J-P. Rh-deficiency syndrome. *The Lancet*. 2001 Dec 1;358:S57.
40. Peyrard T, Rouger P. Les nomenclatures de groupes sanguins érythrocytaires. *Transfus Clin Biol*. 2009 Sep 1;16(4):388–99.
41. Carritt B, Kemp TJ, Poulter M. Evolution of the human RH (Rhesus) blood group genes: A 50 year old prediction (partially) fulfilled. *Hum Mol Genet*. 1997 Jun 1;6(6):843–50.
42. Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood*. 1991 Nov 15;78(10):2747–52.
43. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. *The Blood Group Antigen FactsBook*. Academic Press; 2012. 758 p.
44. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*. 2000 Jan 1;95(1):12–8.
45. Wagner FF, Flegel WA. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology*. 2004;20(1):23–36.
46. Matassi G, Chérif-Zahar B, Mouro I, Cartron JP. Characterization of the recombination hot spot involved in the genomic rearrangement leading to the hybrid D-CE-D gene in the D(VI) phenotype. *Am J Hum Genet*. 1997 Apr;60(4):808–17.

47. Daniels GL, Faas BH, Green CA, Smart E, Maaskant-van Wijk PA, Avent ND, et al. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. *Transfusion (Paris)*. 1998 Oct;38(10):951–8.
48. Silvy M, Granier T, Beley S, Chiaroni J, Bailly P. Identification of novel polymorphism restricted to the (C)ces type 1 haplotype avoids risk of transfusion deadlock in SCD patients. *Br J Haematol*. 2013;160(6):863–7.
49. Pham B-N, Peyrard T, Juszczak G, Dubeaux I, Gien D, Blancher A, et al. Heterogeneous molecular background of the weak C, VS+, hrB-, HrB- phenotype in black persons. *Transfusion (Paris)*. 2009 Mar 1;49(3):495–504.
50. Shao C-P, Maas J-H, Su Y-Q, Köhler M, Legler TJ. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, Del and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang*. 2002;83(2):156–61.
51. Qun X, Grootkerk-Tax MGHM, Wijk PAM, Schoot CEVD. Systemic analysis and zygosity determination of the RHD gene in a D-negative Chinese Han population reveals a novel D-negative RHD gene. *Vox Sang*. 2005;88(1):35–40.
52. Körmöczí GF, Gassner C, Shao C-P, Uchikawa M, Legler TJ. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion (Paris)*. 2005;45(10):1561–7.
53. Flegel WA, Zabern IV, Doescher A, Wagner FF, Strathmann KP, Geisen C, et al. D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian D clusters. *Transfusion (Paris)*. 2009;49(6):1059–69.
54. Flegel WA, Wagner FF. Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. *Clin Lab*. 2002;48(1–2):53–9.
55. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Müller TH, et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*. 2000 Apr 15;95(8):2699–708.
56. Sandler SG, Chen L, Flegel WA. Serological weak D phenotypes: A review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *Br J Haematol*. 2017 Oct;179(1):10–9.
57. Kwon DH, Sandler SG, Flegel WA. DEL phenotype. *Immunohematology*. 2017 Sep;33(3):125–32.
58. Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet*. 2001 Jul 16;2:10.
59. Chiaroni J. Risque immuno-hémolytique des transfusions sanguines et analyses d'immuno-hématologie érythrocytaire. *Rev Fr Lab*. 2003 Sep 1;2003(355):45–51.
60. Sloan SR. The importance of antibody screens after transfusions. *Transfusion (Paris)*. 2016;56(11):2653–4.
61. Koelewijn JM, Haas MD, Vrijkotte TGM, Bonsel GJ, Schoot CEVD. One single dose of 200 µg of antenatal RhIG halves the risk of anti-D immunization and hemolytic disease of the fetus and newborn in the next pregnancy. *Transfusion (Paris)*. 2008;48(8):1721–9.
62. Westhoff CM, Silberstein LE, Wylie DE, Skavdahl M, Reid ME. 16Cys encoded by the RHce gene is associated with altered expression of the e antigen and is frequent in the R0 haplotype. *Br J Haematol*. 2001;113(3):666–71.
63. Chou ST, Flanagan JM, Vege S, Luban NLC, Brown RC, Ware RE, et al. Whole-exome sequencing for RH genotyping and alloimmunization risk in children with sickle cell anemia. *Blood Adv*. 2017 Aug 3;1(18):1414–22.
64. Daniels GL, Faas BH, Green CA, Smart E, Maaskant-van Wijk PA, Avent ND, et al. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. *Transfusion (Paris)*. 1998 Oct;38(10):951–8.
65. Srivastava K, Polin H, Sheldon SL, Wagner FF, Grabmer C, Gabriel C, et al. The DAU cluster: a comparative analysis of 18 RHD alleles, some forming partial D antigens. *Transfusion (Paris)*. 2016 Oct;56(10):2520–31.
66. Wagner FF, Ladewig B, Angert KS, Heymann GA, Eicher NI, Flegel WA. The DAU allele cluster of the RHD gene. *Blood*. 2002 Jul 1;100(1):306–11.
67. Wagner FF, Moulds JM, Tounkara A, Kouriba B, Flegel WA. RHD allele distribution in Africans of Mali. *BMC Genet*. 2003 Sep 24;4:14.
68. Fichou Y, Chen J-M, Maréchal CL, Jamet D, Dupont I, Chuteau C, et al. Weak D caused by a founder deletion in the RHD gene. *Transfusion (Paris)*. 2012;52(11):2348–55.

