



AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE

ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE ET SANTE

THESE

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE

Le 4 décembre 2015

Par Monsieur Alhassane BA

Hétérogénéité génétique des groupes sanguins au Mali : impact transfusionnel

Pour obtenir le grade de DOCTORAT d'AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

Mention : Biologie, Spécialité : Génétique

Membres du Jury :

Monsieur BOËTSCH Gilles, Directeur de recherche CNRS – UMI3189 Dakar – Rapporteur

Monsieur PEYRARD Thierry, Docteur CNRGS - INTS – UMI_S1134 Paris – Rapporteur

Monsieur DOUMBO Ogobara K, Professeur – Université de Bamako – Examineur

Monsieur SANOGO Moussa, Docteur - CHU du point « G » Bamako – Examineur

Madame SILVY Monique, Chargée de recherche - UMR7268 - EFS Marseille – Examineur

Monsieur CHIARONI Jacques, Professeur – Aix-Marseille Université – Directeur de thèse

Laboratoire d'Hématologie Moléculaire, Etablissement Français du Sang Alpes Méditerranée

UMR7268 ADES, AMU – EFS – CNRS, Marseille, France

À la mémoire de mon cher père

« Que ton âme repose en paix, Amen ».

Remerciements

Je voudrais tout d'abord exprimer ma reconnaissance au **Professeur Jacques CHAROMI** de m'avoir accepté à l'Établissement Français du Sang Alpes Méditerranée et dirigé mes travaux de thèse. À l'EFS AM, j'ai appris, amélioré et approfondi mes connaissances théoriques et pratiques en transfusion sanguine à travers les enseignements, les stages pratiques au laboratoire d'Immunohématologie et au laboratoire d'Hématologie Moléculaire.

Je remercie le **Professeur Ogobara K DOUMBO** de l'Université des Sciences Techniques, et Technologiques de Bamako (USTTB), de m'avoir accepté au sein l'équipe de Malaria Research and Training Center pour réaliser mes recherches. Votre soutien permanent a été un atout majeur pour l'aboutissement de ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance au **Docteur Michelle DIALLO**, pour m'avoir accueilli à l'EFS AM. Vous m'avez ouvert beaucoup de portes, trouvez dans ce travail l'assurance de mes sentiments respectueux et amicaux.

Je remercie le **Docteur Pascal BAILLY** de m'avoir accepté au laboratoire d'Hématologie Moléculaire pour la réalisation de ce travail. Votre disponibilité, votre soutien pédagogique, vos conseils et vos compétences scientifiques m'ont beaucoup aidé dans la réalisation de ce travail.

Je remercie le **Docteur Monique SILMY** pour sa disponibilité, ses conseils et contributions qui ne m'ont pas manqués pendant la réalisation de cette thèse. Toutes mes amitiés.

Je remercie le **Docteur Gilles BOËTSCH** et le **Docteur Thierry PENRARD** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Vos rapports me permettront sans doute d'améliorer la qualité de ce travail.

Au **Docteur Moussa SANOGO** du Centre hospitalier Universitaire du Point « G » à Bamako, toujours disponible, tes qualités et compétences en santé publique m'ont beaucoup aidé. Tu m'as fait honneur en acceptant d'être examinateur dans ce travail. Trouve ici, toute ma reconnaissance et ma gratitude.

Je remercie le **Docteur Aly LANDOURE** de l'Institut National de Recherche en Santé Publique à Bamako, pour ses conseils et son accompagnement scientifique qui m'ont beaucoup aidé.

Mes remerciements aux **Docteur Virginie FERRERA-TOURENC**, **Docteur Jean Pierre ZAPPITELLI**, **Docteur Christophe PICARD** pour leur soutien.

Je remercie le **Docteur Pierre GALLIAN** pour sa disponibilité et son apport pour la réalisation de l'étude sur les arbovirus.

Mes remerciements au **Docteur Claude BAIMS**, **Docteur Sylvie CHAPEL-FERNANDES**, madame **Sophie BELEY**, monsieur **Thomas GRAMER**, madame **Valérie MURIEL**, madame **Catherine MOUÏA**, madame **Alexandra GRIMALDI**, madame **Cécile DUROUSSEAU DE COULGEANS-COSTA**, madame **Diana HERRERA RODRIGUEZ** pour leur collaboration et les bons moments passés ensemble. Amicalement.

Je remercie le Docteur Issa KONE pour sa disponibilité et ses conseils qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Je remercie monsieur Satiqui DIARITE et sa famille qui m'ont rendu le séjour agréable à Marseille.

Je remercie le personnel du CHTS de Bamako pour leur soutien et apport technique.

Je remercie le personnel du MRTC de la faculté de médecine de Bamako pour leur collaboration.

Je remercie la Fondation Méditerranée Infection et Campus France (Service de Coopération et d'Actions Culturelles de l'Ambassade de France au Mali) pour leur accompagnement.

Je remercie ma famille à travers, ma mère, mes frères et sœurs, mes tantes, mes tontons pour leur soutien.

Mention spéciale à mon épouse Afoussatou DIARRA BA, mes enfants Boubacar et Cheick Hamala. Vous avez su être patient malgré la distance. Ce sacrifice est pour vous, trouvez la toute mon affection.

Sommaire

Introduction	1
<i>La situation du Mali</i>	2
<i>Organisation de la transfusion sanguine au Mali</i>	4
<i>Les difficultés de la transfusion sanguine au Mali</i>	5
A. Principaux systèmes de groupes sanguins d'intérêt transfusionnel	8
I. Système Kell (ISBT n°006)	8
1. Les antigènes antithétiques KEL1/KEL2, KEL3/KEL4/KEL21	9
1.1. KEL1 (K) et KEL2 (k).....	9
1.2. KEL3 (Kp ^a), KEL4 (Kp ^b) et KEL21 (Kp ^c).....	11
2. Les phénotypes McLeod, Kell_{mod} et Kell_{null}	11
2.1. Phénotypes McLeod et Kell _{mod}	11
2.2. Phénotype Kell _{null}	13
2.3. Anticorps liés aux phénotypes KEL _{null} et KEL _{mod}	15
3. Particularités africaines : l'antigène KEL6 (Js^a)	15
II. Système Kidd (ISBT n°009)	17
1. Les antigènes Jk^a et Jk^b (JK1 et JK2) et les anticorps	17
2. Le phénotype rare Jk(a-b-) ou Jk_{null}	20
3. Fonction de transporteur d'urée	23
III. Système Dombrock (ISBT n°014)	24
1. Antigènes antithétiques Do^a et Do^b, et le phénotype Grégory (a-)	24
2. Particularités africaines	26
3. Autres allèles	30
4. Anticorps	30

IV. Système Duffy (ISBT n°008)	31
1. Les antigènes FY1 (Fy^a) et FY2 (Fy^b)	32
3. Les phénotypes faible et null	33
4. Le phénotype FY :-1,-2 dans les populations afro-antillaises	36
V. Système RH (ISBT n°004)	37
1. Les protéines Rh et le locus RH	37
1.1. Protéines Rh.....	37
1.2. Locus RH.....	38
2. Bases moléculaires des antigènes communs	38
2.1. Polymorphisme associé aux phénotypes RhD positif et RhD négatif.....	38
2.2. Polymorphismes des antigènes RhC/c, RhE/e.....	39
2.3. Distribution des phénotypes et haplotypes RH.....	40
3. Le phénotype RhD négatif dans les populations Afro-Antillaises	41
3.1. Pseudogène RHD*RHDpsi.....	42
3.2. Haplotype (C)ces type 1.....	43
3.3. Haplotype (C)ces type 2.....	44
4. Allèles RH variants dans les populations Afro-antillaises	45
4.1. Allèles RHD variant.....	45
4.2. Allèles RHCE variant et absence d'expression d'antigène(s) de haute fréquence.....	51
4.3. Autres phénotypes associés à l'absence d'antigène de haute fréquence.....	54
5. Haplotypes RH, expression d'antigènes partiels et de faible fréquence	54
VI. Système MNS (ISBT n°002)	56
1. Le locus glycophorine et les glycoprotéines GPA, GPB et GPE associées	57
2. Les antigènes antithétiques MNS1/MNS2 et MNS3/MNS4	58
2.1. MNS1 et MNS2.....	59
2.2. MNS3 et MNS4.....	60
3. Les particularités africaines	60

3.1. L'antigène MNS6 (He).....	60
3.2. Le phénotype MNS : -3,-4 (S-s-).....	61
3.2.1 Le phénotype MNS : -3,-4,-5 (S-s-U-).....	61
3.2.2 Le phénotype MNS : -3,-4, 5 ^w (S-s-U ^{var}).....	62
3.2.3 Fréquence des phénotypes MNS : -3,-4.....	63
3.3. Le phénotype Dantu.....	64
B. Objectifs.....	66
C. Résultats et discussion.....	67
I. Etude des groupes sanguins chez les donneurs de Bamako.....	67
Article n°1 : Genotyping of 28 blood group alleles in blood donors from Mali: prediction of rare phenotypes.....	68
II. Diversité génétique du système Rh chez les Dogons et les Peuhls.....	84
Article n°2 : RH diversity in Mali: characterization of a new haplotype RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2).....	86
III. Etudes des groupes sanguins en Afrique subsaharienne d'Est en Ouest.....	102
Article n°3 : Heterogeneity of alleles encoding high- and low-prevalence red blood antigens across Africa: useful data to facilitate transfusion in African patients.....	104
Synthèse et perspectives.....	121
A/ Diversité génétique.....	121
1/ <u>Chez les donneurs de Bamako, Mali</u>	121
2/ <u>Chez les Dogons et les Peuhls de la région de Mopti</u>	122
3/ <u>En Afrique subsaharienne d'Est en Ouest</u>	122
B/ L'Afrique subsaharienne.....	123
C/ La transfusion sanguine en Afrique subsaharienne et au Mali.....	125
D/ Perspectives stratégiques pour la transfusion sanguine au Mali.....	127
Références bibliographiques.....	131

Liste des abréviations

A : Adénine

ADBS : Association des donneurs bénévoles de sang

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

C : Cytosine

CROM : Cromer

CE : Concentré érythrocytaire

CNTS : Centre National de Transfusion Sanguine

CPS : Concentré de plaquettes standards

CSRef : Centre de santé de référence

CTS : Centre de Transfusion Sanguine

DARC : Duffy antigen receptor for chemokines

DGV : Dépistage génomique viral

DNS : Direction Nationale de la Santé

EDC : Epreuve directe de compatibilité

EFS : Etablissement Français du Sang

EPH : Etablissement public hospitalier

G : Guanine

GPA : Glycophorine A

GPB : Glycophorine B

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

GR : Globule rouge

HPN : Hémoglobinurie paroxystique nocturne

HV : Hémovigilance

ISBT : International Society of Blood Transfusion

ITT : Infections transmissibles par transfusion

JMH : John Milton Hagen

Kb : Kilo base

MHFNN : Maladie hémolytique du fœtus et du nouveau né

ONG : Organisation non gouvernementale

Pb : Paire de base

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PCR-RFLP : Restriction fragment length polymorphism

PCR-SSO : Sequence specific oligonucleotide

PFC : Plasma frais congelé

PSL : Produit sanguin labile

RAI : Recherche d'anticorps irréguliers

RhAG : Rh-associated glycoprotein

SMP1 : Small membrane protein 1

SNPs : Single nucleotide polymorphisms

T : Thymine

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

YT : Cartwright

Introduction

Le fait pour une population de disposer d'unités de sang compatible et sécurisé au niveau immunologique devrait être un des objectifs premiers de tout gouvernement issu de la population et de sa société civile.

Cet objectif semble globalement atteint par les pays dits développés, cela est très rarement le cas des états de l'Afrique subsaharienne où des embryons organisationnels de la transfusion peinent à se développer. Aujourd'hui, le Mali n'échappe pas à ce constat tout comme l'ensemble des états voisins avec des contextes et contraintes spécifiques.

La plupart des pays d'Afrique subsaharienne ne disposent pas de véritables politiques nationales en matière de sécurité des pratiques de santé. Les systèmes de santé sont confrontés à d'énormes difficultés d'organisation qui affectent la qualité des services qui devraient être normalement rendus aux populations, notamment en ce qui concerne la transfusion sanguine. L'insuffisance de lignes directrices, d'outils et de normes pour la sécurité des donneurs et des patients, demeurent des préoccupations majeures dans ces pays. Nombreux sont les obstacles liés au fonctionnement régulier des centres de transfusion et les problèmes que ceux-ci éprouvent dans leur gestion quotidienne. Il s'agit entre autres de problèmes d'ordre économique, social, culturel, de formation, d'éducation ou même de l'absence d'une réelle volonté politique.

La sécurité transfusionnelle vise à répondre d'une part à la demande quantitative par la disponibilité des produits sanguins ; et d'autre part à la demande qualitative en évitant la transmission d'infections par le sang et les réactions immunologiques. Cette sécurité représente le principal défi auquel est confrontée toute organisation de la transfusion sanguine. L'allo-immunisation anti-érythrocytaire et les accidents immuno-hémolytiques de la transfusion sont dus aux polymorphismes des antigènes de groupes sanguins érythrocytaires qui diffèrent d'un individu à un autre. Si ces particularités ne posent, en règle générale, pas de problème, elles peuvent devenir critiques lorsque les transfusions deviennent itératives ou chez la femme enceinte dans le cadre de la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau né (MHFNN).

Ceci est particulièrement vrai pour les populations d'Afrique sub-saharienne réputées avoir un niveau plus élevé de diversité génétique inter ethnique des groupes sanguins érythrocytaires mais également une fréquence élevée de pathologies requérant des transfusions itératives comme la drépanocytose ou la thalassémie. Lorsque ces populations

d'Afrique sub-saharienne sont migrantes, elles peuvent également être confrontées à des problèmes spécifiques en termes de disponibilité de produits sanguins compatibles dans les pays d'accueil. A ces difficultés, viennent se surajouter des difficultés d'ordre diagnostique. Celles-ci sont liées à l'absence de réactifs commerciaux ainsi qu'à des pratiques de laboratoire essentiellement adaptées aux populations originaires d'Europe de l'ouest.

Enfin, la transfusion des populations d'Afrique sub-saharienne est complexifiée par l'absence d'antigènes courants, la présence d'antigènes partiels et l'expression d'antigènes dits « privés ».

A partir de ces éléments d'ordre général sur la transfusion sanguine, nous allons aborder dans les paragraphes suivants la situation du Mali, l'organisation pratique de sa transfusion sanguine et ses difficultés, puis présenter les principaux systèmes de groupes sanguins d'intérêt transfusionnel.

La situation du Mali

Le Mali, pays continental, sahélo saharien situé en Afrique de l'Ouest, est limité au Nord par l'Algérie, au Nord Ouest par la Mauritanie, à l'Ouest par le Sénégal, à l'Est par le Burkina Faso et le Niger, et au Sud par la Côte d'Ivoire et la Guinée. Le Mali est organisé en 8 régions administratives (Kayes, Koulikoro, Sikasso, Ségou, Mopti, Gao, Tombouctou et Kidal) et le District de Bamako qui a rang de région. Au recensement de 2014, le Mali compte 16,5 millions habitants dont 62% en milieu rural, la population malienne est constituée de différentes ethnies, dont les principales sont les Bambaras, les Bobos, les Bozos, les Dogons, les Khassonkés, les Malinkés, les Miniankas, les Peulhs, les Touareg, les Sénoufos, les Soninkés, et les Songhaïs (Figure 1). Sa population se caractérise par sa jeunesse (47,6% ont moins de 15 ans) avec un taux de scolarisation en école primaire de 88% (2012), une parité hommes-femmes et un indice de fécondité élevé de 6,16. Le rapport du FMI de 2013, indique qu'au Mali la pauvreté est un phénomène généralisé qui touche 43,6 % des ménages avec des variations régionales importantes ; et 22 % de la population vit dans l'extrême pauvreté. La pauvreté de revenu reste un phénomène essentiellement rural. Les indicateurs de santé restent préoccupants au regard d'importantes disparités existant entre milieu urbain et rural, régions et groupes socioéconomiques. La surmortalité des populations

rurales et des groupes les plus pauvres reste avant tout due à des affections évitables par une prévention efficace de santé publique qui reste à développer.

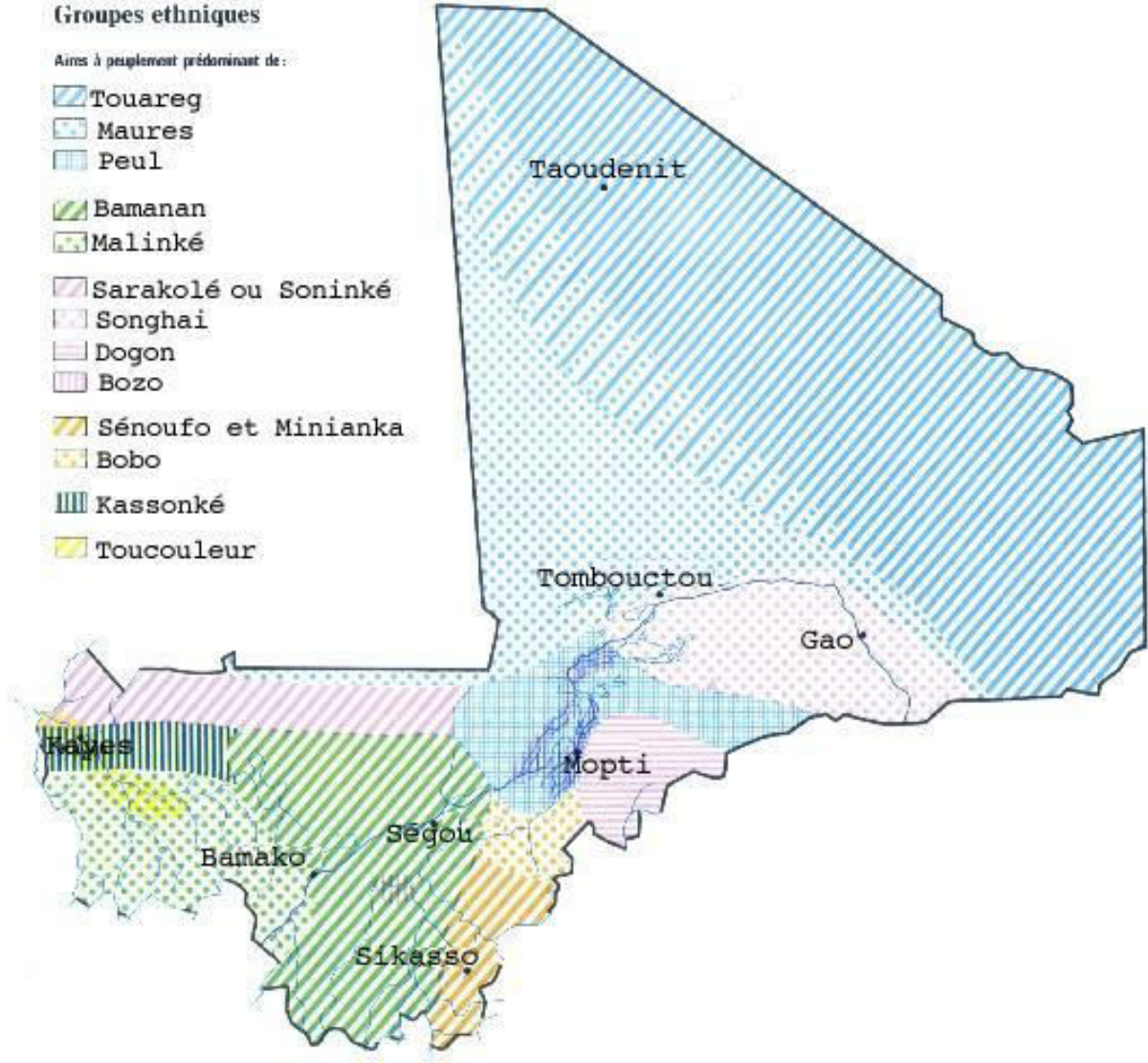


Figure 1 : Principales ethnies du Mali (Atlas Jeune Afrique; Mali.).