69. Sandler SG, Chen L, Flegel WA. Serological weak D phenotypes: A review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *Br J Haematol.* 2017 Oct;179(1):10–9.
70. Srivastava K, Stiles DA, Wagner FF, Flegel WA. Two large deletions extending beyond either end of the RHD gene and their red cell phenotypes. *J Hum Genet.* 2018 Jan;63(1):27–35.
71. Franz F Wagner and W.A. Flegel. RhesusBase [Internet]. Available from: <http://www.rhesusbase.info/>
72. Ye L, He Y, Gao H, Guo Z, Zhu Z. Weak D phenotypes caused by intronic mutations in the RHD gene: four novel weak D alleles identified in the Chinese population. *Transfusion (Paris).* 2013;53(8):1829–33.
73. Zabern IV, Flegel WA. IVS5-38del4 deletion in the RHD gene does not cause a DEL phenotype: relevance for RHD alleles including DFR-3. *Transfusion (Paris).* 2007;47(8):1552–5.
74. Tournamille C, Meunier-Costes N, Costes B, Martret J, Barrault A, Gauthier P, et al. Partial C antigen in sickle cell disease patients: clinical relevance and prevention of alloimmunization. *Transfusion (Paris).* 2010;50(1):13–9.
75. Silvy M, Tournamille C, Babinet J, Pakdaman S, Cohen S, Chiaroni J, et al. Red blood cell immunization in sickle cell disease: evidence of a large responder group and a low rate of anti-Rh linked to partial Rh phenotype. *Haematologica.* 2014 Jul;99(7):e115–7.
76. Chou ST, Jackson T, Vege S, Smith-Whitley K, Friedman DF, Westhoff CM. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood.* 2013 Aug 8;122(6):1062–71.
77. Silvy M, Cristofaro JD, Beley S, Papa K, Rits M, Richard P, et al. Identification of RHCE and KEL alleles in large cohorts of Afro-Caribbean and Comorian donors by multiplex SNaPshot and fragment assays: a transfusion support for sickle cell disease patients. *Br J Haematol.* 2011;154(2):260–70.
78. Fortes-Lima C, Gessain A, Ruiz-Linares A, Bortolini M-C, Migot-Nabias F, Bellis G, et al. Genome-wide Ancestry and Demographic History of African-Descendant Maroon Communities from French Guiana and Suriname. *Am J Hum Genet.* 2017 Nov 2;101(5):725–36.
79. Reid ME, Hipsky CH, Hue-Roye K, Hoppe C. Genomic analyses of RH alleles to improve transfusion therapy in patients with sickle cell disease. *Blood Cells Mol Dis.* 2014 Apr;52(4):195–202.
80. Sippert E, Fujita CR, Machado D, Guelsin G, Gaspardi AC, Pellegrino J, et al. Variant RH alleles and Rh immunisation in patients with sickle cell disease. *Blood Transfus.* 2015 Jan;13(1):72–7.
81. Noizat-Pirenne F, Lee K, Pennec P-YL, Simon P, Kazup P, Bachir D, et al. Rare RHCE phenotypes in black individuals of Afro-Caribbean origin: identification and transfusion safety. *Blood.* 2002 Dec 1;100(12):4223–31.
82. Gaspardi AC, Sippert EA, de Macedo MD, Pellegrino J, Costa FF, Castilho L. Clinically relevant RHD-CE genotypes in patients with sickle cell disease and in African Brazilian donors. *Blood Transfus.* 2016 Sep;14(5):449–54.
83. Noizat-Pirenne F. Transfusion et drépanocytose : axes d'optimisation de la sécurité transfusionnelle. *Transfus Clin Biol.* 2014 May 1;21(2):77–84.
84. Mouro I, Colin Y, Sistonen P, Le Pennec PY, Cartron JP, Le Van Kim C. Molecular basis of the RhCW (Rh8) and RhCX (Rh9) blood group specificities. *Blood.* 1995 Aug 1;86(3):1196–201.
85. Fichou Y, Audrézet M-P, Guéguen P, Maréchal CL, Férec C. Next-generation sequencing is a credible strategy for blood group genotyping. *Br J Haematol.* 2014;167(4):554–62.