Organisation de la transfusion sanguine au Mali

Le Mali dispose d'un Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) créé en 2000, basé dans la capitale à Bamako. A partir de ce centre, la collecte de sang est menée à travers deux types d'actions: (i) la collecte en cabine fixe qui représentait 87% des dons en 2007 et est réalisée dans les locaux du CNTS, les CSRef (Centre de Santé de Référence) et les EPH (Etablissements Publics Hospitaliers) (DNS., 2008.; Tagny et al., 2009), et (ii) la collecte en cabine mobile (13%) au niveau des écoles, facultés, entreprises, casernes, lieux de manifestation.... Ce type de collecte a connu un regain d'intérêt dans les capitales régionales par la création des antennes régionales de la transfusion au niveau des EPH et l'implication d'associations locales de donneurs volontaires et bénévoles de sang. Néanmoins, en raison d'un coût élevé (promotion, déplacement et matériel de collecte) le pourcentage de collectes mobiles bien que constant, est le plus faible comparé aux états voisins de l'Afrique de l'ouest (Tableau 1).

La majorité des dons (70%) proviennent des donneurs de compensation incluant les dons familiaux et des différents corps de l'Armée. Les 30% restant sont des donneurs volontaires et bénévoles dont 1/3 de donneurs réguliers (Diarra et al., 2009; DNS., 2008.; Tagny et al., 2009). Afin d'accroître le nombre de ces donneurs, le CNTS en relation avec l'Association de Donneurs Bénévoles de Sang (ADBS), organise chaque année une campagne de sensibilisation au don volontaire et bénévole à travers tout le pays. Parallèlement, des actions et des collectes ont lieu lors des journées mondiales du don de sang et des journées ou semaines de commémoration d'associations, d'ONG (Organisme non gouvernemental) ou de clubs comme les Lions Club, le Rotary, le Rotaract... etc.

Les données recueillies pour l'année 2007 indiquent que le sang total représente plus de 87,5 % des transfusions effectuées au Mali (DNS., 2008.; Tagny et al., 2009). Seulement 10,7% de concentré érythrocytaire (CE) sont produits et utilisés contre 40% à 75,8% au Niger, en Côte d'Ivoire et au Burkina-Faso (Tableau 1). La diversification des produits sanguins labiles à partir du sang total est faible. La détermination sérologique des antigènes de groupes sanguins pour les patients est limitée aux antigènes ABO et RhD en absence de tests de compatibilité pré-transfusionnelle. De même, la qualification immuno-hématologique des dons concerne le groupage ABO et RhD (en double détermination) alors que le groupage des antigènes RhC/c/E/e est effectué pour moins de 10% des dons. Ce n'est qu'à partir de 2004, que toutes les unités de sang collectées à Bamako sont testées par

sérologie pour le VIH, les virus des hépatites B et C, et la syphilis. En 2007, les prévalences de ces différents marqueurs étaient de 2,58% pour le VIH ; 13,89% pour l'hépatite B ; 3,25% pour l'hépatite C et 0,3% pour la syphilis (Diarra et al., 2009; DNS., 2008.; Tagny et al., 2009). Au fil des années, le plateau technique du CNTS a été amélioré, par l'acquisition de matériel, d'équipements de collecte, de qualification biologique, de préparation de dérivés sanguins et de conservation des produits sanguins.

Les difficultés de la transfusion sanguine au Mali

- La première d'entre elles est immobilière sachant que la conception architecturale et l'agencement des locaux du CNTS ne répondent pas aux normes de qualité, de sécurité et de confidentialité. Prévu initialement pour 5.000 dons par an, le CNTS a réalisé 28 666 dons en 2010 (Conseil administration CNTS 02 Janvier 2010) (Diarra et al., 2009; DNS., 2008.; Tagny et al., 2009).

- La seconde concerne la formation du personnel avec seulement 42% du personnel du CNTS ayant reçu une formation spécifique en transfusion contre plus de 50% au Niger et Burkina-Faso (Tableau 1) (Tagny et al., 2009). En 2006, sur financement du Fond mondial, huit Pharmaciens ont été recrutés par le CNTS pour dynamiser les activités transfusionnelles des six EPH régionaux et des centres de santé de référence de Koulikoro et Kidal. Dans la même période, deux communicateurs ont été recrutés pour renforcer la section collecte et promotion du don de sang du CNTS. Parallèlement, l'évaluation des connaissances et attitudes du personnel médical (médecins, sages-femmes et infirmiers) à Bamako a révélé un niveau insuffisant de connaissances en matière de transfusion sanguine. Ainsi, seulement 29,1% du personnel avait bénéficié d'une formation en transfusion sanguine (hors formation initiale) alors que 81% pratiquaient régulièrement la transfusion (Diakité et al., 2012).

- La troisième est éthique au regard du don de sang volontaire et bénévole. Une enquête réalisée au CSRef de la commune V de Bamako indique que les principaux obstacles au don volontaire sont la peur d'un dépistage positif du VIH et un manque d'information des populations sur le bien-fondé du don de sang (Traore et al., 2011). Aujourd'hui, pratiquement tout reste à faire en matière de sensibilisation au don du sang, le Mali compte seulement 30% de donateurs volontaires bénévoles *versus* plus de 80% au Niger, Côte d'Ivoire et Burkina-Faso (Tableau I).

- La quatrième est administrative sur de nombreux niveaux. En effet, les règles de prescription des unités de sang et des produits sanguins ne sont pas toujours respectées par les prescripteurs. Il n'existe pas encore de comités hospitaliers de transfusion au Mali. Une série de formations a été initiée à partir de 2006 à l'intention des prescripteurs et des techniciens de laboratoire et un programme d'assurance qualité des produits sanguins a été introduit la même année. Aujourd'hui, le CNTS de Bamako assure la distribution nominative des produits sanguins sur présentation d'une ordonnance type. Enfin, le système d'hémovigilance est quasi inexistant.

- La cinquième est liée à une connaissance très parcellaire de la diversité des groupes sanguins érythrocytaires au Mali. Ainsi, une exploration moléculaire des groupes sanguins érythrocytaires des populations présentes au Mali s'impose afin de dégager à terme une stratégie pertinente de typage des patients et des donneurs.

Fort de ces constats, les politiques menées jusque là n'ont pas pu développer la transfusion sanguine avec des moyens dédiés, ce qui a pour conséquences un faible niveau de dons volontaires et bénévoles. Il résulte que la transfusion sanguine au Mali est aujourd'hui confrontée à des problèmes de ressource en matière première : *le sang* ; malgré une population de donneurs potentiels jeunes (47,6% de la population a moins de 15 ans) (voir Tableau 1). Cette situation affecte considérablement l'approvisionnement régulier en unités de sang et produits dérivés dans les établissements de santé. Ainsi, entre décembre 2006 et mai 2007, seulement 65% des besoins transfusionnels ont été couverts au CSRef de la commune V de Bamako (Traore et al., 2011). Parallèlement, ceci entretient des pratiques frauduleuses et des filières non sécurisées.

Tableau 1 : Situation transfusionnelle du CNTS de Bamako comparée à trois centres de transfusion en Afrique de l'ouest (Tagny et al., 2009).

		Bamako	Niamey	Daloa	Ouagadougou
		(Mali)	(Niger)	(Côte d'Ivoire)	(Burkina-Faso)
Programme national de transfusion sanguine (date de mise en œuvre)		-	+(2005)	+(1998)	+(2000)
Personnel formé en transfusion (%)		42	64	9	50
Proportion de collectes mobiles (%)		13	45	23,8	70
% de PSL préparés à partir des unités de sang total	Sang total (%)	87,5	60	50	14,5
	CE (% vol.ml)	10,7(200)	40(200)	50(200)	75,8(230)
	CPS (%)	1,3	0	0	1,5
	PFC (%)	0,5	40	0	8,3
Nombre total de donneurs de sang		25543	2962	14257	30364
Type de don	Bénévole (%)	30	86,8	100	92
	Compensation (%)	70	13,2	0	8
Donneur bénévole régulier (%)		31,7	47,3	66,7	26,2
Tranches d'âge (%)	18-30 ans	45	73,6	80	90,1
	30-40 ans	39	13,5	15	6,6
	>40 ans	16	12,9	5	3,3

PSL : produits sanguins labiles, CE : concentré érythrocytaire, CPS : concentré de plaquettes standard, PFC : plasma frais congelé

A. Principaux systèmes de groupes sanguins d'intérêt transfusionnel

I. Système Kell (ISBT n°006)

Le système de groupe sanguin Kell est composé de 35 antigènes dont les principaux sont les antigènes antithétiques KEL1(K) / KEL2(k), KEL3(Kp^a) / KEL4(Kp^b) / KEL21(Kp^c), et KEL6(Js^a) / KEL7 (Js^b). Ces antigènes, sont classés en antigènes de basse fréquence (KEL3, KEL6, KEL10 (U^a), K17, KEL21, K23, K24, KEL25 (VLAN), KEL28 (VONG), KEL31 (KYO)) et antigènes de haute fréquence (KEL2, KEL4, KEL5 (Ku), KEL7, K11, K12, K13, K14, K16, K18, K19, KEL20 (Km), K22, KEL26 (TOU), KEL27 (RAZ), KEL29 (KALT), KEL30 (KTIM), KEL32 (KUCI), KEL33 (KANT), KEL34 (KASH), KEL35 (KELP), KEL36 (KETI), KEL37 (KHUL), KEL38 (KYOR)). Les antigènes KEL sont portés par une glycoprotéine transmembranaire de type II de 93kDa. La protéine Kell, également appelée CD238, est codée par le gène *KEL*, localisé sur le bras long du chromosome 7 en q34, et composé de 19 exons répartis sur 21,5 Kb (Lee et al., 1995c). La cystéine en position 72 de Kell établit un pont disulfure avec la cystéine 347 de la protéine XK (Figure 2). Cette interaction est nécessaire pour le maintien de Kell à la surface des globules rouges (Lee, 1997; Russo et al., 1998). La protéine XK, codée par un gène *XK* situé sur le chromosome Xp21.1, porte l'antigène de haute fréquence Kx.

En contexte d'incompatibilité fœto-maternelle, pour un même niveau de gravité, les maladies hémolytiques du fœtus et du nouveau-né (MHFNN) par incompatibilité anti-Kell, présentent des taux de bilirubine moins élevés que lors d'incompatibilité RhD, aussi bien dans le liquide amniotique que dans le sérum à la naissance. De plus, en cas de MHFNN liée à des anticorps du système Kell, l'anémie fœtale semble plus liée à une inhibition de l'érythropoïèse qu'à une destruction immune périphérique des hématies de l'enfant (Daniels et al., 2003; Grant et al., 2000). Ceci est dû à l'apparition plus précoce de la glycoprotéine Kell sur les progéniteurs érythroïdes. Les anticorps peuvent également être impliqués dans l'inhibition de la myélopoïèse et de la thrombopoïèse pouvant aboutir à des thrombopénies fœtales.

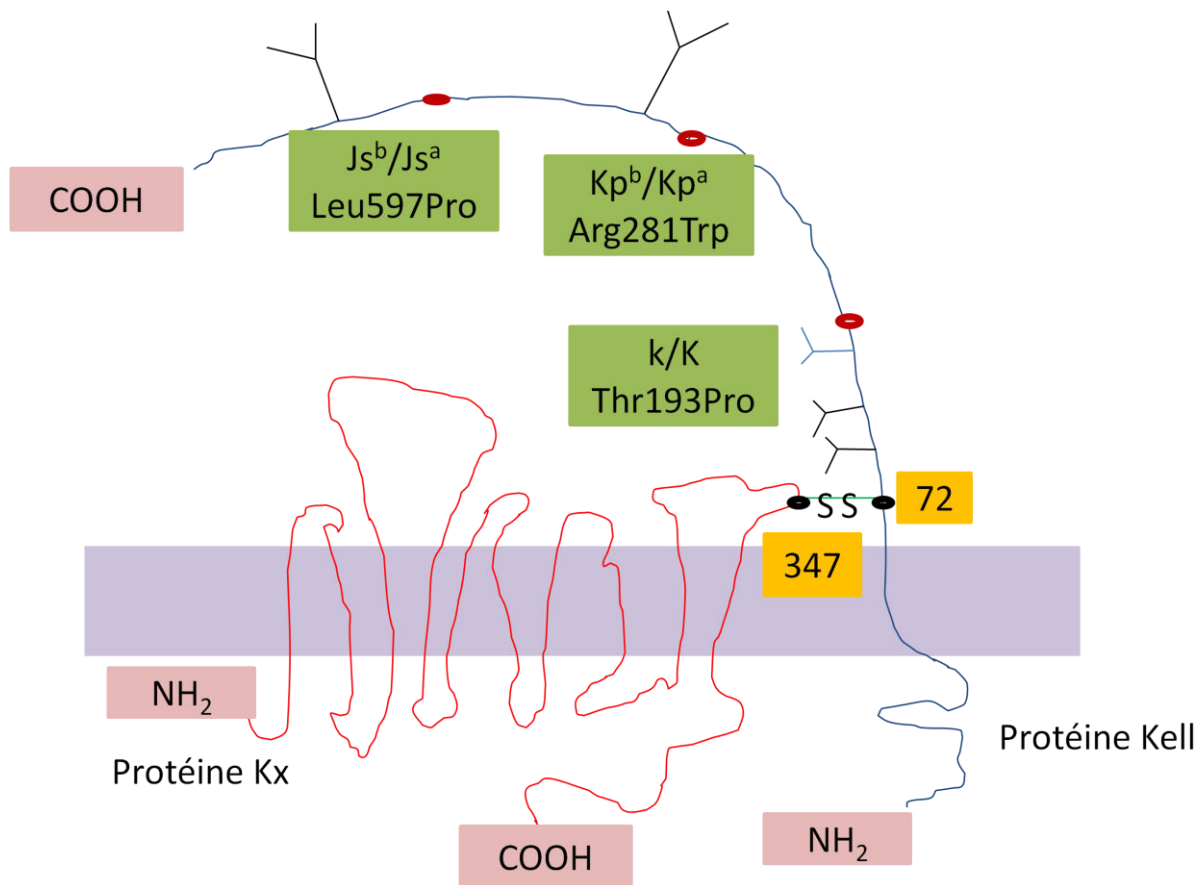


Figure 2 : Schéma des glycoprotéines Kell et Kx. Le schéma représente les polymorphismes K/k, Kp^b/Kp^a et Js^b/Js^a. Les glycoprotéines sont liées par un pont disulfure.

1. Les antigènes antithétiques KEL1/KEL2, KEL3/KEL4/KEL21

1.1. KEL1 (K) et KEL2 (k)

Les antigènes KEL1 et KEL2 sont codés respectivement par les allèles *KEL*01* et *KEL*02*. Ces deux allèles diffèrent par un polymorphisme dans l'exon 6 en c.578. La présence d'une thymine en position 578, code pour une méthionine (Met193), et est la base de l'antigénicité KEL1, alors qu'une cytosine (Thr193) code l'antigène KEL2 (Lee et al., 1995b; Yazdanbakhsh et al., 1999). Ce changement d'acide aminé affecte la N-glycosylation de la protéine Kell. En effet, la séquence Asn191-Arg192-Thr193 (portée par le produit de l'allèle *KEL*02*) est un site consensus de N-glycosylation de l'asparagine 191 ce qui n'est pas le cas de la séquence Asn191-Arg192-Met193 codée par l'allèle *KEL*01* (Clapéron et al., 2005). Il a également été montré que le produit de l'allèle *KEL*01* est inactif alors que le produit de

l'allèle *KEL*02* présente une activité enzymatique du même type que les métalloprotéases de la famille M13. Cette différence serait liée à un changement dans la conformation de Kell et non à la différence de *N*-glycosylation entre les produits des deux allèles (Clapéron et al., 2005).

Une expression faible de KEL1 a été observée chez un donneur caucasien présentant une sérine en position 193 codé par l'allèle *KEL*01.02* (Lee-Stroka et al., 2008).

Les fréquences des allèles *KEL*01* et *KEL*02* sont respectivement de 3% et 97% chez les caucasiens et de 1% et 99% chez les afro-américains (Hashmi et al., 2007). Ainsi le phénotype (K-k+) a une incidence élevée dans toutes les populations (>90%) alors que le phénotype (K+k-) est rare dans l'ensemble des populations (Tableau 2).

L'antigène KEL1 est très immunogène dans le contexte transfusionnel et obstétrical et sa détermination en immunohématologie est généralement associée au groupage ABO et RH. Il est l'anticorps le plus fréquent après les anticorps des systèmes ABO et Rh. Ainsi, environ deux-tiers des anticorps non anti-Rh sont des anti-KEL1. Une étude australienne a montré que 9,5% des femmes enceintes immunisées présentent un anti-KEL1 (Pal and Williams, 2015).

Tableau 2 : Fréquences des phénotypes du système Kell (Reid M, 2012)

Phénotype	Caucasiens	Africains
K-k+	91%	98%
K+k-	0,2%	Rare
K+k+	8,8%	2%
Kp(a-b+)	97,7%	100%
Kp(a+b-)	Rare	0%
Kp(a+b+)	2,3%	Rare
Js(a-b+)	100%	80%
Js(a+b-)	0%	1%
Js(a+b+)	Rare	19%

1.2. KEL3 (Kp^a), KEL4 (Kp^b) et KEL21 (Kp^c)

L'antigène KEL4 (Kp^b) est dit « public » dans toutes les populations alors que l'antigène KEL3 (Kp^a) est rare. L'antigène KEL21 (Kp^c) quant à lui, a été observé dans une famille anglaise mais semble plus fréquent dans la population japonaise (0,32%). Ces trois antigènes sont les produits de trois allèles codominants *KEL*03*, *KEL*04* et *KEL*21*. Les allèles *KEL*03* et *KEL*04* diffèrent par la transition 841T>C dans l'exon 8 (Lee et al., 1996) et présentent donc en position 281 de la glycoprotéine Kell un résidu tryptophane (KEL3) ou une arginine (KEL4). L'allèle *KEL*21* présente quant à lui la transition 842G>A dans l'exon 8 (associé à la présence d'une cytosine en position 841) qui se traduit par la présence d'une glutamine à la position 281.

Les globules rouges qui expriment l'antigène KEL3 présentent une faible réactivité de l'ensemble des antigènes Kell qui est due à un taux plus faible de protéine Kell à la surface cellulaire. En effet, le remplacement de l'arginine (acide aminé basique chargé) présente dans l'antigène KEL4 par un tryptophane (acide aminé aromatique non chargé) dans l'antigène KEL3 modifierait le repliement de la protéine au cours de sa synthèse, ce qui affecterait son transport à la membrane (Körmöczsi et al., 2009; Yazdanbakhsh et al., 1999).

Les fréquences des allèles *KEL*03* et *KEL*04* sont respectivement de 0,69% et 99,31% chez les donneurs de sang au Brésil (Arnoni et al., 2013).

Les anti-KEL3 peuvent causer des réactions transfusionnelles hémolytiques sévères ainsi que des MHFNN sévères (Costamagna et al., 1997; Koshy et al., 2009; Padmore et al., 2014).

2. Les phénotypes McLeod, *Kell_{mod}* et *Kell_{null}*

2.1. Phénotypes McLeod et *Kell_{mod}*

Ces deux phénotypes sont caractérisés par un affaiblissement de l'ensemble des antigènes du système Kell.

Dans le phénotype McLeod, cet affaiblissement est lié à l'absence d'expression de l'antigène Kx et une absence de l'antigène KEL20 (Km). Le phénotype McLeod est très rare et

aucune fréquence n'est décrite dans la littérature. Il est retrouvé essentiellement dans la population caucasienne (Chiaroni J, 2005), et, comme le gène *XK* est localisé sur le chromosome X, la grande majorité des patients sont des hommes (Wendel et al., 2004). La mise en évidence de cet affaiblissement antigénique constitue un des premiers éléments du diagnostic du syndrome McLeod, car l'apparition des symptômes cliniques est le plus souvent tardive et variable. La plupart des sujets McLeod présentent des symptômes cliniques (appelés syndrome neuro-acanthocytose) affectant les systèmes hématologique et nerveux (Bansal et al., 2008).

Les phénotypes *Kell_{mod}* sont caractérisés par une très faible expression des antigènes Kell, nécessitant le plus souvent des tests d'adsorption/élution, associée à une expression élevée de l'antigène Kx. Une dizaine d'allèles codants pour des phénotypes *Kell_{mod}* sont à ce jour décrits (Tableau 3) dont une grande majorité sont associés à un allèle *KEL*02*. Ceci est probablement lié à la faible fréquence de l'allèle *KEL*01* dans l'ensemble des populations. A ce jour, seuls deux allèles *KEL*01M* ont été décrits : l'un (*KEL*01M.01*) présente la transversion 578C>G dans l'exon 6 (Thr93Arg), l'autre la transition 977C>T (Pro326Leu) (Polin et al., 2014b). Les allèles codant pour des phénotypes *Kell_{mod}* (*KEL*02M*) présentent des polymorphismes faux-sens distribués sur l'ensemble de la protéine. Dans le cas des protéines codées par les allèles *KEL*02M.02*, *KEL*02M.03* et *KEL*02M.04*, il a été montré que les substitutions d'acides aminés, respectivement Tyr677Cys, Leu392Pro et Gly703Arg, ont un effet direct sur le transport des protéines Kell à la membrane (Lee et al., 2003).

Tableau 3 : Les allèles $Kell_{mod}$ (Reid M, 2012)

Allèle	Exon	Nucléotide	Acide aminé	Autre
<i>KEL*01M.01</i>	6	578C>G	Thr193Arg	KEL1 faible
<i>KEL*02M.01</i>	10	1088G>A	Ser363Asn	
<i>KEL*02M.02</i>	18	2030A>G	Tyr677Cys	
<i>KEL*02M.03</i>	9	986T>C	Leu329Pro	KEL-13
<i>KEL*02M.04</i>	19	2107G>A	Gly703Arg	
<i>KEL*02M.05</i>	16	1719C>T	Gly573Gly	
<i>KEL*02M.06</i>	4	306C>A	Asp102Glu	
	11	1298C>T	Pro433Leu	
<i>KEL*02M.07</i>	16	1763A>G	Tyr588Cys	
<i>KEL*02M.08</i>	13	1490A>T	Asp497Val	
<i>KEL*02M.09</i>	16	1757T>G	Ile586ser	
<i>KEL*02M.10</i>	8	787G>A	Gly263Arg	
<i>KEL*02M.11</i>	11	1268C>T	Ala423Val	KEL2 et KEL7 faibles
<i>KEL*02M ?</i>	10	1153C>T	Arg385Cys	

2.2. Phénotype $Kell_{null}$

Le phénotype $Kell_{null}$ (K_0) est caractérisé par une absence totale des antigènes KEL liée à la présence à l'état homozygote ou hétérozygote composite d'allèles amorphes du gène *KEL*. Différents mécanismes ont été décrits tels que des polymorphismes non-sens, des délétions nucléotidiques, des altérations de sites d'épissage (Lee et al., 2001; Uchikawa et al., 2006) mais également des polymorphismes faux-sens qui affecteraient le transport de la protéine à la membrane (Lee et al., 2001). Le phénotype $Kell_{null}$, bien qu'extrêmement rare (fréquence estimée $<1/100000$ chez les caucasiens), a été décrit en Europe, en Asie et en Afrique (Körmöczsi et al., 2007; Lee et al., 2001; Yu et al., 2001). Une vingtaine d'allèles $Kell_{null}$ sont décrits (Tableau 4) et là encore, la plupart sont des variants d'un allèle *KEL*02* (Wester et al., 2010).

Dans les populations d'origine africaine, un allèle $Kell_{null}$ (*KEL*02N.02*) caractérisé par une transition 502C>T qui introduit un codon stop à la position 128, a été décrit chez deux noirs américains. L'allèle *KEL*02N.06* quant à lui semble assez fréquent dans l'île de la Réunion. Le polymorphisme IVS3+1g>a provoque un saut de l'exon 3 qui code pour le

domaine transmembranaire de la protéine. Cet allèle a été également décrit à l'état hétérozygote dans une famille de New York et une autre du Pacifique nord (Lee et al., 2001).

Tableau 4 : Les allèles K₀(Kell_{null})

Allèle	Exon/intron	Nucléotide	Acide aminé
<i>KEL*01N.01</i>	15	1678C>G	Pro560Ala
<i>KEL*02N.01</i>	Intron 3	IVS3+1g>c	Epissage
<i>KEL*02N.02</i>	4	382C>T	Arg128Stop
	17	1790T>C	Leu597Pro
<i>KEL*02N.03</i>	4	246T>A	Cys82Stop
<i>KEL*02N.04</i>	9	1042C>T	Gln348Stop
<i>KEL*02N.05</i>	18	2027G>A	Ser676Asn
<i>KEL*02N.06</i>	Intron 3	IVS3+1g>a	Epissage
<i>KEL*020N.7</i>	6	574C>T	Arg192Stop
<i>KEL*02N.08</i>	Intron 5	IVS5-2a>g	Epissage
<i>KEL*02N.09</i>	12	1377G>A	Trp459Stop
<i>KEL*02N.10</i>	13	1420C>T	Gln474Stop
<i>KEL*02N.11</i>	8	903delG	Faux-sens, Stop
<i>KEL*02N.12</i>	Intron 8	IVS8+1g>a	Epissage
<i>KEL*02N.13</i>	Intron 8	IVS8+1g>t	Epissage
<i>KEL*02N.14</i>	9	948G>A	Trp316Stop
<i>KEL*02N.15</i>	11	1216C>T	Arg406Stop
<i>KEL*02N.16</i>	13	1477C>T	Gln493Stop
<i>KEL*02N.17</i>	14	1546C>T	Arg516Stop
<i>KEL*02N.18</i>	Obsolète		
<i>KEL*02N.19</i>	18	2023C>T	Arg675Stop
<i>KEL*02N.20</i>	15	1596G>A	Trp532Stop
<i>KEL*02N.21</i>	18	1947C>G	Tyr649Stop
<i>KEL*02N.22</i>	Intron 7	IVS7-1g>c	Epissage
<i>KEL*02N.23</i>	3	185insT	Glu239Stop

2.3. Anticorps liés aux phénotypes KEL_{null} et KEL_{mod}

Contrairement à ce qui est observé chez les patients présentant un phénotype McLeod, la morphologie et la durée de vie des hématies $Kell_{null}$ et $Kell_{mod}$ apparaissent normales. Les patients de phénotype $Kell_{null}$ peuvent développer un anti-KEL5 (également appelé anti-Ku, anticorps dirigé contre la protéine Kell) alors que ceux de phénotype $Kell_{mod}$ peuvent produire un anticorps dirigé contre le (ou les) acide(s) aminé(s) substitué(s) (on parle alors d'« anti-KEL5 like ») (Lee, 2007). Les techniques d'immunohématologie ne permettent pas une distinction aisée entre phénotypes $Kell_{null}$ et $Kell_{mod}$. En effet, du fait de la faible expression des antigènes Kell chez les sujets $Kell_{mod}$, seule l'utilisation de réactif et de techniques sensibles permet leur détection. En prenant en compte l'ensemble de ces éléments ainsi que la faible fréquence de l'antigène KEL1, plusieurs études ont suggéré que l'ensemble des phénotypes KEL2-négatif chez les donneurs soit confirmé par génotypage, de même que toute ambiguïté de phénotypage Kell (Körmöczsi et al., 2007; Matteocci et al., 2014).

3. Particularités africaines : l'antigène $KEL6$ (Js^a)

L'antigène $KEL6$ (Js^a) est considéré comme un marqueur africain. Son antigène antithétique $KEL7$ (Js^b) est lui présent dans l'ensemble des populations. L'allèle $KEL*06$ présente une cytosine en position 1790 et une guanine en position 1899 dans l'exon 17 alors que l'allèle $KEL*07$ présente une thymine en 1790 et une adénine en 1899. Le polymorphisme 1899G>A est silencieux (Leu633) alors que la transition 1790C>T se traduit par une substitution de la proline en position 547 ($KEL6$) en leucine ($KEL7$). Le résidu 597 est situé entre deux résidus cystéine (positions 596 et 599) les antigènes $KEL6$ et $KEL7$ sont donc plus sensibles aux agents réducteurs que les autres antigènes Kell (Lee et al., 1995a).

En absence de réactifs d'immunohématologie pour le typage $KEL6/KEL7$, l'expression de ces antigènes est prédite à partir des données du génotypage basé sur le polymorphisme 1790C>T. En effet, le polymorphisme 1899G>A n'est pas corrélé à 100% aux données du phénotype (Renoud et al., 2006). La fréquence de l'allèle $KEL*06$ chez les donneurs de sang est de 2,69% au Brésil, 8,18% en Martinique, 8,6% chez les noirs américains et 11,68% chez

les donneurs originaires des Comores (Arnoni et al., 2013; Byrne and Howard, 1994; Silvy et al., 2011b).

En raison de la fréquence élevée de l'antigène KEL7, les anti-KEL7 sont très rares. Ils ont cependant été impliqués dans des réactions transfusionnelles et des maladies hémolytiques du fœtus et du nouveau né (MHFNN) plus ou moins sévères (Al Riyami et al., 2014; Yuan et al., 2007). Les anti-KEL6 peuvent être responsables de réactions transfusionnelles hémolytiques et de MHFNN modérées ou sévères (Donovan et al., 1973; Levene et al., 1980; Taddie et al., 1982). La fréquence des anti-KEL6 est estimée à 2% chez les patients drépanocytaires transfusés (Castro et al., 2002) mais 88% des anti-KEL6 sont détectés chez des patients non d'origine africaine (Nikolis et al., 2011). Cependant, l'identification des anti-KEL6 n'est réalisée que lorsqu'ils sont présents au sein de mélange d'anticorps et leur fréquence dans la population générale n'est donc pas connue.

II. Système Kidd (ISBT n°009)

Le système Kidd comporte deux antigènes antithétiques Jk^a et Jk^b et un antigène de grande fréquence Jk³. Ils sont portés par la glycoprotéine UT-B1 qui est codée par le gène *SLC4A1* localisé en tandem avec le gène *SCL14A2* sur le chromosome 18 en position q12-q21. D'un point de vue fonctionnel, la glycoprotéine UT-B1 est impliquée dans le transport facilité du principal produit du catabolisme des protéines : l'urée. En dehors du globule rouge, cette glycoprotéine est retrouvée dans de nombreux organes comme la peau, la prostate, la vessie, le cerveau et le rein pour maintenir le gradient de concentration cortico-papillaire critique pour le mécanisme de concentration urinaire avec la participation d'autres transporteurs de type UT-A. Au niveau du globule rouge, le rôle physiologique du transporteur UT-B1 est de prévenir les changements importants de volume de ce dernier, dus aux variations de pression osmotique rencontrées par le globule rouge dans la circulation rénale.

1. Les antigènes Jk^a et Jk^b (JK1 et JK2) et les anticorps

C'est en 1951, à la suite d'une incompatibilité foëto-maternelle (Allen FH, 1951) qu'un alloanticorps de spécificité inconnue nommé anti-Jk^a (selon les initiales J.K. du nouveau né) est identifié dans le sérum de Mme Kidd. L'antigène antithétique Jk^b est découvert par la suite (PLAUT et al., 1953).

Le système Kidd (JK) est défini par deux allèles co-dominants *JK*01* (ou *JK*A*) et *JK*02* (ou *JK*B*) de fréquences géniques respectives de 0,525 et 0,485 dans la population caucasienne de l'Europe et du Canada (Allen FH, 1951; Chown et al., 1965; Race RR, 1975). Ces deux allèles définissent trois phénotypes courants Jk(a+b+), Jk(a+b-), Jk(a-b+) de fréquences phénotypiques respectives (Tableau 5) : 50,3, 26,3 et 23,4 dans la population caucasienne et un phénotype rare Jk(a-b-) ou Jk_{null} (PINKERTON et al., 1959). Les globules rouges de ce dernier phénotype montrent une résistance à la lyse en présence d'urée 2M, ce qui a suggéré à partir des années 1980 que le produit du gène *Kidd* pourrait être le transporteur d'urée du globule rouge. De nombreuses études de populations montrent que l'antigène Jk^a est plus présent chez les personnes originaires d'Afrique (92%) que chez les Caucasoïdes (77%) et les Asiatiques (73%) (Roy-Choudhury AK, 1988).

A partir du clonage moléculaire du transporteur d'urée des érythrocytes, la base moléculaire des spécificités antigéniques Jk^a et Jk^b a été élucidée ; elle résulte d'un polymorphisme nucléotidique G>A en position 838, se traduisant par une substitution Asp280Asn sur la 4^e boucle extracellulaire du polypeptide Jk (Olivès et al., 1997) (Figure 3). Dans un second temps, un test de génotypage *JK*01/JK*02* sur ADN génomique par PCR-RFLP a été développé, ce qui a permis d'établir l'absence de lien génétique entre le locus *Kidd* et le diabète insulino-dépendant (Olivès et al., 1997).

Les anticorps anti-Jk^a peuvent être à l'origine d'accidents hémolytiques post-transfusionnels (DEGNAN and ROSENFELD, 1965; Harrison and Popper, 1981; Morgan et al., 1967; POLESKY and BOVE, 1964; Rumsey et al., 1999) et aussi de la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né (Allen FH, 1951; GECZY and ESLIE, 1961; Greenwalt TJ, 1956; KORNSTAD and HALVORSEN, 1958). Plusieurs cas de production d'auto-anticorps anti-Jk^a sont rapportés en association avec une maladie hémolytique auto-immune (Patten et al., 1977; Sander et al., 1987). Des auto-anticorps anti-Jk^b associés ou non à une maladie auto-immune ont été également observés (Ellisor et al., 1983).

Tableau 5 : Répartition des phénotypes Kidd (Reid M, 2012).

Phénotype	Pop. Caucasiennes	Pop. Africaines	Pop. Asiatiques
Jk(a+b-)	26,3	51,1	23,2
Jk(a-b+)	23,4	8,1	26,8
Jk(a+b+)	50,3	40,8	49,1
Jk(a-b-) ou Jknul	Rare, <0,1 en Finlande	Rare	Rare, 0,1-0,3 en Polynésie

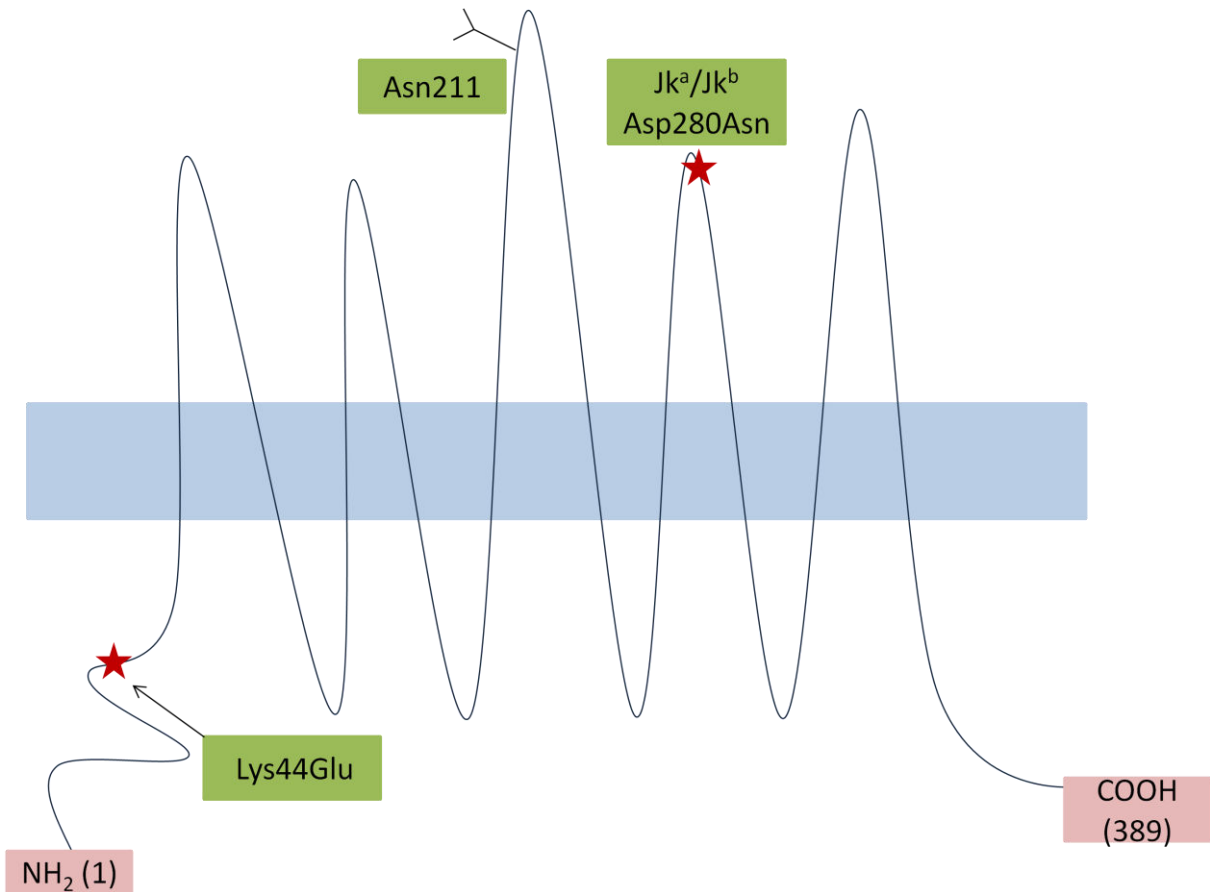


Figure 3 : Topologie de la glycoprotéine Kidd/hUT-B1 transporteur d'urée.

Topologie membranaire prédictive de la glycoprotéine Jk/hUT-B1 comprenant 389 résidus. Le site fonctionnel de *N*-glycosylation de l'asparagine en position 211 est localisé ainsi que les polymorphismes Lys44Glu (réactivité Jk^a faible) et Asp280Asn (Jk^a/Jk^b).

Plus récemment, des individus homozygotes ou hétérozygote pour *JK*01* et *JK*02* ont été identifiés avec des expressions altérées faibles ou partielles des antigènes Jk(a+) et Jk(b+). L'exploration moléculaire a révélé des allèles variants qui sont répertoriés dans le tableau 6. Une majorité de ces allèles variants a été identifiée dans la population Afro-Américaine.

Tableau 6 : Bases moléculaires de l'expression altérée des antigènes Jk^a et Jk^b.

Phénotype	Allèle	SNP	Conséquence	Origine	Anticorps produit*
Jk(a+ ^w b-)	<i>JK*01W.01</i>	130A>G 599G>A	Glu44Lys Pro196Pro	<i>Commun</i>	anti-Jk3, anti-Jk ^a
Jk(a+ ^w b-)	<i>JK*01W.02</i>	511T>C	Trp171Arg	Rare	
Jk(a+ ^w b-)	<i>JK*01W.03</i>	28G>A	Val10Met	Afro-Américain	anti-Jk ^a
Jk(a+ ^w b-)	<i>JK*01W.04</i>	226G>A	Val76Ile	Afro-Américain	anti-Jk ^a
Jk(a+ ^w b-)	<i>JK*01W.05</i>	742G>A	Ala248Thr	Rare	
Jk(a+ ^w b-)	<i>JK*01W.0 ?</i>	130A>G 1062_1067insA	Glu44Lys fs355, Lys355Stop	Afro-Américain	
Jk(a-b+ ^w)	<i>JK*02W.01</i>	548C>T	Ala183Val	Afro-Américain	
Jk(a-b+ ^w)	<i>JK*02W.02</i>	718T>A	Trp240Arg	Afro-Américain	
Jk(a-b+ ^w)	<i>JK*02W.0 ?</i>	130A>G 599G>A	Glu44Lys Pro196Pro	Afro-Américain et Brésilien	
Jk(a-b+ ^w)	<i>JK*02W.0 ?</i>	998T>A 1095T>C	Val333Asp Ser365Ser	Suisse	

*La production d'anticorps n'a pas été observée pour tous les individus porteurs de l'allèle variant

2. Le phénotype rare Jk(a-b-) ou Jk_{null}

Le phénotype nul résulte soit de l'homozygotie d'un allèle récessif silencieux *Jk* au locus Kidd (Habibi et al., 1976), soit de la présence d'un gène dominant suppresseur *In(Jk)*, indépendant du locus Kidd, qui agit en simple dose (Okubo et al., 1986). Un phénotype Jk(a-b-) transitoire a été aussi observé chez une patiente (Issitt et al., 1990) ainsi qu'un phénotype Jk(a-b-) apparent (Storry JR, 2009).

Le phénotype Jk(a-b-) de type récessif : Le sérum des individus de phénotype Jk(a-b-) de type récessif contient très souvent après sensibilisation (transfusion, grossesse) un anticorps anti-Jk3 capable d'agglutiner l'ensemble des hématies humaines, à l'exception de celles des sujets Jk_{null}. Ce type d'anticorps peut être impliqué dans des réactions hémolytiques immédiates (Issitt et al., 1990) ou retardées (DAY et al., 1965) après transfusion, ou encore dans la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né (Pierce et al., 1980). La production d'auto-anticorps anti-Jk3 a été observée durant des grossesses (O'Day, 1987) dont une est associée à une maladie hémolytique auto-immune (Ellisor et al., 1983).