## Annexes

### Annexe 1 : Liste des polymorphismes et variants détectés par le kit RHD Bioarray

**Tableau 1 : Marqueurs génétiques dans la trousse RHD BeadChip**

Acide aminé	Polymorphisme nucléotidique	Acide aminé	Polymorphisme nucléotidique
S3C	8 C>G	E233K	697 G>A
W16C	48 G>C	V238M	712 G>A
W16X	48 G>A	V245L	733 G>C
L62F	186 G>T	G263R	787 G>A
R70Q	209 G>A	Y269X	807 T>G
R114W	340 C>T	V270G	809 T>G
A137V	410 C>T	V279M	835 G > A
A149D	446 C>A	G282D	845 G > A
N152T	455 A>C	T283I	848 C>T
IVS3+1G/A	In3+1G>A	M295I	885 G>T
psi D	Duplication In3 -19 37 bp	I342T	1025 T>C
M170T	509 T>C	D350H	1048 G > C
I172F	514 A>T	G353W	1057 G>T
T201R	602 C>G	G355S	1063 G>A
F223V	667 T>G	G385A	1154 G>C
A226P	676 G>C	E398V	1193 A>T
S230I	689 G>T	1227G/A	1227 G>A
E233Q	697 G>C		

**Tableau 2 : Variants phénotypiques détectés par la trousse RHD BeadChip**

Nomenclature BeadChip	Nomenclature ISBT (International Society of Blood Transfusion) [5]	Nomenclature BeadChip	Nomenclature ISBT (International Society of Blood Transfusion) [5]
possible D <sup>S</sup>	RHD*01	DBS0	RHD*05.03
1227A (Del)	RHD*01EL.01	DV de type 4	RHD*05.04
Délétion RHD	RHD*01N.01	DV de type 6	RHD*05.06
RHD-CE(3-9)-D	RHD*01N.04	DV de type 8	RHD*05.08
RHD-CE(3-7)-D	RHD*01N.06	DV de type 9	RHD*05.09
RHD-CE(4-7)-D	RHD*01N.07	DVI	RHD*06
48A (W16X)	RHD*01N.08	DAR	RHD*09.01
807G (Y269X)	RHD*01N.18	DAR-E	RHD*09.02
D faible de type 1	RHD*01W.1	D faible de type 4.0 ou 4.3	RHD*09.03 ou RHD*09.05
D faible de type 1.1	RHD*01W.1.1	D faible de type 4.1	RHD*09.04
D faible de type 14 ou 40 ou 51	RHD*01W.14 ou RHD*01W.40 ou RHD*01W.51	DAU1	RHD*10.01
D faible de type 17	RHD*01W.17	DAU2	RHD*10.02
D faible de type 2	RHD*01W.2	DAU3	RHD*10.03
D faible de type 47	RHD*01W.47	DAU4 ou DV de type 5	RHD*10.04 ou RHD*05.05
D faible de type 29	RHD*01W.29	DAU5 ou DV de type 1 ou DBS2	RHD*10.05 ou RHD*05.01 ou RHD*13.02
D faible de type 3	RHD*01W.3	D faible de type 11	RHD*11
D faible de type 34	RHD*01W.34	DOL ou DOL2	RHD*12.01 ou RHD*12.02
D faible de type 41	RHD*01W.41	DOL3	RHD*12.03
D faible de type 5	RHD*01W.5	DBT1	RHD*14.01
DIIIa	RHD*03.01	DBT2	RHD*14.02
DIIIb	RHD*03.02	D faible de type 15	RHD*15
DIIIc	RHD*03.03	DCS1 ou DFV	RHD*16.01 ou RHD*30
DIII de type 4	RHD*03.04	DCS2	RHD*16.02
DIII de type 6 ou DIII de type 7	RHD*03.06 ou RHD*03.07	DFR ou DFR3	RHD*17.01 ou RHD*17.03
DIII de type 7	RHD*03.07	DFR2	RHD*17.02
DIVa	RHD*04.01	DFR4	RHD*17.04
DIVa de type 2	RHD*04.02	DHMI	RHD*19
DIV de type 3	RHD*04.03	IVS3+1G>A (Del)	RHD*208
DIV de type 4	RHD*04.04	DNB	RHD*25
DIV de type 5 ou DIVb	RHD*04.05 ou RHD*04.06	DUC2	RHD*37
DIVb	RHD*04.06	DIIIa-CE(4-7)-D <sup>SS</sup>	S/O [6]
RHD psi	RHD*04N.01	RHCE(1-3)-D(4-10)	S/O [7]
DV de type 2 ou DBS1	RHD*05.02 ou RHD*13.01	ceHAR	RHCE*01.22
DV de type 2 ou DBS1 ou DV de type 7	RHD*05.02 ou RHD*13.01 ou RHD*05.07	Délétion RHD (possible rG)	RHD*01N.01 (possible RHCE*02.03)