A partir de 1998, la détermination moléculaire du gène *JK* ou *SLC14A1* a permis de définir les bases moléculaires du phénotype Jk(a-b-) à partir de prélèvements sanguins d'individus localisés dans différentes régions du globe (Lucien et al., 1998). Ainsi, pas moins

de 25 altérations moléculaires responsables du phénotype Jk(a-b-) de type récessif sont rapportées (Tableau 7) (Guo et al., 2013). L'ensemble de ces observations montre l'hétérogénéité moléculaire du phénotype Jk_{null} de type récessif avec quelques effets fondateurs clairement identifiés comme la substitution d'un acide aminé faux-sens Ser291Pro prédominante en Finlande et l'altération intronique IVS5-1g>a observée en Asie du sud-est et en Polynésie (Lucien et al., 1998; Sidoux-Walter et al., 2000).

Le phénotype Jk(a-b-) de type dominant : L'analyse sérologique d'individus de phénotype Jk_{null} de type dominant, révèle une diminution sévère de l'expression érythrocytaire des antigènes Jk^a, Jk^b et Jk3 (Okubo et al., 1986). Les anticorps anti-Jk^a ou anti-Jk^b peuvent être absorbés et élués de ces hématies (Moulds, 1995). L'existence d'un gène inhibiteur dominant *In(Jk)* qui agit en simple dose est supportée par l'équipe d'Okubo qui décrit une mère Jk(a+b+) avec deux filles Jk_{null}, toutes deux ayant des enfants Jk_{null}, ce qui exclut l'hypothèse de l'homozygotie d'un gène silencieux.

Le phénotype Jk(a-b-) transitoire : Une forme transitoire de phénotype Jk(a-b-) a été décrite chez une patiente russe (Issitt et al., 1990). Lorsque ses hématies ont été phénotypées Jk(a-b-), l'anti-Jk3 était présent dans son sérum ; en revanche, lorsque son phénotype était Jk(a+b-), les anticorps anti-Jk^b et anti-Jk3 étaient détectés dans son sérum. Cette situation réversible est inexplicée à ce jour.

Le phénotype Jk(a-b-) apparent : Il a été rapporté pour la première fois, un cas de phénotype Jk(a-b-) apparent résultant d'un masquage spécifique des sites antigéniques Jk^a/Jk^b/Jk3 par un auto-anticorps anti-Jk3 présent dans le sérum du patient (Storry JR, 2009).

Tableau 7 : Altérations moléculaires associées au phénotype Jk_{null} de type récessif.

Allèle	Altération	Conséquence	Origine
<i>JK*01N.01</i>	délétion de 1.6kb	absence des exons 4 et 5	Anglais, Tunisien
<i>JK*01N.02</i>	202C>T	Gln68Stop	Americain
<i>JK*01N.03</i>	582C>G	Tyr194Stop	Suisse
<i>JK*01N.04</i>	956C>T	Thr319Met	Afro-Américain
<i>JK*01N.05</i>	561C>A	Tyr187Stop	Afro-Américain Afro-Brésilien
<i>JK*01N.06</i>	IVS 5-1 g>a	saut de l'exon 6	Polynésien
<i>JK*01N.07</i>	723delA	fs241; Ile262Stop	Americain
<i>JK*01N.08</i>	866A>G	Asn269Ser	
<i>JK*01N.09</i>	27_50del	Val10_Arg17del	
<i>JK*01N.10</i>	IVS8+5g>a	saut de l'exon 8	Chinois
<i>JK*01N. ?</i>	486T>A 588A>G	Ser162Arg Pro196Pro	Origine allemande
<i>JK*01N. ?</i>	IVS10+5c	Défaut d'épissage	Brésilien
<i>JK*01N. ?</i>	516_530del	Fs175	Suisse
<i>JK*02N.01</i>	IVS 5-1 g>a	saut de l'exon 6	Polynésien
<i>JK*02N.02</i>	IVS5-1 g>c	saut de l'exon 6	Chinois
<i>JK*02N.03</i>	222C>A; 499A>G	Asn74Lys; Met167Val	Chinois, Taiwanais
<i>JK*02N.04</i>	IVS7+1g>t	saut de l'exon 7	Français
<i>JK*02N.05</i>	723delA	fs241; Ile262Stop	Hispano-Américain
<i>JK*02N.06</i>	871T>C	Ser291Pro	Finlandais
<i>JK*02N.07</i>	896G>A	Gly299Glu	Taiwanais
<i>JK*02N.08</i>	956C>T	Thr319Met	Indien
<i>JK*02N.09*</i>	191G>A	Arg64Gln	Afro-Américain
<i>JK*02N.10</i>	194G>A ; 588A>G	Gly65Asp; Pro196Pro	Afro-Américain
<i>JK*02N.11</i>	499A>G; 512G>A	Met167Val; Trp171Stop	Chinois
<i>JK*02N.12</i>	437T>C; 499A>G	Leu146Pro; Met167Val	Chinois
<i>JK*02N.13</i>	499A>G; 536C>G	Met167Val; Pro179Arg	Chinois
<i>JK*02N. ?</i>	157_159insC	fs53, Asp60Stop	Afro-Américain
<i>JK*02N. ?</i>	810G>A	Ala270Ala	Suisse
<i>JK*02N. ?</i>	190C>T	Arg64Thr	Polynésien
<i>JK*02N. ?</i>	118G>A	Gly40Ser	Polynésien

* non réactif avec un MoAb anti-Jk^b et positif avec un polyclonal anti--Jk^b

3. Fonction de transporteur d'urée

La molécule Jk/HUT-B1 s'exprime à la surface du globule rouge, des expériences d'immunohistochimie ont permis de la localiser également dans différents organes comme la prostate, le rein, la vessie, la peau et le cerveau (hippocampe). Dans le rein, elle est exprimée constitutivement dans les médullaires internes et externes au niveau des cellules endothéliales des *vasa recta* artérielles (descendantes)(Xu et al., 1997). Ainsi elle est impliquée dans les échanges à contre courant entre les *vasa recta* ascendantes et descendantes pour prévenir la perte de l'urée de la médullaire et ainsi maintenir le gradient de concentration cortico-papillaire critique pour le mécanisme de concentration urinaire qui met également en jeu d'autres transporteurs de type UT-A au niveau du canal collecteur et des anses de Henle. Au niveau du globule rouge, son rôle physiologique est de prévenir les changements importants de volume du globule rouge dus aux variations de pression osmotique rencontrées dans la circulation rénale. La glycoprotéine Jk/UT-B1 va ainsi éviter une diminution de volume du globule rouge qui pénètre dans la médullaire hyperosmotique, avec un rééquilibrage rapide avec une entrée d'urée et d'eau. De même, elle va éviter une augmentation de volume du globule chargé en urée lorsqu'il remonte de la médullaire profonde vers le vortex, en permettant une sortie de l'urée qui sera recyclée par l'échange à contre courant pour maintenir le gradient d'urée et éviter ainsi une dilution de l'urée dans la circulation générale. Chez les sujets Jk_{null} , l'absence du transporteur des cellules endothéliales des *vasa recta* artérielles, altère le mécanisme de recyclage de l'urée, ce qui permet d'expliquer pourquoi ces individus présentent une capacité réduite à concentrer l'urée. Cette dernière observation a été corroborée chez la souris transgénique invalidée pour le polypeptide UT-B1 (Yang et al., 2002). En 2011, le gène *SLC14A1* a été identifié comme un nouveau gène de susceptibilité au cancer de la vessie *via* un polymorphisme intronique : rs17674580 (Rafnar et al., 2011). Enfin, les antigènes kidd semblent jouer le rôle d'antigènes mineurs d'histocompatibilité lors de la transplantation rénale (Lerut et al., 2007; Rourk and Squires, 2012).

III. Système Dombrock (ISBT n°014)

Le système de groupe sanguin Dombrock (DO) comprend deux antigènes antithétiques Do^a et Do^b ainsi que sept antigènes de haute fréquence qui sont Gregory (Gy^a), Holley (Hy), Joseph (Jo^a), DOYA, DOMR, DOLG et DOLC (Costa et al., 2010; Karamatic Crew V, 2011; Mayer et al., 2010). Ces antigènes sont portés par une glycoprotéine insérée dans la membrane par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Figure 4). Cette glycoprotéine est un membre de la famille ADP-ribosyltransférase (ART4, CD297) (Spring and Reid, 1991; Spring et al., 1994; Telen et al., 1990) codée par le gène *ART4* localisé sur le chromosome 12p13.2-12.1 (Gubin et al., 2000; Okazaki and Moss, 1999). Ce gène est composé de 3 exons repartis sur 14 Kb d'ADN génomique. L'ARNm correspondant code une protéine de 314 acides aminés qui possède une séquence signal et un motif d'ancrage GPI (Gubin et al., 2000). Jusqu'à présent, aucune activité enzymatique n'a été démontrée, ce qui laisse sa fonction indéterminée (Koch-Nolte and Haag, 1997; Koch-Nolte et al., 1997).

1. Antigènes antithétiques Do^a et Do^b, et le phénotype Grégory (a-)

L'antigène Do^a présente une répartition variable dans les différentes populations étudiées avec une incidence de 67% chez les caucasiens et de 55% chez les afro-américains, alors que l'antigène Do^b apparaît comme un antigène de fréquence très élevée, près de 90% dans la majorité des populations étudiées (Reid M, 2012). Les deux antigènes antithétiques Do^a et Do^b sont résistants au traitement par la papaïne et la ficine, mais détruits par la trypsine et le dithiothréitol (DTT). Ils sont codés respectivement par les allèles *DO*01* et *DO*02* qui diffèrent par trois positions nucléotidiques localisées dans l'exon 2 (Rios et al., 2001a). Deux sont des transitions synonymes 378C>T (Tyr126Tyr) et 624T>C (Leu208Leu) et la troisième est une transition faux-sens 793A>G (Asn265Asp) (Gubin et al., 2000)(Figure 4). Les fréquences des allèles *DO*01* et *DO*02* sont respectivement de 37% et 63% chez les caucasiens. Sur ces bases moléculaires, en absence d'anticorps commerciaux anti-Do^a et anti-Do^b, des tests de biologie moléculaire (PCR-RFLP, PCR allèles spécifiques) ont été développés. Ce qui a permis de déterminer un génotype *DO* et d'en déduire un phénotype aussi bien pour le patient que pour le donneur (Wu et al., 2001).

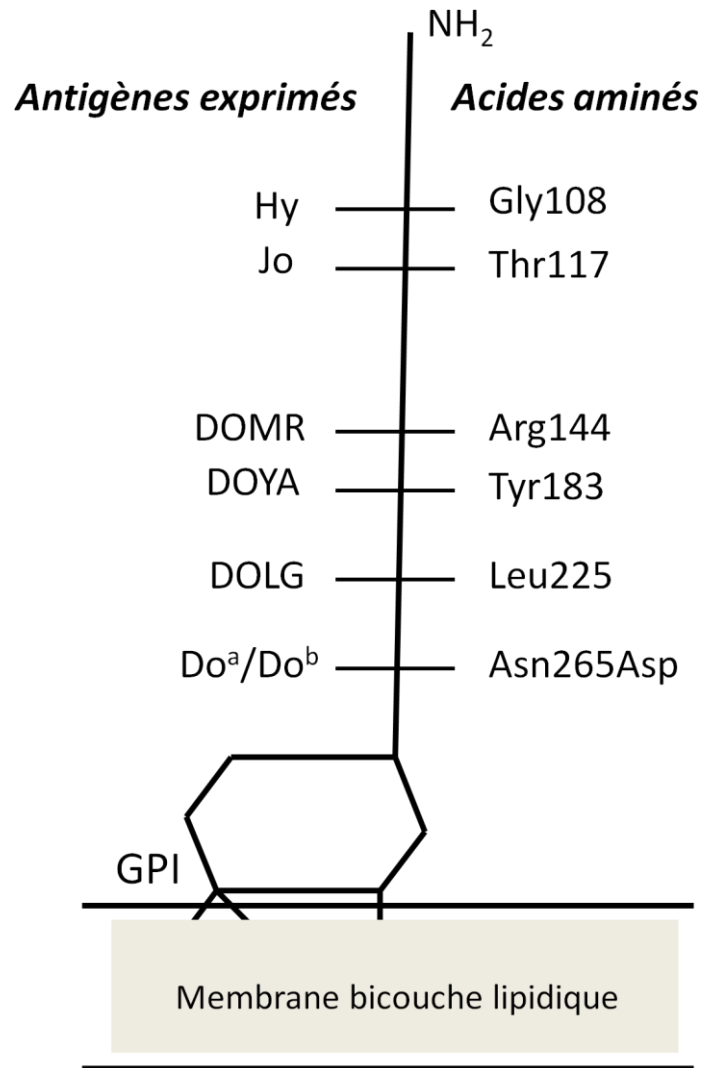


Figure 4 : Schéma de la glycoprotéine Dombrock. Le schéma représente les acides aminés associés aux antigènes de haute fréquence Dombrock

Le phénotype exceptionnel Gy(a-) considéré comme le phénotype Do_{null}, est caractérisé par une absence totale des antigènes du système DO (Tableau 8). Six mécanismes moléculaires sont à l'origine du phénotype DO_{null}. Deux correspondent à une transition au niveau de l'épissage de l'intron 1 (Rios et al., 2001b). Les trois autres mécanismes sont une délétion de 8 nucléotides dans l'exon 2 qui conduit à un décalage du cadre et un codon stop prématuré (Lucien et al., 2002) ; un codon stop prématuré dans l'exon 3 dû à la transition 442C>T (Gln48stop) (Rios et al., 2002b) et la substitution de Phe-Ser en position 62 résultant de la transition 185T>C (Westhoff et al., 2007). Le sixième

mécanisme fait intervenir une duplication de la séquence GCATTAT en position 555-556, introduisant un décalage de cadre de lecture et une terminaison prématurée de la traduction de la protéine Do au niveau de la lysine 190 (Karamatic Crew V, 2013b). Aucun phénotype DO_{null} n'a été décrit dans les populations d'Afrique subsaharienne.

Il a été documenté une hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) de type III qui présente une absence ou une réduction sévère de l'ancre GPI entraînant l'absence des polypeptides Dombrock, CD59, Cartwright (YT), Cromer (CROM) et John Milton Hagen (JMH) à la surface de la membrane érythrocytaire (Rios et al., 2001b).

Tableau 8 : Phénotypes et réactivité antigénique du système Dombrock (Reid M, 2012)

Phénotype	Do ^a	Do ^b	Gy ^a	Hy	Jo ^a	DOYA	DOMR	DOLG
Do(a+b-)	+	-	+	+	+	+	+	+
Do(a+b+)	+	+	+	+	+	+	+	+
Do(a-b+)	-	+	+	+	+	+	+	+
Hy-	-	+ _{faible}	+ _{faible}	-	-/+ _{faible}	+ _{faible}	-/+ _{faible}	+ _{faible}
Do(a+b-) Jo(a-)	+ _{faible}	-	+	+ _{faible}	-	+ _{faible}	+ _{faible}	Nt
Do(a-b+ _{faible}) Jo(a-)	-	+ _{faible}	+	+ _{faible}	-	nt	Nt	Nt
Gy(a-) : Do _{null}	-	-	-	-	-	-	-	-
DOYA-	-	-	+ _{faible}	+ _{faible}	+ _{faible}	-	+ _{faible}	+
DOMR-	-	+ _{faible}	+ _{faible}	+ _{faible}	+ _{faible}	+ _{faible}	-	Nt
DOLG-	+	-	+	+	+	nt	Nt	-

2. Particularités africaines

L'absence des antigènes de haute fréquence Hy et Jo^a est observée dans les populations originaires d'Afrique subsaharienne. L'absence de l'antigène Hy est associée à l'affaiblissement de l'expression des antigènes Do^b, Gy^a et Jo^a, et l'absence de l'antigène Jo^a à l'affaiblissement de l'expression des antigènes Do^a, Gy^a et Hy. Les allèles JO et HY dérivent respectivement des allèles DO*01 et DO*02. L'absence ou l'expression de Hy résulte d'une transversion de 323G>T (Gly108Val) sur la base d'un allèle DO*02 ce qui définit l'allèle HY2. Un variant de cet allèle HY1 présente en plus une transversion 898C>G (Leu300Val) dans

l'exon 3 (Rios et al., 2002a). Le phénotype Jo(a-) codé par allèle *JO* résulte d'une transition faux-sens 350C>T (Ile117) sur la base d'un allèle *DO*01* dans l'exon 2.

Les fréquences des allèles *DO*A*, *DO*B*, *DO*HY*, et *DO*JO* sont respectivement 27,8%, 64,7%, 4%, et 3,5% chez les Afro-américains (Hashmi et al., 2007), et 18,2%, 70,6%, 7,3% et 3,7% chez les Tékés au Congo (Chapel-Fernandes et al., 2009). Néanmoins des études ont rapporté des fréquences variables entre les allèles *HY* et *JO*, avec l'allèle *HY* cinq fois plus fréquent que l'allèle *JO* chez les donneurs de sang afro-américains, alors que l'allèle *JO* est deux fois plus fréquent que l'allèle *HY* chez les afro-brésiliens (Castilho et al., 2008). Piassi et al ont montré chez les donneurs de sang de Minas Gérais au Brésil que l'allèle *HY* est deux fois plus fréquent que *JO* (Piassi et al., 2013), ce qui suggère que les donneurs de Minas Gérais sont similaires aux donneurs afro-américains plus que les autres afro-brésiliens. Les études chez les Tékés du Congo ont montré que l'allèle *HY* (7,3%) est plus fréquent que l'allèle *JO* (3,7%) *versus* (Chapel-Fernandes et al., 2009) l'allèle *HY* (6,4%) moins fréquent que l'allèle *JO* (7,7%) (Drousseau de Coulgeans et al., 2015). Il existe donc une hétérogénéité de fréquences des allèles *HY* et *JO* dans les populations étudiées.

L'allèle *DO*DORM* codant le phénotype DOMR-négatif (DOMR-) résulte de deux transversions contigües aux positions 431C>A et 432C>A (Ala144Glu) sur la base d'un allèle *DO*B-WL*. Le phénotype DOMR- est associé à l'affaiblissement des antigènes Do^b, Gy^a, Hy, Jo^a et DOYA (Costa et al., 2010).

Parallèlement, des études moléculaires du gène *ART4* ont permis de mettre en évidence d'autres allèles variants (Tableau 9) (Baleotti et al., 2006; Baleotti et al., 2011; Chapel-Fernandes et al., 2009; Costa et al., 2010; Gubin et al., 2000; Hashmi et al., 2005; Mayer et al., 2010; Rios et al., 2002a). Les trois allèles *DO*A-WL*, *DO*B-WL* et *DO*A-SH* ont été identifiés au Brésil (Baleotti et al., 2006; Baleotti et al., 2011). Les allèles *DO*A-WL* et *DO*B-WL* se caractérisent par la transversion 898C>G dans l'exon 3 qui se traduit pas la substitution d'acide aminé Leu300Val sur la base respectivement des allèles *DO*A* et *DO*B*. La transversion 898C>G est également présente dans l'allèle variant *HY*01* caractéristique des individus originaires d'Afrique sub-saharienne (Rios et al., 2002a). L'allèle *DO*A-SH* se caractérise par une transition synonyme 624C>T sur la base d'un allèle *DO*A*. Les allèles *DO*B-SH* et *DO*A-HA* ont été identifiés dans une cohorte composée de donneurs de sang

New Yorkais (Hashmi et al., 2005) et se traduisent respectivement par la transition synonyme 378T>C sur la base d'un allèle *DO*B* et la transition 378C>T à partir d'un allèle *DO*A*. Les fréquences des allèles *DO*B-SH* et *DO*A-HA* sont de 1,5% et 1,6% chez les afro-américains.

Les allèles *DO*B-SH-Q149K* et *DO*B-I175N* identifiés chez les Tékés au Congo (Chapel-Fernandes et al., 2009) se caractérisent respectivement par la transversion 445C>A (Gln149Lys) et la transversion 524T>A (Ile175Asn) sur la base d'un allèle *DO*B*. Les fréquences caractérisées chez les Tékés sont de 1,2% pour chaque allèle variant. Deux nouveaux variants *DO*B* ont été identifiés chez les San en Namibie (Drousseau de Coulgeans et al., 2015), l'allèle *DO*B-Ile5Thr* caractérisé par une transition 14C>T (Ile5Thr) et l'allèle *DO*B-Trp266Arg* caractérisé par une transversion 796T>A (Trp266Arg).

En absence de description phénotypique due à la difficulté de disposer de prélèvements de sang frais, des études par cytométrie de flux de l'expression des différents allèles variants Dombrock dans des cellules K562 transduites par des vecteurs lentiviraux ont montré une surexpression des allèles *DO*A-SH*, *DO*A-WL* et *DO*DOYA* par rapport à l'allèle *DO*A* (de Coulgeans et al., 2014). Par rapport à l'allèle *DO*B*, les allèles *DO*B-SH*, *DO*B-WL* *DO*B-SH-Q149K* sont sous exprimés (Chapel-Fernandes et al., 2009; de Coulgeans et al., 2014), et les allèles *DO*B-I175N* *DO*B-Ile5Thr*, *DO*B-Trp266Arg* sont surexprimés (Chapel-Fernandes et al., 2009; Drousseau de Coulgeans et al., 2015).

Tableau 9 : Bases moléculaires des Allèles *Dombrock*.

Allèle		Nucléotide (acides aminés)							
<i>Autre</i>	<i>ISBT</i>	<i>323(108)</i>	<i>350(117)</i>	<i>378</i>	<i>624</i>	<i>793(265)</i>	<i>898(300)</i>	<i>Autres</i>	
DO*A	<i>DO*01</i>	G (Gly)	C (Thr)	C	T	A (Asn)	C (Leu)		
<i>DO*JO1</i>	<i>DO*01.-05</i>	G (Gly)	T (Ile)	T	T	A (Asn)	C (Leu)		
<i>DO*DOYA</i>	<i>DO*01.-06</i>	G (Gly)	C (Thr)	C	T	A (Asn)	C (Leu)	547T>G Tyr183Asp	
<i>DO*DOLG</i>	<i>DO*01.-08</i>	G (Gly)	C (Thr)	C	T	A (Asn)	C (Leu)	674T>A,Leu225Gln	
<i>DO*DOLC^</i>	<i>DO*01.-09</i>	G (Gly)	C (Thr)	C	T	A (Asn)	C (Leu)	566C>T Thr189Met	
<i>DO*A-HA</i>		G (Gly)	C (Thr)	T	T	A (Asn)	C (Leu)		
<i>DO*A-SH</i>		G (Gly)	C (Thr)	C	C	A (Asn)	C (Leu)		
<i>DO*A-WL</i>		G (Gly)	C (Thr)	C	T	A (Asn)	G (Val)		
DO*B	<i>DO*02</i>	G (Gly)	C (Thr)	T	C	G(Asp)	C (Leu)		
<i>DO*HY1</i>	<i>DO*02.-04</i>	T (Val)	C (Thr)	C	C	G(Asp)	G (Val)		
<i>DO*HY2</i>	<i>DO*02.-04</i>	T (Val)	C (Thr)	C	C	G(Asp)	C (Leu)		
<i>DO*JO2</i>	<i>DO*02.-05</i>	G (Gly)	T (Ile)	T	C	G(Asp)			
<i>DO*DOMR</i>	<i>DO*02.-07</i>	G (Gly)	C (Thr)	T	C	G(Asp)	G (Val)	431C>A et 432C>A Ala144Glu	
<i>DO*B-SH</i>		G (Gly)	C (Thr)	C	C	G(Asp)	C (Leu)		
<i>DO*B-SH-Q149K</i>		G (Gly)	C (Thr)	C	C	G(Asp)	C (Leu)	445C>A Gln149Lys	
<i>DO*B-WL</i>		G (Gly)	C (Thr)	T	C	G(Asp)	G (Val)		
<i>DO*B-I175N</i>		G (GLY)	C (Thr)	T	C	G(Asp)	C (Leu)	524T>A ; Ile175Asn	

3. Autres allèles

Parallèlement, d'autres allèles ont été décrits. L'allèle *DOYA* identifié en Turquie, qui se caractérise par une transversion 547T>G (Tyr183Asp) sur la base d'un allèle *DO*A* (Lomas-Francis and Reid, 2010). Le phénotype *DOYA* négatif se caractérise par un antigène Do^a apparemment silencieux et un affaiblissement des antigènes Gy^a , Hy et Jo^a (Mayer et al., 2010). L'allèle *DOLG* décrit au Sri Lanka se caractérise par une transversion 674T>A (Leu225Gln) sur la base d'un allèle *DO*A* (Costa et al., 2010). L'allèle *DOLC* décrit chez une femme caucasienne se caractérise par une transition 566C>T (Thr189Met) sur la base d'un allèle *DO*A* (Karamatic Crew V, 2013a).

4. Anticorps

Les antigènes Do^a et Do^b sont peu immunogènes et leurs anticorps sont surtout retrouvés au sein de mélanges dans le sérum de patients transfusés, ce qui les rend difficile à identifier tout comme les allo-anticorps anti- Hy et anti- Jo^a (Strupp et al., 1998). Seul l'anti- Gy^a est souvent identifié comme une spécificité unique dans le sérum. Ces anticorps usuellement de classe IgG ont toujours une origine allo-immune. Ils sont préférentiellement détectables en test indirect à l'antiglobuline et de manière optimale dans la technologie d'agglutination sur colonne *via* l'utilisation de globules rouges traités par la papaïne ou par la ficine. Les allo-anticorps anti- Do^a et anti- Do^b , anti- Jo^a et anti- Gy^a peuvent être à l'origine de réactions transfusionnelles plus ou moins modérées (Halverson et al., 1994; Judd and Steiner, 1991). Parallèlement, ces allo-anticorps ne provoquent généralement pas de MHFNN, bien que les globules rouges de certains bébés positifs pour les antigènes du système Dombrock montrent un test d'agglutination direct positif (Roxby et al., 1994).

Des anticorps monoclonaux murins ont été produits à partir de cellules 293T transfectées exprimant la glycoprotéine DO. Seuls des anticorps anti-protéine ont été obtenus en l'absence de spécificité restreinte Do^a/Do^b . D'où l'intérêt des techniques de génotypage pour l'identification des allèles *DO* qui permettent aujourd'hui dans une certaine mesure, d'améliorer la transfusion des patients immunisés, en particulier pour ceux qui reçoivent des transfusions chroniques (Koch-Nolte and Haag, 1997; Okazaki and Moss, 1999).

IV. Système Duffy (ISBT n°008)

Le système de groupe sanguin Duffy (FY) est composé de deux antigènes antithétiques FY1 (Fy^a) et FY2 (Fy^b), et trois antigènes de haute fréquence FY3, FY5 et FY6. Contrairement aux antigènes FY3 et FY5, les antigènes FY1, FY2 et FY6 sont détruits par les enzymes protéolytiques. Ces antigènes sont exprimés sur la glycoprotéine Duffy (ou CD234) insérée dans la membrane par 7 domaines transmembranaires (Figure 5). L'extrémité amino-terminale de la protéine est extracellulaire et contient trois sites potentiels de *N*-glycosylation. A l'opposé, l'extrémité carboxy-terminale est intracellulaire. Le gène *DARC* (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines*) localisé sur le chromosome 1q22-q23 s'étend sur 1,5 kb et est composé de deux exons (Iwamoto et al., 1996). *DARC* possède deux promoteurs et code pour deux protéines : une forme α (la première identifiée) qui compte 338 acides aminés et dont le transcrit est le moins fréquent (forme mineure) ; et la forme β , dite forme majeure, qui possède 336 acides aminés. Ces deux formes protéiques diffèrent par leur domaine N-terminal où les six premiers acides aminés de la forme β (GNCLHR) sont remplacés par huit acides aminés dans la forme α (ASSGYVLQ). Cette différence de structure n'est pas biologiquement significative. La forme α est exprimée par les cellules endothéliales des capillaires et des veinules, les cellules de l'épithélium rénal, les cellules des alvéoles pulmonaires et les cellules de Purkinje. Par contre, la forme β est strictement érythroïde *via* la présence d'un promoteur érythroïde spécifique.

D'un point de vue fonctionnel, la molécule FY est un récepteur des chimiokines. Il est également le récepteur de *Plasmodium vivax* et *Plasmodium knowlesi*, des parasites responsables du paludisme (Hadley and Peiper, 1997; Schmid et al., 2012).

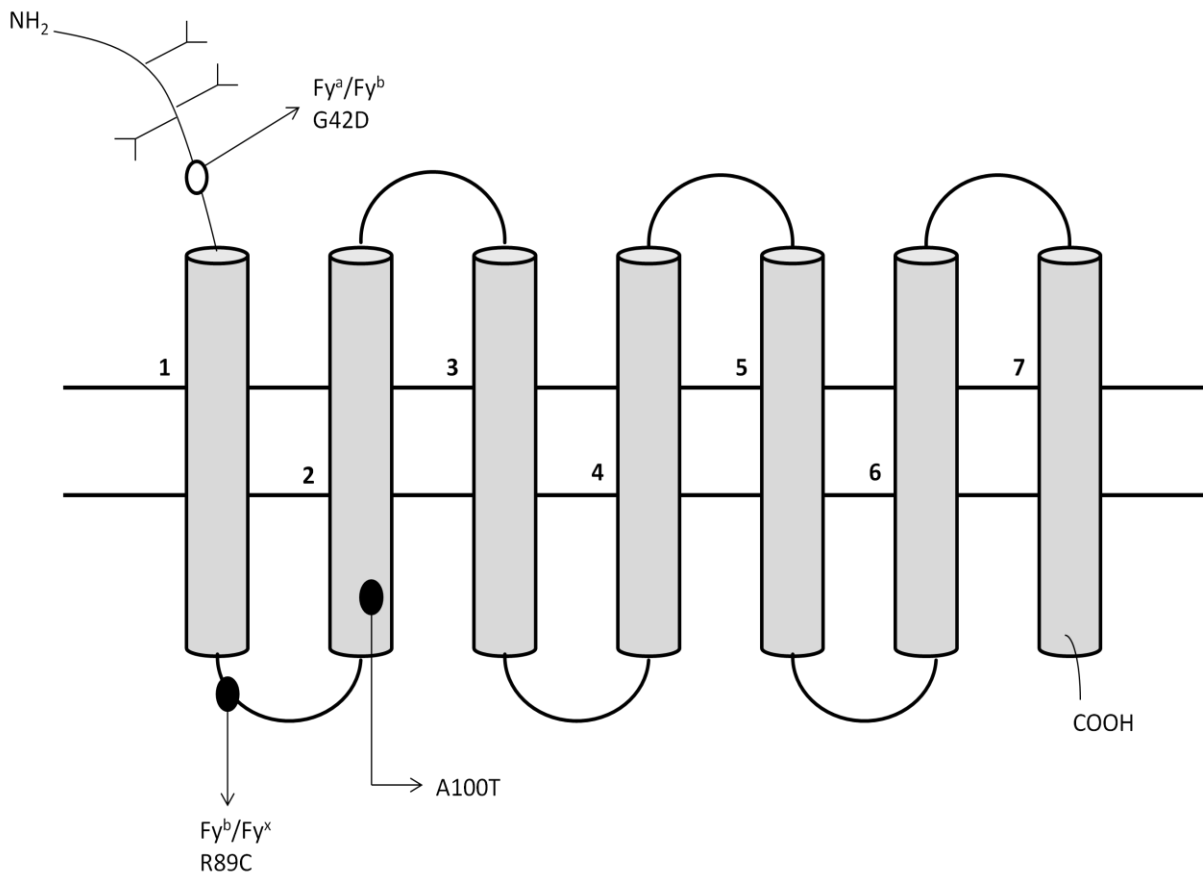


Figure 5 : Schéma de la protéine Duffy. Le schéma représente le polymorphisme associé aux antigènes Fy^a et Fy^b.

1. Les antigènes FY1 (Fy^a) et FY2 (Fy^b)

Les antigènes FY1 et FY2 se développent chez le fœtus durant la grossesse et sont bien exprimés à la naissance. Ce sont les produits de deux allèles codominants *FY*01* et *FY*02* qui résultent de la transition 125G>A dans l'exon 2. Ainsi, l'acide aminé en position 42 est soit une glycine (Gly42 produit de l'allèle *FY*01*), soit un acide aspartique (Asp42, produit de l'allèle *FY*02*) (Chaudhuri et al., 1995; Iwamoto et al., 1996; Mallinson et al., 1995; Tournamille et al., 1995b). L'implication directe du polymorphisme 125G>A dans l'expression des antigènes FY1 et FY2 a été démontrée par expression de chacun des deux allèles dans des cellules COS-7 (Chaudhuri et al., 1995; Tournamille et al., 1995b). Un polymorphisme additionnel associé à l'allèle *FY*02* (298G>A, Ala100Thr) est observé chez environ 15% des caucasiens. Ce polymorphisme n'affecte pas l'expression de l'antigène FY2 (Chaudhuri et al., 1995; Estalote et al., 2005; Neote et al., 1994; Olsson et al., 1998b). La comparaison du gène

DARC humain avec le gène des primates non humains indique que le gène ancestral semble être l'allèle *FY*02* (Chaudhuri et al., 1995; Schmid et al., 2012).

Les fréquences des allèles *FY*01* et *FY*02* sont respectivement de 41% et 59% chez les caucasiens. Dans les populations noires, en raison de la fréquence élevée d'un allèle silencieux qui sera présenté dans la partie 4, ces fréquences sont respectivement de 3% et 17,5% (Olsson et al., 1998a; Yan et al., 2001). La fréquence des phénotypes associés aux allèles *FY*01* et *FY*02* est présentée dans le tableau 10.

Les anti-FY1 sont plus fréquents que les anti-FY2 (9% vs 1% des patients immunisés) (Schonewille et al., 2006). Une association entre les anti-FY1 et les allèles *HLA-DRB1*04* et *HLA-DRB1*15* a été observée (Picard et al., 2009; Schonewille et al., 2014). Les anti-FY1 et anti-FY2 peuvent entraîner des hémolyses post-transfusionnelles de gravité variable, parfois létales. Ils sont plus rarement impliqués dans la MHFNN.

Tableau 10 : Occurrence des phénotypes Duffy (Reid M, 2012)

Phénotype	Caucasiens	Noirs
Fy(a+b-)	17	9
Fy(a-b+)	34	22
Fy(a+b+)	49	1
Fy(a-b-)	Très rare	68

3. Les phénotypes faible et null

Les phénotypes FY faible sont observés dans les populations caucasiennes et sont liés à la présence d'un polymorphisme faux-sens qui peut être porté soit par un allèle *FY*01* soit par un allèle *FY*02* (Tableau 11). Parmi les allèles codant un phénotype FY2 faible, le *FY*02M.01* (également appelé *FY*X*) est le plus fréquent avec une fréquence de 1,5 à 2,5% (Meyer et al., 2014a; Olsson et al., 1998b). L'allèle *FY*02M.01* diffère de l'allèle *FY*02* par les transitions 265C>T (Arg89Cys) et 298G>A (Ala100Thr) dans l'exon 2 (Gassner et al., 2000; Olsson et al., 1998b; Tournamille et al., 1998). Le remplacement de l'arginine en position 89 par une cystéine affecterait le transport de la protéine à la membrane. L'expression des

antigènes FY2, FY3 et FY6 est alors fortement déprimée (Buchanan et al., 1976; Habibi et al., 1977; Habibi et al., 1980; Tournamille et al., 1998; Yazdanbakhsh et al., 2000) et leur détection dépend directement de la qualité des réactifs et de la sensibilité des techniques. La difficulté de détection de l'antigène FY2 peut s'avérer problématique chez les donneurs. Aucune immunisation anti-FY2 n'a été à ce jour décrite chez des porteurs d'allèle *FY*02M.01*. Récemment, un nouvel allèle *FY*01* nommé *FY*01/01W.01* portant les polymorphismes 125G, 265T et 298G a été décrit (Lopez M, 2015).

Il existe des altérations du gène *DARC* qui conduisent à la non expression des protéines α et β et sont responsables du phénotype FY_{null} . Le phénotype FY_{null} est exceptionnel dans les populations non africaines et correspond à un vrai phénotype FY_{null} . Il peut impliquer différents allèles dans les populations non africaines, et une dizaine d'allèles silencieux ont été décrits sur la base d'allèles *FY*01* ou *FY*02* (Tableau 11). Ces allèles présentent (i) soit un polymorphisme non-sens (Rios et al., 2000), (ii) soit une délétion d'une ou plusieurs bases conduisant à un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré (Tsuneyama H, 2000), (iii) soit un polymorphisme dans la région promotrice, (iiii) soit un polymorphisme faux-sens (Mallinson et al., 1995; Rios et al., 2000).

Les personnes homozygotes ou hétérozygotes composites pour ce(s) allèle(s) n'expriment aucun des antigènes du système Duffy aussi bien dans les cellules érythroïdes que les tissus non érythroïdes et, en cas de stimulation obstétrico-transfusionnelle, elles peuvent produire un anti-FY3 de titre élevé.

Tableau 11 : Les allèles faible et null du système Duffy.

Antigène affecté	Phénotype	Allèle	Nucléotide(s)	Acide(s) aminé(s)	Ethnie	
FY1	faible	<i>FY*01M.01</i>	265C>T	Arg89Cys	Caucasien	
		<i>FY*01M.02</i>	265C>T 298G>A	Arg89Cys Ala100Thr		
		<i>FY*01M. ?</i>	680G>A	Gly227Glu		
	nul	<i>FY*01N.01</i>	-67t>c			Papouasie n ^{elle} Guinée Brésil, Amazonie
		<i>FY*01N.02</i>	281_295del	Pro94fsX	Caucasien	
		<i>FY*01N.03</i>	408G>A	Trp136X	Caucasien	
		<i>FY*01N.04</i>	287G>A	Trp96X	Caucasien	
		<i>FY*01N.05</i>	327delC	Phe109fsX	Japonais	
		<i>FY*01N.06</i>	395G>A	Gly132Asp	Afro Américain	
		<i>FY*01N.07</i>	719del,G	Gly240fsX		
<i>FY*01N. ?</i>	-69t>c		Caucasien			
<i>FY*01N. ?</i>	296del201, ins9	Leu99fs	Thailandais			
FY2	faible	<i>FY*02M.01</i>	265C>T 298G>A	Arg89C>T Ala100Thr	Caucasien	
		<i>FY*02M.02</i>	145G>T 265C>T 298G>A	Ala49Ser Arg89C>T Ala100Thr	Caucasien	
		<i>FY*02M.03</i>	266G>A	Arg89His	Caucasien	
		<i>FY*02M.04</i>	901C>T	Pro303Ala	Caucasien	
	null	<i>FY*02N.01</i>	-67t>c			Africain
		<i>FY*02N.02</i>	407G>A	Trp136X		
		<i>FY*02N.03</i>	781G>A	Gly261Arg		
		<i>FY*02N. ?</i>	895G>A	Ala299Thr	Caucasien	
		<i>FY*02N. ?</i>	179delCT	Ser60fsX	Afro Américain	
		<i>FY*02N. ?</i>	151delT	Cys51fs	Caucasien	

4. Le phénotype FY :-1,-2 dans les populations afro-antillaises

Le phénotype FY :-1,-2 est largement répandu dans les populations afro-antillaises et est lié à la présence de l'allèle *FY02.N01* (également appelé *FY*Fy*) (Howes et al., 2011). Il concerne 68% des afro-américains et sa fréquence peut atteindre 100% dans certaines régions d'Afrique de l'ouest (Howes et al., 2011; Tournamille, 2000). Ce phénotype est également observé avec une large prévalence dans les populations du Maghreb, de Madagascar ou de la péninsule arabique. Il est lié à la présence à l'état homozygote de l'allèle *FY*02N.01* qui diffère de l'allèle *FY*02* par la transition -46t>c dans la région promotrice de la forme majeure (Tournamille et al., 1995a). Ce polymorphisme est situé au niveau du site de liaison du facteur de transcription érythroïde GATA-1 (ttatct). L'abolition du site consensus de liaison de GATA-1, supprime la transcription à partir du promoteur érythroïde alors que les ARNm sont présents dans les tissus non-érythroïdes (Chaudhuri et al., 1997; Peiper et al., 1995).

En cas de transfusion incompatible des patients d'origine afro-antillaise de phénotype FY :-1,-2, les anticorps synthétisés sont essentiellement des anti-FY1 et plus rarement des anti-FY3 (Le Pennec et al., 1987). De ce fait, La prévention de l'allo-immunisation transfusionnelle chez les sujets FY :-1,-2 africains pourrait passer par la sélection d'unités Fy(a-b+).