## Annexe 2 : Liste des polymorphismes et variants détectés par le kit RHCE Bioarray

**Tableau 1 : Marqueurs génétiques dans le test RHCE BeadChip**

Acide aminé	Polymorphisme nucléotidique	Acide aminé	Polymorphisme nucléotidique
W16C	48 G>C	V223F	667 G>T
A36T	106 G>C	A226P	676 G>C
Q41R	122 A>G	Q233E	697 C>G
P103S	307 C>T	M238V	712 A>G
*109Ins	Insertion de 109 pb dans l'intron 2	L245V	733 C>G
R114W	340 C>T	V250M	748 G>A
L115R	344 T>G	dT744dC	744 T>C
S122L	365 C>T	A273V	818 C>T
T152N	455 C>A	I306V	916 A>G
R154T	461 G>C	G336C	1006 G>T
M167K	500 T>A	T342I	1025 C>T
G180R	538 G>C	Rh r. <sup>S</sup>	Cde. <sup>S</sup> . 5'UTR
R201T	602 G>C		

**Tableau 2 : Variants phénotypiques détectés par le Kit RHCE BeadChip**

Nom conventionnel (sensible à la casse)	Nom ISBT [5]	Nom conventionnel (sensible à la casse)	Nom ISBT [5]
WT(ce)	RHCE*01	ce(733G,748A)	
WT(Ce)	RHCE*02	ceHAR	RHCE*01.22
WT(cE)	RHCE*03	CeMA	RHCE*02.01
WT(CE)	RHCE*04	CeFV	RHCE*02.02
ce(48C)	RHCE*01.01	Ce(365T)	RHCE*02.03
ceTI	RHCE*01.02	CeVA	RHCE*02.04
ce(1025T)	RHCE*01.03	CeCW	RHCE*02.08.01
ceAR	RHCE*01.04	ce(48C,122G)	
ceEK	RHCE*01.05	CeCX	RHCE*02.09
ceMO	RHCE*01.07	ce(48C,106A)	
ceBI ou ceSM	RHCE*01.08 ou RHCE*01.09	CeRN	RHCE*02.10.01
ceSL	RHCE*01.10	Ce(344G)	RHCE*02.12
ceRT	RHCE*01.11	cEEW	RHCE*03.01
ceRA	RHCE*01.12	cEFM	RHCE*03.03
ce(733G)	RHCE*01.20.01	cE(602C)	RHCE*03.04
ce(48C,733G)	RHCE*01.20.02	cEKH	RHCE*03.05
ce(48C,733G,1006T). <sup>§</sup>	RHCE*01.20.03	cE(344C)	RHCE*03.07
ce(48C,733G,1025T)	RHCE*01.20.04	(48C,712G,733G) [11]	
ce(733G,1006T). <sup>§</sup>	RHCE*01.20.05	(340T,344G) [10]	
ceCF	RHCE*01.20.06	ce(48C,697G,733G,1006T). <sup>§</sup> [9]	
ce(697G,733G)		ce(48C,697G,712G,733G,916T)[12]	
ceJAL	RHCE*01.20.07	ce(48C,733G,744C) [13]	
ce(48C,340T,733G)		Ce(667T)	
ce(48C,733G,748A)	RHCE*01.20.08	cE(365T)	