L'amplification sélective chez les noirs d'Afrique de l'ouest de l'allèle *FY*02N.01*, peut être considérée comme une réponse adaptative de résistance à l'agent paludéen *Plasmodium vivax* et cela sans que les fonctions potentielles de DARC comme récepteur de chimiokines ne soient altérées dans les tissus non-érythroïdes. Cet avantage sélectif de la population noire de l'Afrique de l'ouest fait qu'aujourd'hui le parasite a disparu de cette région puisque le cycle biologique de *P. vivax* est brisé faute d'hôte (Howes et al., 2011).

V. Système RH (ISBT n°004)

Parmi les 36 systèmes de groupes sanguins humains définis par l'International Society of Blood Transfusion (ISBT), le système RH est l'un des plus polymorphes. Ainsi il se compose de plus de 50 antigènes dont les cinq principaux sont les antigènes RhD, RhC, RhE, RHc et Rhe. Ce système revêt une importance clinique majeure du fait du haut degré d'immunogénicité de ses antigènes. En effet, les anticorps dirigés contre les antigènes du système RH sont impliqués dans les accidents immuno-hémolytiques transfusionnels, dans la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau né, mais aussi dans les anémies hémolytiques auto-immunes. Enfin, les anomalies fonctionnelles et morphologiques des globules rouges (GR) déficitaires en protéines Rh (Rh_{null}) indiquent que les protéines Rh sont nécessaires à l'intégrité de la membrane du globule rouge pour lui conférer sa forme bi-concavité et sa grande déformabilité.

1. Les protéines Rh et le locus RH

1.1. Protéines Rh

Les protéines RhD et RhCE sont composées chacune de 417 acides aminés. Ce sont des protéines palmitoylées organisées en 12 domaines transmembranaires et exprimées au sein d'un complexe, « le complexe RH ». L'étude des rares individus n'exprimant ni protéine RhD, ni protéine RhCE (phénotype Rh_{null}) à permis d'élucider en partie les fonctions des protéines Rh. En effet, tous les patients de phénotype Rh_{null} présentent, en plus d'anomalies d'expression de protéines membranaires (Rh, RhAG, LW, CD47, GPB) un syndrome clinique plus ou moins sévère caractérisé par une anémie hémolytique chronique, une fragilité osmotique, des anomalies morphologiques des globules rouges (stomato sphérocytose), des anomalies de transport des cations ainsi que de l'organisation des phospholipides membranaires. Les individus n'exprimant que la protéine RhCE (phénotypes RhD-négatif) ou que la protéine RhD (phénotypes D-/-) ne présentent pas ce syndrome.

Le complexe Rh est un trimère de protéines RhAG (*Rh-associated Glycoprotein*) et Rh (RhD et RhCE) auquel sont associées, par des liaisons non-covalentes, les protéines accessoires CD47, LW et GPB. Le complexe est stabilisé par des interactions impliquant les domaines amino- et carboxy-terminaux des protéines Rh et RhAG et par leur association

directe ou indirecte au cytosquelette (Mouro-Chanteloup et al., 2003; Nicolas et al., 2003). En absence de RhAG, le complexe RH n'est pas exprimé à la membrane, ce qui, en perturbant l'organisation du cytosquelette, explique les anomalies morphologiques observées chez les individus Rh_{null} . Les protéines Rh, la bande 3 (AE1, *ammonium exchanger 1*) et l'ankyrine forment un macro-complexe membranaire constitutif qui régule le transport de HCO_3^- voire de NH_4^+ (Nicolas et al., 2006).

1.2. Locus RH

En 1986 Tippett propose le modèle d'un locus unique contenant un gène *RHD* codant l'antigène RhD et un gène *RHCE* codant les antigènes RhC, RhE, Rhc et Rhe (Tippett, 1986). Ce modèle sera conforté par des études de Southern blot (Colin et al., 1991) et définitivement validé après transfection des transcrits *RHD* et *RHCE* dans des cellules K562 (Smythe et al., 1996). Le locus *RH* est situé sur le chromosome 1 (1p34.1-1p36), les deux gènes qui présentent 98.6% de similarité sont orientés en tandem inversé et séparés par le gène *SMP1*. Les gènes *RHD* et *RHCE* sont composés chacun de 10 exons et leur structure exon-intron est très proche (Okuda et al., 2000). Le gène *RHD* est flanqué de deux boîtes Rhésus, fortement homologues.

2. Bases moléculaires des antigènes communs

2.1. Polymorphisme associé aux phénotypes RhD positif et RhD négatif

Le phénotype RhD positif est caractérisé par l'expression de l'antigène RhD alors que le phénotype RhD négatif est caractérisé par son absence. Dans les populations d'origine européenne, le phénotype RhD négatif est presque exclusivement lié à une délétion du gène *RHD* à l'état homozygote (Colin et al., 1991). Cette délétion est le résultat d'une recombinaison entre les deux boîtes Rhésus produisant une séquence hybride, la boîte Rhésus hybride (Wagner and Flegel, 2000). Ainsi, les sujets RhD positifs peuvent être homozygotes ou hémizygotés pour le gène *RHD*. Des allèles *RHD* silencieux présentant des polymorphismes non-sens ou des altérations ou des insertions/délétions d'une base ont également été décrits chez quelques sujets d'origine européenne, mais ces cas sont très

rare. D'autres mécanismes fréquents dans les populations d'origine afro-antillaise ont été décrits et seront développés dans la partie 3.

2.2. Polymorphismes des antigènes RhC/c, RhE/e

Les quatre allèles *RHCE* (*RHCE*Ce*, *RHCE*cE*, *RHCE*ce*, *RHCE*CE*) se distinguent par un ou plusieurs SNPs localisés dans les exons 1, 2 et 5 (Figure 6). Les antigènes antithétiques RhC et Rhc sont associées à quatre substitutions d'acides aminés dont trois sont intracellulaires Cys16Trp (48C>G), Ile60Leu (178A>C) et Ser68Asn (203G>A). La quatrième, Ser103Pro (307T>C), est extracellulaire et conduit à elle seule à l'expression d'un antigène RhC faible (Noizat-Pirenne et al., 1999; Vege et al., 2013). D'un point de vue moléculaire, l'expression de l'antigène RhC est liée à une conversion génique de l'exon 2 du gène *RHD* dans le gène *RHCE*, et présente une insertion de 109 pb dans l'intron 2 de l'allèle *RHCE*C*. Cette insertion spécifique est considérée comme la signature moléculaire de l'allèle *RHCE*C* (Montpetit et al., 2006). L'antigénicité RhE/e est codée par un seul polymorphisme dans l'exon 5 du gène *RHCE* : 676G>C (Ala226Pro).

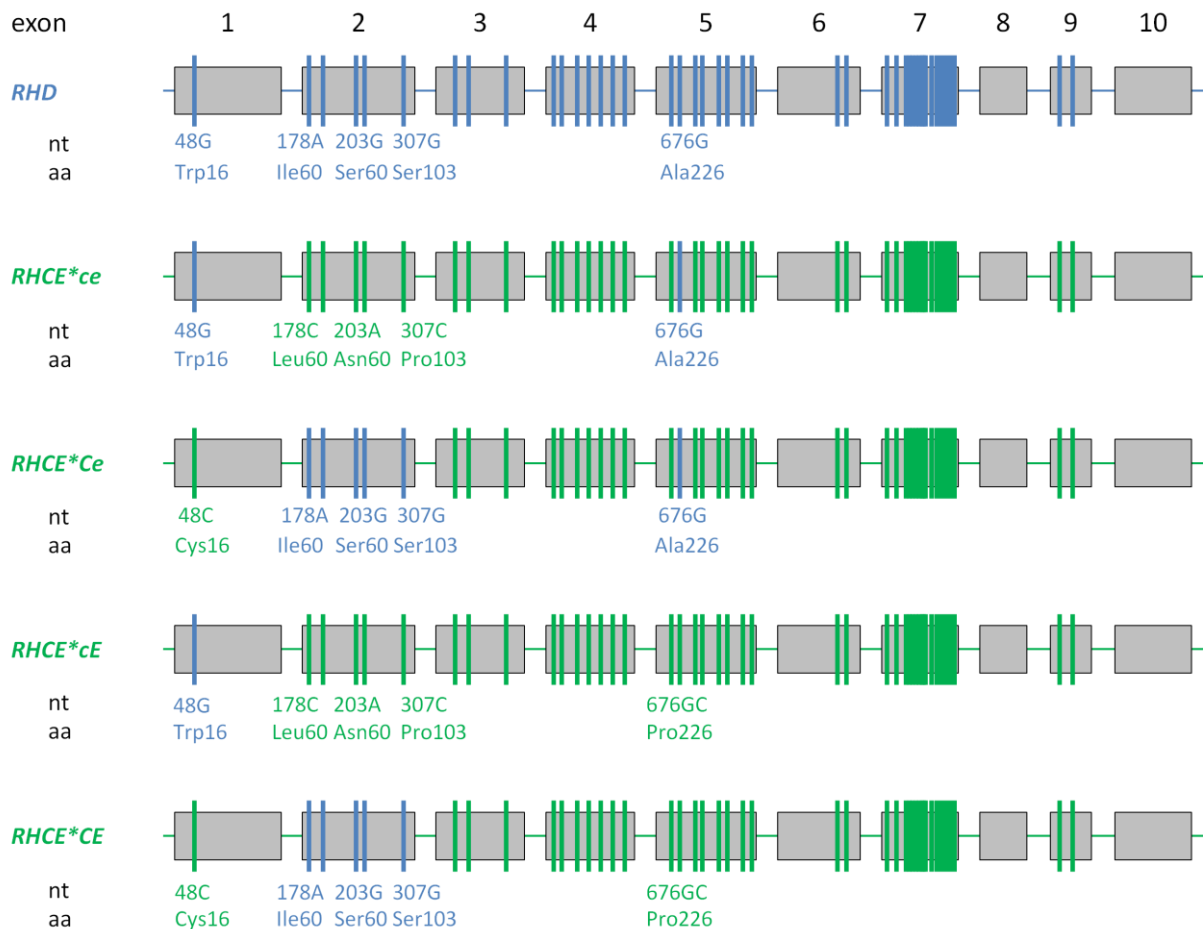


Figure 6 : Représentation du gène *RHD* et des allèles *RHCE*. Les 10 exons sont représentés par les rectangles, les traits représentent les polymorphismes qui distinguent le *RHD* (en bleu) du *RHCE* (en vert). Les polymorphismes faux-sens impliqués dans les différents allèles sont notés en dessous. nt, nucléotide; aa, acide aminé.

2.3. Distribution des phénotypes et haplotypes RH

Du fait de la structure du locus *RH*, les gènes *RHD* et *RHCE* sont en déséquilibre de liaison. En fonction des allèles *RHD* et *RHCE* présents, huit haplotypes sont décrits et dérivent de l'haplotype ancestral *Dce* (Carritt et al., 1997). Plusieurs études suggèrent que la pression de sélection est intervenue dans la genèse et le maintien des différents haplotypes (Innan, 2003; Kitano and Saitou, 1999; Perry et al., 2012). Les données issues du phénotype montrent que la distribution des différents haplotypes varie entre les populations Européennes, Asiatiques, et Afro-Antillaises (Tableau 12). Ainsi le phénotype RhD négatif a une fréquence de 16.8% dans les populations Européennes, de 8% chez les Afro-Antillais alors qu'il est très rare (0.3%) dans les populations asiatiques (Reid M, 2012).

Tableau 12 : Fréquence des phénotypes RH dans différentes populations.

Haplotype			Fréquences		
Nomenclature			(Reid M, 2012)		
Fisher	Wiener	Rosenfeld	Europe	Afrique	Asie
<i>DCE</i>	R^1	<i>RH:1,2,-3,-4,5</i>	0,42	0,17	0,7
<i>DcE</i>	R^2	<i>RH:1,-2,3,4,-5</i>	0,14	0,11	0,21
<i>Dce</i>	R^0	<i>RH:1,-2,-3,4,5</i>	0,04	0,40	0,03
<i>DCE</i>	R^Z	<i>RH:1,2,3,-4,-5</i>	0	0	0,001
<i>dCe</i>	r'	<i>RH:-1,2,-3,-4,5</i>	0,02	0,02	0,02
<i>dcE</i>	r''	<i>RH:-1,-2,3,4,-5</i>	0,01	0	0
<i>dce</i>	r	<i>RH:-1,-2,-3,4,5</i>	0,37	0,26	0,03
<i>dCE</i>	r^y	<i>RH:-1,2,3,-4,-5</i>	0	0	0

Cependant certaines variations ont été rapportées suivant les origines géographique et/ou ethnique. Par exemple, des différences phénotypiques dans le système RH ont été observées entre les populations Uigur et Han dans la région de Xinjiang (Chine) (Li et al., 2008). De même, la fréquence du phénotype RhC+ est de 8,4% chez les Noirs d'Afrique du sud alors qu'elle atteint 21% à Curaçao et 31% en Ethiopie (Tax et al., 2002).

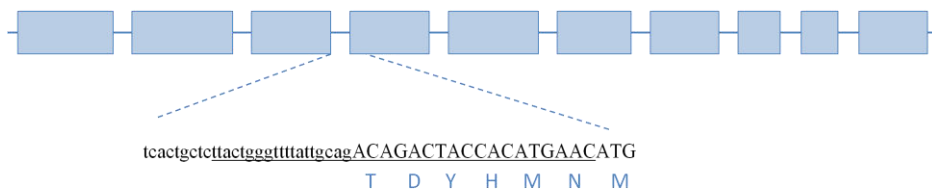
3. Le phénotype RhD négatif dans les populations Afro-Antillaises

Si le phénotype RhD négatif est presque exclusivement lié à la délétion du gène *RHD* dans les populations Européennes, ce mécanisme n'est la base que de 18% des RhD négatifs chez les Afro-Antillais (Singleton et al., 2000). En effet trois autres mécanismes sont aujourd'hui décrits : le pseudogène *RHD*RHDpsi* et les haplotypes *(C)ces type 1* et *(C)ces type 2*.

3.1. Pseudogène *RHD***RHDpsi*

L'allèle *RHD***RHDpsi* est caractérisé par la duplication d'une séquence de 37pb à la jonction intron 3 - exon 4. Cette insertion introduit un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré au codon 269. Plusieurs autres polymorphismes dans les exons 4 (609G>A), 5 (654G>C, 667G>C, 674C>T) et 6 (807T>G) sont également présents (Figure 7). Cet allèle a été détecté chez 62 à 69% des individus de phénotype RhD négatif du Zimbabwe, du Ghana ou d'Afrique du sud alors qu'il n'est mis en évidence que chez 24% des Afro-Américain et 14% des Afro-Brésiliens (Rodrigues et al., 2002; Singleton et al., 2000). Cette différence est probablement liée au métissage de ces populations. Dans les populations d'Afrique sub-saharienne la fréquence de l'allèle *RHD***RHDpsi* varie de 5% à 7% suivant les études (Granier et al., 2013; Singleton et al., 2000; Wagner et al., 2003).

RHD



*RHD***RHDpsi*

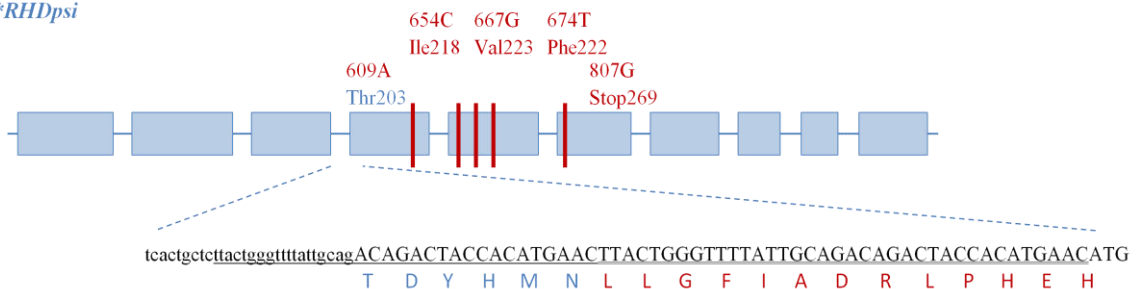


Figure 7 : Allèle *RHD* sauvage et *RHD***RHDpsi*. La séquence de la jonction intron 3 - exon4 est montrée, ainsi que sa traduction. Les 37pb impliquées dans la duplication sont soulignées. Les polymorphismes synonymes, faux-sens et non-sens également observés dans l'allèle *RHD***RHDpsi* sont indiqués par des traits, le nucléotide est noté ainsi que l'acide aminé correspondant.

3.2. Haplotype (C)ces type 1

Cet haplotype comprend un gène hybride *RHD-CE-D* au locus *RHD* en *cis* d'un allèle *RHCE* variant (*RHCE*ce(48C,733G,1006T)*) qui porte les polymorphismes 48G>C dans l'exon 1, 733C>G dans l'exon 5 et 1006G>T dans l'exon 7 (Faas et al., 1997). La localisation récente des points de cassure dans les introns 3 et 7 et la mise en évidence de plusieurs polymorphismes dans les introns ont permis d'obtenir une description moléculaire précise de ce gène hybride (Flegel and Wagner, 2014; Silvy et al., 2013b). Ainsi, les exons 1 à 3 et 8 à 10 sont d'origine *RHD* et présentent les SNP 186G>T (exon 2), 410C>T et 455A>C (exon 3) et les exons 4 à 7 sont issus d'un allèle *RHCE*ce(48C,733G,1006T)*. Il semble que cet allèle soit le produit d'une recombinaison entre un allèle *RHD*DIIIa* et un allèle *RHCE*ce(48C,733G,1006T)* générant l'allèle *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D* (Pham et al., 2009b; Silvy et al., 2013b) (Figure 8).

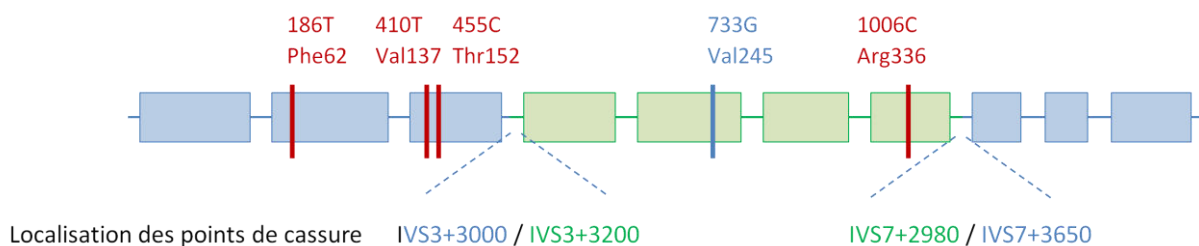


Figure 8 : Représentation de l'allèle *RHD*DIIIa-CE(4-7)*. Les exons et polymorphismes d'origine *RHD* sont en bleu, ceux d'origine *RHCE* sont en vert. Les autres polymorphismes sont indiqués en rouge. La région des points de cassures dans les introns 3 et 7 sont indiqués.

D'un point de vue sérologique, cet haplotype n'exprime pas de protéine RhD mais exprime un antigène RhC qui réagit faiblement avec les anticorps utilisés classiquement dans les laboratoires d'immunohématologie (Faas et al., 1997; Pham et al., 2009b) et dont le caractère partiel a été démontré par les fréquentes allo-immunisations rapportées chez les patients (Tournamille et al., 2010b). Une allo-immunisation anti-C a également été rapportée chez une patiente drépanocytaire (Pham et al., 2009c)(Pham et al., 2009b). L'allèle *RHCE*ce(48C,733G,1006T)* code l'expression de l'antigène de faible fréquence RH20 (VS) et l'allèle *RHD*DIIIa-CE(4-7)-D* code l'expression de l'antigène RH42. Les patients

homozygotes pour cet haplotype n'expriment pas les antigènes de haute fréquence RH31 et RH34.

Les études par biologie moléculaire de cohortes de phénotype RhD négatif ont mis en évidence l'haplotype (*C*)*ces type 1* chez 3% des Afro-Brésiliens, mais chez 11 à 23% des personnes d'Afrique sub-saharienne (Zimbabwe, Ghana, Afrique du sud) (Rodrigues et al., 2002; Singleton et al., 2000). La fréquence allélique est de 2,6% dans les populations de la Guadeloupe et de 3.5% dans les populations d'Afrique sub-saharienne (Granier et al., 2013; Silvy et al., 2011b). L'étude d'une cohorte de 58 donneurs de sang de Bamako a montré une fréquence allélique de 4,3% au Mali (Wagner et al., 2003).

3.3. Haplotype (*C*)*ces type 2*

Cet haplotype n'a été décrit qu'en 2009 (Pham et al., 2009b ; Pham et al., 2009a). Comme l'haplotype (*C*)*ces type 1* il présente un gène hybride *RHD-CE-D* au locus *RHD* en *cis* d'un allèle *RHCE*ce(48C,733G,1006T)*. Il se distingue du (*C*)*ces type 1* par le gène hybride. En effet, bien que les exons 4 à 7 soient également issus d'un allèle *RHCE*ce(48C,733G,1006T)* les exons 2 et 3 présentent une séquence *RHD* sauvage. Il a par ailleurs été montré que les deux haplotypes ne présentent pas le même point de cassure dans l'intron 3 (Silvy et al., 2013b). Les études sérologiques ont mis en évidence une expression très faible de l'antigène RhC, l'expression de l'antigène RH20 et l'absence d'expression des antigènes RH31 et RH34. Par contre aucune expression de l'antigène RH42 n'a été mise en évidence (Pham et al., 2009c)(Pham et al., 2009b). Aucune donnée n'est disponible quant à la fréquence de cet haplotype. Ceci peut être dû à la difficulté de sa détection par absence de « signe d'appel ». En effet, aucun polymorphisme spécifique de cet haplotype n'est à ce jour décrit et l'expression de l'antigène RhC n'est parfois détectable que par des techniques d'absorption/élution.

4. Allèles RH variants dans les populations Afro-antillaises

De nombreux allèles variants *RH* sont décrits dans les populations Afro-antillaises. Ils sont identifiés en raison soit d'une ambiguïté réactionnelle lors du phénotypage (affaiblissement ou discordance entre deux réactifs), soit de la présence d'un allo-anticorps

chez un patient positif pour l'antigène contre lequel est dirigé l'anticorps. Dans le cas d'une allo-immunisation, l'allèle variant identifié est considéré comme codant un phénotype partiel. Ceci est fréquemment observé chez les patients drépanocytaires polytransfusés. Cependant, de récentes études ont montré chez les patients drépanocytaires une forte propension à développer des anticorps dirigés contre les antigènes Rh (principalement Rhe mais également RhC et RhD) y compris chez les patients dont les gènes *RH* sont sauvages (Chou et al., 2013a; Silvy et al., 2014). Ceci suggère que chez ces patients, l'observation isolée d'une allo-immunisation anti-Rh n'implique pas nécessairement un caractère partiel de l'antigène concerné. Ainsi, le caractère partiel associé à un allèle variant n'est pas toujours clairement établi. Ceci est d'autant plus vrai pour les allèles décrits au cours d'études de cohortes qui associent rarement des données de phénotype aux données de génotype. La fréquence des différents allèles est assez mal connue car s'ils sont assez fréquemment observés chez les patients, peu d'études de cohortes ont été réalisées.

4.1. Allèles *RHD* variant

Entre 2002 et 2009, des études phylogénétiques des allèles *RHD* variant ont permis de définir quatre clusters dont trois regroupent les variants observés chez les Afro-antillais (Flegel et al., 2009; Wagner et al., 2002). Les variants décrits depuis sont classés dans ces clusters en fonction des polymorphismes qu'ils présentent (Fichou et al., 2012; Granier et al., 2013; Silvy et al., 2014). Plusieurs mécanismes sont à la base des allèles *RHD* variant parmi lesquels les SNP (uniques ou multiples) et les réarrangements géniques (allèles hybrides).

Cluster DIVa

Ce cluster a été initialement défini par un polymorphisme dans l'exon 3 (455A>C) du *RHD* qui se traduit par le remplacement de l'asparagine en position 152 par une thréonine dans le 5^{ème} domaine transmembranaire de la protéine RhD (Tableau 13). Cependant les principaux allèles de ce cluster présentent également les polymorphismes 186G>T et 410C>T qui affectent les acides aminés en position 62 (Leu62Phe, dans la deuxième boucle intracellulaire) et 137 (Ala137Val, dans le 5^{ème} domaine transmembranaire). Les plus fréquemment rencontrés sont le *RHD***DIIIa-CE(4-7)-D* présent au sein de l'haplotype (*C*)*ces*

type 1, le *RHD*DIIIa* (anciennement appelé *RHD*DIII type 5*) et le *RHD*DIVa* (également appelé *RHD*DIVa2*). Une étude des séquences introniques a montré qu'ils partagent une série de polymorphismes dans les introns 2 et 3 suggérant une origine commune (Silvy et al., 2013b).

L'étude de cohortes montre une fréquence de 3% pour l'allèle *RHD*DIIIa* et une fréquence de 1 à 2% pour l'allèle *RHD*DIVa* (Granier et al., 2013; Kappler-Gratias et al., 2014) qui semble plus fréquent dans les populations d'Afrique de l'ouest que dans celles d'Afrique centrale (Granier et al., 2013).

Ces deux allèles codent une protéine RhD présentant un phénotype partiel. La protéine codée par l'allèle *RHD*DIVa* exprime l'antigène RH30 (Goa) et celle codée par l'allèle *RHD*DIIIa* exprime RH54 (DAK) (Westhoff et al., 2013a; Westhoff et al., 2010).

Cluster D faible type 4

Les allèles de ce cluster partagent le polymorphisme 667T>G dans l'exon 5 du *RHD*, la phénylalanine en position 223, dans le vestibule de la protéine, est ainsi remplacée par une valine (Tableau 14). La plupart de ces allèles expriment un phénotype RhD partiel associé à un risque d'allo-immunisation démontré (Grootkerk-Tax et al., 2006), le plus fréquent étant l'allèle *RHD*DAR* (2 et 5%) (Granier et al., 2013; Hemker et al., 1999; Kappler-Gratias et al., 2014). Un autre allèle, le *RHD*D faible type 4.0*, présente une fréquence similaire mais le caractère faible ou partiel du phénotype qui lui est associé reste assez discuté (Flegel, 2006; Pham et al., 2013; Sippert et al., 2015; Wagner et al., 2000). Les allèles *RHD*DOL-1* et *RHD*DOL-2* codent l'expression de l'antigène de faible fréquence RH54 (DAK).

Tableau 13 : Allèles du cluster DIVa (adapté de la *Rhesus base V2*, <http://www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/>).

allèle <i>RHD</i>	Nomenclature ISBT	Phénotype	Altérations nucléotidique	Changement acide(s) aminé(s)
<i>DIIIa-CE(4-7)-D</i>	<i>RHD*03N.01</i>	RhD négatif	186G>T 410C>T 455A>C 1006G>T	Leu62Phe Ala137Val Asn152Thr Gly336Cys
<i>DIIIa</i>	<i>RHD*03.01</i>	RhD partiel	186G>T 410C>T 455A>C 602C>G 667T>G 819G>A	Leu62Phe Ala137Val Asn152Thr Thr201Arg Phe223Val
<i>DIIIa150C</i>			150T>C 186G>T 410C>T 455A>C 602C>G 667T>G 819G>A	Leu62Phe Ala137Val Asn152Thr Thr210Arg Phe223Val
<i>DIIIb</i>	<i>RHD*03.02</i>	RhD partiel	410C>T 455A>C 602C>G 667T>G 819G>A	Ala137Val Asn152Thr Thr210Arg Phe223Val
<i>DIII type 4</i>	<i>RHD*03.04</i>	RhD partiel	186G>T 410C>T 455A>C	Leu62Phe Ala137Val Asn152Thr
<i>DIII type 6</i>	<i>RHD*03.06</i>	RhD partiel	410C>T 455A>C 602C>G 667T>G 819G>A	Ala137Val Asn152Thr Thr210Arg Phe223Val
<i>DIII type 8</i>		RhD partiel	410C>T 455A>C	Ala137Val Asn152Thr
<i>DIVa</i>	<i>RHD*04.01</i>	RhD partiel	186G>T 410C>T 455A>C 1048G>C	Leu62Phe Ala137Val Asn152Thr Asp350His
<i>DIV(S103P)</i>			186G>T 307T>C 410C>T 455A>C	Leu62Phe Ser103Pro Ala137Val Asn152Thr
<i>DIV.DOL</i>			186G>T 410C>T 455A>C 509T>C 667T>G	Leu62Phe Ala137Val Asn152Thr Met189Arg Phe223Val
<i>D186T</i>			186G>T	Leu62Phe
<i>D-SPM</i>		RhD partiel	186G>T 410C>T 455A>C 509T>C 667T>G	Leu62Phe Ala137Val Asn152Thr Met170Thr Phe223Val

Tableau 14 : Allèles du cluster D faible type observé dans les populations Afro-antillaises (adapté de la *Rhesus base V2*, <http://www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/>).

allèle <i>RHD</i>	Nomenclature ISBT	Phénotype	Altérations nucléotidique	Changement acide aminé
<i>D faible type 4.0</i>	<i>RHD*09.03</i>		602C>G 667T>G 819G>A	Thr201Arg Phe223Val
<i>D faible type 4.0.1</i>	<i>RHD*09.03</i>		602C>G 667T>G	Thr201Arg Phe223Val
<i>D faible type 4.1</i>	<i>RHD*09.04</i>	RhD partiel	48G>C 602C>G 667T>G 819G>A	Trp16Cys Thr201Arg Phe223Val
<i>DAR</i>	<i>RHD*09.01</i>	RhD partiel	602C>G 667T>G 1025T>C	Thr201Arg Phe223Val Ile342Thr
<i>DAR(CE2:V50V-S68N)</i>			602C>G 667T>G 1025T>C	Thr201Arg Phe223Val Ile342Thr
<i>DAR(T203A)</i>		RhD partiel	602C>G 607A>G 667T>G 744C>T 957 G>A 1025T>C	Thr201Arg Thr203Ala Phe223Val Ile342Thr
<i>DAR-E</i>	<i>RHD*09.02</i>	RhD partiel	602C>G 667T>G 697G>C 957 G>A 1025T>C	Thr201Arg Phe223Val Glu233Gln Ile342Thr
<i>D faible type 4.2.1</i>	<i>RHD*09.01</i>	RhD partiel	602C>G 667T>G 957 G>A 1025T>C	Thr201Arg Phe223Val Ile342Thr
<i>D faible type 4.2.2</i>	<i>RHD*09.01.02</i>	RhD partiel	602C>G 667T>G 744C>T 957 G>A 1025T>C	Thr201Arg Phe223Val Ile342Thr
<i>D faible type 4.2.3</i>	<i>RHD*09.01.02</i>	RhD partiel	602C>G 667T>G 744C>T 1025T>C	Thr201Arg Phe223Val Ile342Thr
<i>D faible type 4.3</i>	<i>RHD*09.05</i>	RhD partiel	602C>G 667T>G 819G>A 872C>G	Thr201Arg Phe223Val Pro291Arg
<i>RHD psi</i>	<i>RHD*04N.01</i>	RhD négatif	609G>A 654G>C 667T>G 674C>T 807T>G IVS3-19 dup37	Met218Ile Phe223Val Ser225Phe Tyr269X
<i>DFV</i>	<i>RHD*08.01</i>	RhD partiel	667T>G	Phe223Val
<i>DOL-1</i>	<i>RHD*12.01</i>	RhD partiel	509T>C 667T>G	Met170Thr Phe223Val
<i>DOL-2</i>	<i>RHD*12.02</i>	RhD partiel	509T>C 667T>G 1132C>G	Met170Thr Phe223Val Leu378Val
<i>DOL-3</i>	<i>RHD*12.03</i>	RhD partiel	410C>T 509T>C 667T>G	Ala137Val Met170Thr Phe223Val
<i>DTO</i>	<i>RHD*30</i>	RhD partiel	667T>G 674C>T	Phe223Val Ser225Phe
<i>RHD(L198N,T201R,F223V,A273A)</i>			594A>T 602C>G 667T>G 819G>A	Lys198Asn Thr201Arg Phe223Val

Cluster DAU

Le polymorphisme partagé par tous les allèles de ce cluster est la transition 1136C>T dans l'exon 8 (Wagner et al., 2002). La thréonine, localisée dans le 12^{ème} domaine transmembranaire de la protéine RhD, est alors remplacée par une méthionine. L'allèle *RHD*DAU0* est le variant le plus fréquent dans les populations Afro-antillaises avec une fréquence allélique de 17 à 40% suivant les études (Granier et al., 2013; Touinssi et al., 2009; Wagner et al., 2003). Cependant, cet allèle code une protéine RhD de phénotype « normal » et sa détection n'est donc pas cliniquement pertinente. Un variant de cet allèle, le *RHD*DAU0.1*, a été observé au Mali (fréquence allélique 1,7%). Il présente un polymorphisme synonyme supplémentaire (579G>A) et est donc prédit pour coder lui aussi un phénotype RhD positif (Wagner et al., 2003). Les études de cohortes n'ayant pas investigué le SNP qui distingue le *RHD*DAU0* du *RHD*DAU0.1*, aucune donnée n'est disponible quant à sa spécificité vis à vis des populations maliennes.

Les allèles *RHD*DAU1* à *RHD*DAU7* sont associés à un phénotype RhD partiel, et parmi ces allèles cliniquement relevant, les allèles *RHD*DAU3* et le *RHD*DAU5* sont les plus fréquents (3% et 1,5% respectivement) (Granier et al., 2013; Moulds et al., 2013; Touinssi et al., 2009).

Tableau 15 : Allèles du cluster DAU (adapté de la *Rhesus base V2*, <http://www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/>).

allèle <i>RHD</i>	Nomenclature ISBT	Phénotype	Altérations nucléotidique	Changement acide(s) aminé(s)
<i>DAU0</i>	<i>RHD*10.00</i>		1136C>T	Thr379Met
<i>DAU0.1</i>			579G>A 1136C>T	Thr379Met
<i>DAU1</i>	<i>RHD*10.01</i>	RhD partiel	689G>T 1136C>T	Ser230Ile Thr379Met
<i>DAU2</i>	<i>RHD*10.02</i>	RhD partiel	209G>A 998G>A 1136C>T	Arg70Gln Ser333Asn Thr379Met
<i>DAU3</i>	<i>RHD*10.03</i>	RhD partiel	835G>A 1136C>T	Val279Met Thr379Met
<i>DAU4</i>	<i>RHD*10.04</i>	RhD partiel	697G>A 1136C>T	Glu233Lys Thr379Met
<i>DAU5</i>	<i>RHD*10.05</i>	RhD partiel	667T>G 697G>C 1136C>T	Phe223Val Glu233Gln Thr379Met
<i>DAU6</i>	<i>RHD*10.06</i>	RhD partiel	998G>A 1136C>T	Ser333Asn Thr379Met
<i>DAU7</i>	<i>RHD*10.07</i>	RhD partiel	835G>A 998G>A 1136C>T	Val279Met Ser333Asn Thr379Met
<i>RHD(A85V,V279M, T379M)</i>			254C>T 835G>A 1136C>T	Ala85Val Val279Met Thr379Met
<i>RHD(F179L,T379M)</i>			535T>C 1136C>T	Phe179Leu Thr379Met
<i>RHD(L181P,T379M)</i>			542T>C 1136C>T	Leu181Pro Thr379Met
<i>RHD(M1V,T379M)</i>			1A>G 1136C>T	Met1Val Thr379Met
<i>RHD(R114W,T379M)</i>			340C>T 579G>A 1136C>T	Arg114Trp Thr379Met
<i>RHD(V247L,T379M)</i>			579G>A 739G>C 1136C>T	Val247Leu Thr379Met
<i>DAU(48C)</i>			48C>G 1136C>T	Trp16Cys Thr379Met
<i>DAU(V281L,T379M)</i>			841G>C 1136C>T	Val281Leu Thr379Met
<i>DAU(D128D,V279M,,T379M)</i>			384T>C 835G>A 1136C>T	Val279Met Thr379Met
<i>DAU(E193E,V238M,V245L, T379M)</i>			579G>A 712G>A 733G>C 1136C>T	Val238Met Val245Leu Thr379Met

4.2. Allèles variant *RHCE* et absence d'expression d'antigène(s) de haute fréquence

Si des études phylogénétiques ont été réalisées pour les variants du *RHD*, aucune étude de ce type n'est actuellement disponible concernant les variants du *RHCE* malgré le grand nombre de variants décrits notamment dans les populations Afro-antillaises. En absence d'une telle classification, la description des allèles variant *RHCE* est particulièrement complexe et sera abordée ici au travers de l'absence d'expression des antigènes de haute fréquence.

L'absence d'expression d'antigène(s) de haute fréquence, ou phénotype public négatif, peut conduire à une situation de « blocage transfusionnel » en cas d'absence de disponibilité ou de stock extrêmement réduit d'unités de sang phénocompatibles. Les antigènes concernés sont principalement les RH18 (Hr^S), RH19 (hr^S), RH31 (hr^B), RH34 (Hr^B), RH46 (RN), mais également le RH61 plus récemment décrit (Westhoff et al., 2013b). A l'exception du phénotype RH :-46 qui est codé par un allèle *RHCE*Ce* variant, ces phénotypes sont codés par plusieurs *RHCE*ce* allèles/haplotypes. Ainsi au vu de l'hétérogénéité moléculaire responsable de ces phénotypes et de la possibilité théorique de développement d'anticorps de nature différente pour chaque génotype, la transfusion de ces sujets devrait idéalement se faire en respectant le génotype rare correspondant.

Phénotypes RH :-18 et RH :-19

Exception faite des phénotypes Rh_{null} ou D-/-, l'antigène RH18 (Hr^S) est exprimé par tous les phénotypes, alors que l'antigène RH19 n'est pas exprimé par les phénotypes DcE. Le phénotype RH :-18 est lié à la présence à l'état homozygote ou hétérozygote composite des variants *RHCE*ceAR*, *RHCE*ceBI*, *RHCE*ceEK* et *RHCE*ceSM* qui partagent le polymorphisme 712A>G dans l'exon 5 du *RHCE* (Noizat-Pirenne et al., 2002b). Parmi eux, l'allèle *RHCE*ceAR* est le plus fréquent (0,4% à 6%). La fréquence du phénotype RH :-18 est estimée entre 1/5.500 et 1/13.200 (Silvy et al., 2011b). Les anti-RH18, qui ressemblent parfois en début d'immunisation à des anti-Rhe ou anti-Rhce, peuvent être à l'origine de maladies hémolytiques du fœtus et du nouveau-né et de réactions transfusionnelles parfois fatales (Moore, 1994; Noizat-Pirenne et al., 2002b).

Tous les phénotypes RH :-18 sont également RH :-19, mais le phénotype RH :-19 peut également être lié à la présence d'un allèle *RHCE*ceMO* observé dans les populations Afro-antillaises avec une fréquence de 0.3% à 3% (Granier et al., 2013; Kappler-Gratias et al., 2014; Silvy et al., 2011b; Westhoff et al., 2013b).

Phénotypes RH :-34 et RH :-31

L'absence d'expression de l'antigène RH34 est associée à la présence à l'état homozygote de l'allèle *RHCE*ces(1006)*. Cet allèle est présent en *cis* d'un allèle *RHD* sauvage, d'une délétion du *RHD* ou d'un allèle *RHD*DIIIa ces(1006)*. Il est également retrouvé au sein des haplotypes *(C)ces type 1* et *(C)ces type 2* (Noizat-Pirenne et al., 2002b; Pham et al., 2009b; Pham et al., 2009d). Les anti-RH34 peuvent provoquer des maladies hémolytiques du fœtus et du nouveau-né modérées (Moore and Smart, 1991). Le phénotype RH :-34 est toujours associé à l'absence d'expression de l'antigène de haute fréquence RH31. Cependant, l'antigène RH31, peut également être absent chez des sujets exprimant le RH34. Ainsi, le phénotype RH :-31 peut être codé par différents allèles *RHCE*ce* (Tableau 15), certains ayant une fréquence allélique élevée (proche de 20% pour le *RHCE*ces*). La fréquence de certains allèles n'est actuellement pas connue (*RHCE*ce(254)* *RHCE*ceCF*) (Granier et al., 2013; Silvy et al., 2011b). Les études de génotypage ont permis de prédire le phénotype RH :-31 chez 5 à 7% des Afro-antillais (Granier et al., 2013; Silvy et al., 2011b). Les allo-immunisations anti-RH31 et anti-RH34 sont des complications majeures de la transfusion des patients drépanocytaires (Flickinger, 2006; Gammon and Velasquez, 2002) et le phénotype RH :-31 fait partie des demandes de sang rare les plus fréquentes auprès de l'ARDP (American Rare Donor Program) (Meny et al., 2013).