**Annexe 3 :** Amorces de PCR utilisées pour l'amplification des 10 exons du gène *RHD*

Exon	Sens (S) Anti-sens (AS)	Séquence amorce PCR (5'>3')	Taille amplicons obtenus (pb)
1	S AS	CACAGGGGAAGTTGGCTGC AGAAGATGGGGGAATCTTTTCCTT	1179
2	S AS	CCATTTGATTCTGGCAACCT AAAGGATGCAGGAGGAATGTAGGC	1590
3	S AS	TCTTCTATTCCCACAGAAAGTAGG TCTTGCTATGTTGCCAGCTCGG	607
4	S AS	TGGCAAGAACCTGGACCTTGACTTT TCCTGAACCTGCTCTGTGAAGTGC	1626
5	S AS	TACCTTTGAATTAAGCACTTCACAG ACTACCCCAGAAAGCCTTTG	656
6	S AS	AGCAGGGAGGATGTTACAG TTCAGCCAAAGCAGAGGAGG	289
7	S AS	CATCCCCCTTTGGTGGCC AAGGTAGGGGCTGGACAG	405
8	S AS	CTGGAGGCTCTGAGAGGTTGAG CCTGGCAATGGTGAAGAAAG	465
9	S AS	TACTGTCGTTTTGACACACAATATTC CACCCGCATGTCAGACTATTTGGC	487
10	S AS	CAAGAGATCAAGCCAAAATCAGT AGCTTACTGGATGACCACCA	382

**Annexe 4 :** Amorces de PCR utilisées pour le séquençage Sanger des 10 exons du gène *RHD*  
(Eurofins Genomics, Allemagne)

Exon	Nom amorce	Amorce séquençage
1	DCEex1S_seq	CAA-ACT-GAG-CAC-AGC-AGG-AA
2	DCEseq2AS	CAC-TGG-TGC-TAG-ACA-GAG-AGG
3	DCEex3AS_seq	ACT-CAC-ACC-TCA-GCC-TCC-TG
4	DCEex4Fseq	GGC-TGG-GTA-AGC-TCT-GAA-CA
5	DCEex5S_seq	AAC-CCT-CTT-GGC-CTT-TGT-TT
6	DCEex6S_seq	TTA-CAG-GGT-TGC-CTT-GTT-CC
7	DCEex7AS_seq	CCA-ACA-AAT-ATT-CAC-CGA-AGC
8	DCEex8S_seq	ACA-TGT-CTG-CGT-GGC-TTT-TT
9	DCEex9AS_seq	GCT-GTC-TCA-TCC-CTG-ACT-CTG
10	Dex10S_seq	CCA-TCA-TAT-ATG-CAG-TCT-GTT-GTT-T

## *SERMENT DE GALIEN*

*Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.*



## Résumé

**Contexte :** Le système RH est l'un des systèmes de groupe sanguin les plus polymorphes avec de nombreux allèles variants affectant l'expression des antigènes RH. Cette complexité est à l'origine des difficultés de transfusion des patients africains, en particulier les patients drépanocytaires nécessitant une thérapie transfusionnelle chronique à haut risque d'immunisation. La stratégie française consiste à réaliser le génotypage *RHD* et *RHCE* à l'aide des kits RHD et RHCE BioArray Beadchip™ (Immucor) systématiquement pour tous les patients drépanocytaires, afin d'adapter leur consigne transfusionnelle et respecter au mieux la compatibilité antigénique des CGR transfusés et ainsi diminuer les risques d'allo-immunisation.

**Matériels et méthodes :** Afin d'évaluer si les polymorphismes recherchés par le kit RHD BioArray sont adaptés à la population drépanocytaire, nous avons réalisé un séquençage des 10 exons du gène *RHD* chez 42 drépanocytaires ayant obtenu un « probable D sauvage » au résultat du génotypage BioArray. La seconde partie de ce travail est une étude des variants du système RH dans une population de 351 drépanocytaires issus de PACA – Corse entre 2011 et 2019 afin d'évaluer la valeur du génotypage systématique *RHD* et *RHCE* dans l'amélioration de la prise en charge transfusionnelle du patient drépanocytaire.

**Résultats :** Suite au séquençage des 10 exons du gène *RHD*, aucun polymorphisme d'intérêt transfusionnel n'a été mis en évidence. Le kit RHD BioArray semble donc suffisant pour le génotypage systématique de la population drépanocytaire.

L'étude de la population drépanocytaire de PACA-Corse a montré que 29% des individus présentent au moins un allèle variant, dont 5,1% d'allèles RH1 (D) partiels et 15,3% d'allèles RH2 (C) partiels. La consigne transfusionnelle a été adaptée chez 13,1% des patients grâce au génotypage.

**Conclusion :** La méthode BioArray est satisfaisante pour l'analyse moléculaire du système RH. Le génotypage systématique *RHD* et *RHCE* est justifié dans la population drépanocytaire pour optimiser la prise en charge transfusionnelle de ces patients.

**Mots-clés :** Groupes sanguins, drépanocytose, transfusion, allèles *RHD* et *RHCE*, variants, génotypage RH, allo-immunisation.