Tableau 16 : Allèles variants du *RHCE*ce* observés dans les populations Afro-antillaises.

allèle <i>RHCE</i>	Nomenclature ISBT	Antigène(s) de haute fréquence absent(s)	Antigène(s) de faible fréquence exprimé(s)	Polymorphismes
<i>RHCE*ce(48C)</i>	<i>RHCE*01.01</i>			48G>C
<i>RHCE*ceAR</i>	<i>RHCE*01.04</i>	RH18 (Hr ^S) RH19 (hr ^S)	RH10 (V)	48G>C 712A>G 733C>G 787A>G 800T>A 916A>G
<i>RHCE*ceEK</i>	<i>RHCE*01.05</i>	RH18 (Hr ^S) RH19 (hr ^S)		48G>C 712A>G 787A>G 800T>A
<i>RHCE*ceBI</i>	<i>RHCE*01.08</i>	RH18 (Hr ^S) RH19 (hr ^S)	RH49 (STEM)	48G>C 712A>G 818C>T 1132C>G
<i>RHCE*ceSM</i>	<i>RHCE*01.09</i>	RH18 (Hr ^S) RH19 (hr ^S)	RH49 (STEM)	48G>C 365C>T
<i>RHCE*ceMO</i>	<i>RHCE*01.07</i>	RH19 (hr ^S) RH31 (hr ^B) RH61		48G>C 667G>T
<i>RHCE*ces</i>	<i>RHCE*01.20.01</i> et <i>RHCE*01.20.02</i>	RH31 (hr ^B)	RH10 (V) RH20 (VS)	733C>G
<i>RHCE*ces(1006)</i>	<i>RHCE*01.20.03</i> et <i>RHCE*01.20.05</i>	RH31 (hr ^B) RH34 (Hr ^B)	RH20 (VS)	733C>G 1006G>T
<i>RHCE*ceCF</i>	<i>RHCE*01.20.06</i>	RH31 (hr ^B) RH58 (CELO)	RH20 (VS) RH43 (Crawford)	48G>C 697C>G 733C>G
<i>RHCE*ce(254)</i>	<i>RHCE*01.06</i>	RH31 (hr ^B) RH59 (CEAG)		254G>T
<i>RHCE*ces(340)</i>	<i>RHCE*01.20.07</i>	RH57 (CEST)	RH10 (V) RH20 (VS) RH48 (JAL)	340C>T 733C>G
<i>RHCE*ce(R114W)</i>	<i>RHCE*01.21</i>	RH57 (CEST)	RH48 (JAL)	340C>T
<i>RHCE*ce(48,733,1025)</i>	<i>RHCE*01.20.04</i>		RH10 (V) RH20 (VS)	48G>C 733C>G 1025C>T
<i>RHCE*ces(748)</i>	<i>RHCE*01.20.08</i>		RH10 (V) RH20 (VS)	48G>C 733C>G 748G>A
<i>RHCE*ceHAR</i>	<i>RHCE*01.22</i>		RH33 RH50 (FPTT)	667G>T 697G>T 712A>G 733C>G 744T>C 787A>G 800T>A
<i>RHCE*ceTI</i>	<i>RHCE*01.02</i> et <i>RHCE*01.03</i>			48G>C 1025C>T

4.3. Autres phénotypes associés à l'absence d'antigène de haute fréquence

Les personnes homozygotes pour l'allèle *RHCE*Ce(RN)*, un allèle hybride *RHCE*Ce-(D4)-ce* décrit chez l'ethnie Peulh, présentent un phénotype RH:-46 (Rouillac et al., 1996). Cet allèle exprime l'antigène de faible fréquence RH54 (DAK). La fréquence de l'allèle *RHCE*Ce(RN)* chez les patients drépanocytaires est de 0,6% (Silvy et al., 2014) et les anti-RH46 sont cliniquement relevant (Le Pennec et al., 1989). L'allèle *RHCE*Ce(RN)* est également associé à un fort risque d'allo-immunisation anti-RhC (Silvy et al., 2014; Tournamille et al., 2010b).

Des phénotypes associés à l'absence d'expression des antigènes RH57, RH58, RH59 ou RH61 ont également été décrits, mais peu de données sont disponibles sur la fréquence des allèles et/ou la relevance clinique des anticorps correspondants (Hipsky et al., 2011; Lomas-Francis et al., 2009; Vege et al., 2009; Westhoff et al., 2013b).

5. Haplotypes RH, expression d'antigènes partiels et de faible fréquence

De nombreux haplotypes RH composés d'un allèle *RHD* variant et d'un allèle *RHCE* variant sont décrits dans les populations Afro-antillaises. Ces haplotypes associent fréquemment un allèle codant pour un antigène RhD partiel et un allèle codant pour un phénotype Rhe partiel (Tableau 17). Les phénotypes RhD, Rhe ou RhC et partiels ont des fréquences respectives de 1,8% ; 0,9% et 5,45% en Afrique sub-saharienne (Granier et al., 2013), mais la proportion de personnes exprimant un antigène de faible fréquence est beaucoup plus élevée. Ainsi, les études de génotypage de cohortes prédisent que les antigènes RH10 et RH20 sont exprimés respectivement par 33% et 38% des donneurs de sang de la Martinique (Silvy et al., 2011b) et l'antigène RH54 (DAK) par 8% des Africains d'Afrique sub-saharienne (Granier et al., 2013).

Tableau 17 : Haplotypes RH.

Allèle RHD	Allèle RHCE	Phénotype		Antigène de fréquence	Faible
		RhD	Rhce	RhD	Rhce
<i>RHD*DIVa</i>	<i>RHCE*ceTI</i>	partiel	e partiel	RH30 (Go ^a)	
<i>RHD*DIIIa</i>	<i>RHCE*ces</i> <i>RHCE*ces(1006)</i> <i>RHCE*ceTI</i>	partiel	e partiel c, e partiel e partiel	RH54 (DAK)	RH10 (V) RH20(VS) RH20 (VS)
<i>RHD*DIII-CE(4-7)-D</i>	<i>RHCE*ces(1006)</i>	négatif	C, c, e partiel		RH20 (VS)
<i>RHD*D-CE(4-7)-D</i>	<i>RHCE*ces(1006)</i>	négatif	C, c, e partiel		RH20 (VS)
<i>RHD*DAR</i>	<i>RHCE*ceAR</i> <i>RHCE*ceEK</i>	partiel	c, e partiel		RH10 (V)
<i>RHD*DOL</i>	<i>RHCE*ceBI</i> <i>RHCE*ceSM</i>	partiel		RH54 (DAK)	RH49 (STEM)
<i>RHD*D faible type 4.0</i>	<i>RHCE*ces</i> <i>RHCE*ceTI</i> <i>RHCE*ceCF</i>	faible ou partiel	c, e partiel		RH10 (V) RH20(VS) RH20 (VS) RH43
<i>RHD*DAU0</i>	<i>RHCE*ceMO</i> <i>RHCE*ces(340)</i>	normal	e partiel c partiel		RH10 (V) RH20 (VS) RH43

VI. Système MNS (ISBT n°002)

Le système de groupe sanguin MNS est composé de 48 antigènes dont les principaux sont les antigènes antithétiques MNS1 (M)/MNS2 (N) et MNS3 (S)/MNS4 (s). Ces antigènes sont classés en antigènes de basse fréquence et antigènes de haute fréquence (Tableau 18). Les sujets dépourvus d'antigènes de haute fréquence peuvent s'immuniser. Les antigènes de basse fréquence peuvent aussi être impliqués dans des conflits transfusionnels ou obstétricaux. Les antigènes du système MNS sont portés par les glycophorines A et B (CD235a et CD235b) codées par les gènes *GYP A* et *GYP B* qui présentent un haut degré de similarité. Un troisième gène, *GYPE*, appartient à la même famille et peut être impliqué dans des échanges génétiques. Ainsi, le système MNS présente une complexité comparable à celle du système RH. Seuls les quatre principaux antigènes antithétiques et les antigènes et variants spécifiquement rencontrés dans les populations afro-antillaises seront décrits dans ce chapitre.

Tableau 18 : Antigènes du système MNS.

basse fréquence		haute fréquence
MNS6 (He)	MNS24 (Mit)	MNS5 (U)
MNS7 (Mi ^a)	MNS25 (Dantu)	MNS28 (En ^a)
MNS8 (M ^c)	MNS26 (Hop)	MNS29 (ENKT)
MNS9 (Vw)	MNS27 (Nob)	MNS30 (« N »)
MNS10 (Mur)	MNS31 (Or)	MNS39 (ENEP)
MNS11 (M ^g)	MNS32 (DANE)	MNS40 (ENEH)
MNS12 (Vr)	MNS33 (TSEN)	MNS42 (ENAV)
MNS13 (M ^e)	MNS34 (MINY)	MNS44 (ENDA)
MNS14 (Mt ^a)	MNS35 (MUT)	MNS45 (ENEV)
MNS15 (St ^a)	MNS36 (SAT)	
MNS16 (Ri ^a)	MNS37 (ERIK)	
MNS17 (Cl ^a)	MNS38 (Os ^a)	
MNS18 (Ny ^a)	MNS41 (HAG)	
MNS19 (Hut)	MNS43 (MARS)	
MNS20 (Hil)	MNS46 (MNTD)	
MNS21 (M ^v)	MNS47 (SARA)	
MNS22(Far)	MNS48 (Kipp)	
MNS23 (s ^D)		

1. Le locus glycophorine et les glycoprotéines GPA, GPB et GPE associées

Les gènes *GYPA*, *GYPB* et *GYPE* sont localisés sur le chromosome 4.q31.21 et sont liés au sein d'un cluster de 350 Kb (5'-*GYPA-GYPB-GYPE*-3') (Fukuda, 1993). Le gène *GYPA* contient 7 exons (A1 à A7), le premier exon code pour le peptide signal, les exons 2 à 4 pour le domaine extracellulaire, l'exon 5 pour le domaine transmembranaire et les exons 6 et 7 pour le domaine cytosolique (Kudo and Fukuda, 1989; Vignal et al., 1989). Le gène *GYPB* contient 5 exons, désignés de B1 à B6, l'exon similaire au A3 étant un pseudo-exon noté B ψ 3 (Kudo and Fukuda, 1989; Vignal et al., 1989). Sur le même principe, les exons similaires à A3 et A4 sont des pseudo-exons dans *GYPE* (E ψ 3, E ψ 4) (figure 9) (Kudo and Fukuda, 1990; Vignal et al., 1990).

Les gènes *GYPA* et *GYPB* codent les glycoprotéines GPA (CD235a) et GPB (CD235b) riches en acide sialique (sialoglycoprotéine) qui portent respectivement les antigènes antithétiques MNS1/MNS2 et MNS3/MNS4. La glycophorine E ne porte pas d'antigène de groupe sanguin mais est impliquée dans certains variants en raison des réarrangements géniques entre les 3 gènes.

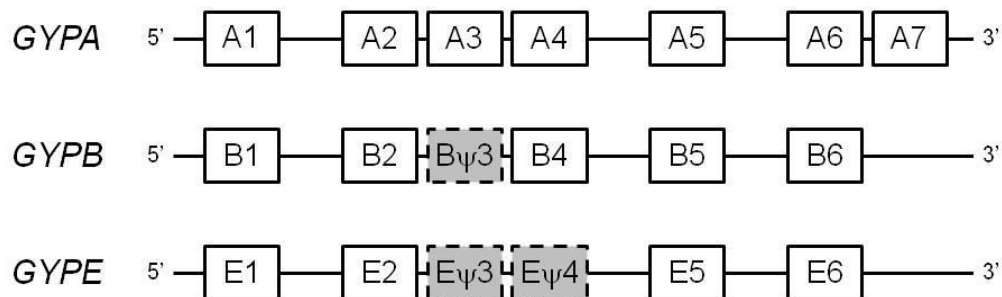


Figure 9 : Représentation des trois gènes du locus glycophorine. Les exons sont représentés par des rectangles blancs, les pseudo-exons sont en gris.

Les glycophorines A et B portent à leur extrémité amino-terminale des sites de *O*-glycosylation et la glycophorine A possède en plus un site de *N*-glycosylation (Figure 10). Les acides sialique portés par ces deux protéines contribuent largement à la charge négative des GR ce qui (i) prévient l'agglutination des hématies et l'adhérence des GR aux cellules endothéliales et (ii) limite l'invasion par des bactéries ou d'autres pathogènes. La glycoprotéine GPB est l'un des récepteurs membranaires de *Plasmodium falciparum*.

Parallèlement, la glycoprotéine GPA joue un rôle de chaperonne pour le transport de la bande 3 à la membrane du globule rouge.

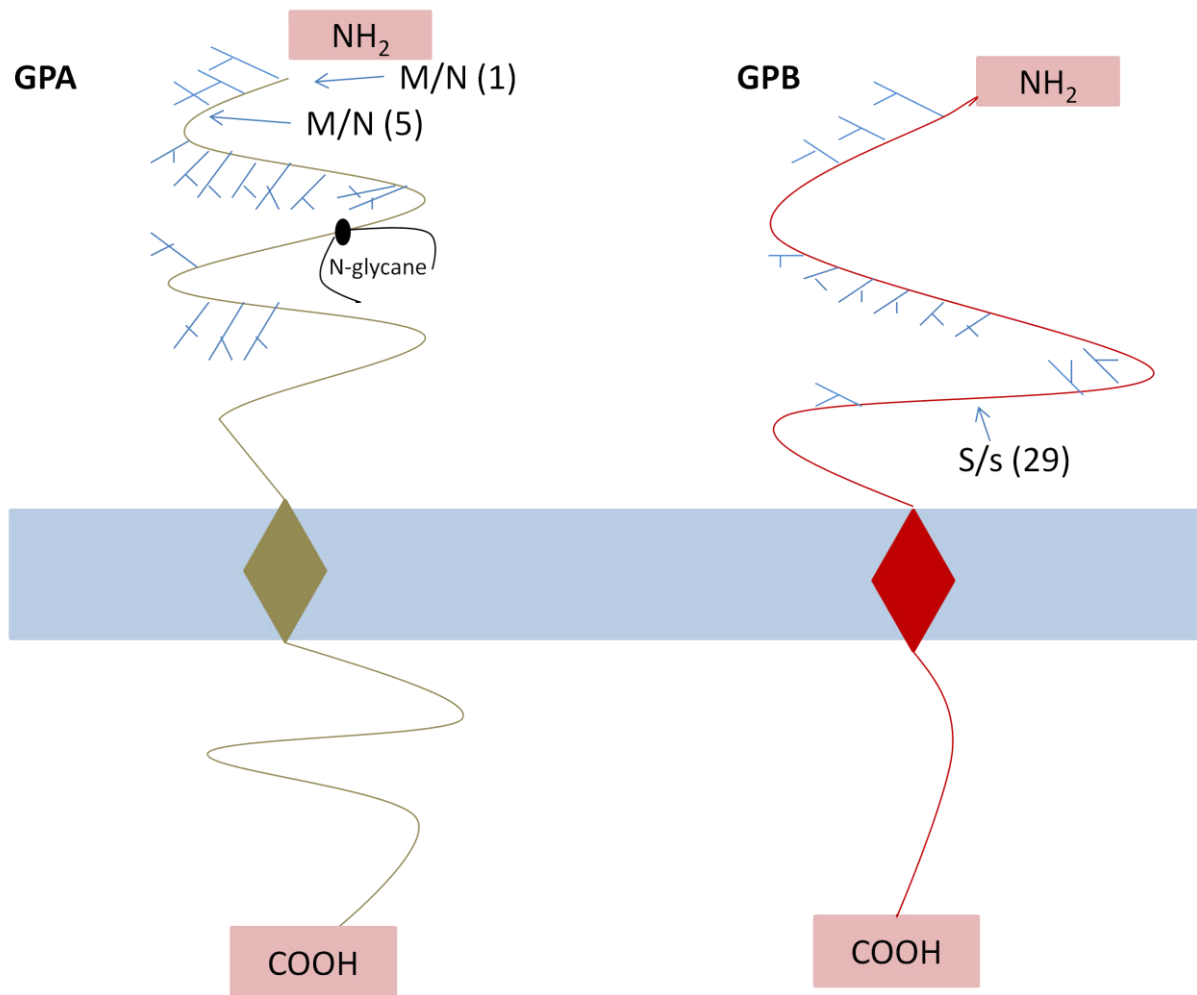


Figure 10 : Représentation schématique de la glycophorine A (GPA) et la glycophorine B (GPB). Les acides aminés associés aux polymorphismes M/N sont aux positions 1 et 5 de la GPA, et S/s en position 29 de la GPB et la N-glycane en position 26 de la GPA.

2. Les antigènes antithétiques MNS1/MNS2 et MNS3/MNS4

Les deux paires d'antigènes antithétiques MNS1/MNS2 et MNS3/MNS4 sont couramment étudiées au laboratoire et définissent les phénotypes du système MNS. Les antigènes MNS1 (M) et MNS2 (N) sont sensibles au traitement par la trypsine, la broméline et la papaïne. Les antigènes MNS3, MNS4 et MNS30 ('N') résistent au traitement par la

trypsine mais sont sensibles à un traitement par la papaïne et la broméline, sachant que l'antigène MNS3 est plus difficilement détruit.

2.1. MNS1 et MNS2

Les antigènes MNS1/MNS2 sont codés respectivement par les allèles *GYPA*01* et *GYPA*02*. Ces deux allèles se distinguent par 17 nucléotides dans les exons 1, 2 et 7 et les introns 1-4 (Akane et al., 2000). Ainsi, après clivage du peptide signal (acides aminés 1 à 19), le produit mature de l'allèle *GYPA*01* présente une sérine au niveau du 1^{er} résidu N-terminal (c.59C) et une glycine en position 5 (c.71G et c.72T) alors que le produit mature de l'allèle *GYPA*02* a une Leucine amino-terminale (c.59T) et un acide glutamique en position 5 (c.71A et c.72G) (Blumenfeld and Adamany, 1978; Camara-Clayette et al., 1999; Furthmayr, 1978).

Dans de nombreuses populations incluant l'Europe, l'Afrique et l'Asie de l'Est, la fréquence de l'allèle *GYPA*01* varie de 50 à 60%, et l'allèle *GYPA*02* de 40 à 50% (Daniels, 2013b) (Tableau19). Elle est plus élevée (plus de 90%) chez les Inuits et quelques Amérindiens. En Papouasie-Nouvelle-Guinée, l'incidence de l'allèle *GYPA*01* est inférieure à 2% (Mourant AE, 1976).

La majorité des anticorps anti-MNS1 et anti-MNS2 sont naturels. L'anti-MNS1 est relativement courant alors que l'anti-MNS2 est plus rare. Le plus souvent leur optimum thermique est bas. Ils ne sont donc pas considérés comme cliniquement significatifs. S'ils sont actifs à 37°C il convient de délivrer des unités dont les épreuves directes de compatibilité réalisées en test indirect à l'antiglobuline sont négatives. Chez les patients drépanocytaires, les unités sélectionnées seront dépourvues de l'antigène MNS1. En effet, de façon occasionnelle, les anti-MNS1 peuvent être impliqués dans la réaction transfusionnelle immédiate ou retardée. Ils sont très rarement responsable d'une MHFNN sévère (Lynen et al., 1983). Aucun cas sérieux de MHFNN causée par anti-MNS2 n'a été rapporté.

Tableau 19 : Prévalence des antigènes M, N, S et s.

Antigènes	Européens	Africains/Antillais	Asiatiques
MNS1	78	74	84
MNS2	72	75	73
MNS3	55	31	20
MNS4	89	93	92

2.2. MNS3 et MNS4

Les antigènes MNS3 (S) et MNS4 (s) sont codés respectivement par les allèles *GYPB*03* et *GYPB*04*. Ces deux allèles résultent de la transition 143C>T dans l'exon B4 qui se traduit par la présence d'une méthionine en position 29 dans le produit mature de l'allèle *GYPB*03* ou d'une thréonine (produit mature de l'allèle *GYPB*04*) (Dahr et al., 1980). L'allèle *GYPB*03* est moins fréquent en extrême Orient qu'il ne l'est en Europe, et est virtuellement absent chez les Aborigènes en Australie. Les Taïwanais sont tous porteurs de l'allèle *GYPB*04* positif (Daniels, 2013b).

Les anticorps anti-MNS3 et anti-MNS4 sont généralement des IgG actifs à 37°C. Ils ont été fréquemment impliqués dans des réactions transfusionnelles hémolytiques et ont été responsables de MHFNN graves voire létales. Les globules rouges de phénotypes MNS :-3 et MNS :-4 doivent être sélectionnés pour la transfusion des patients qui ont des anti-MNS3 et anti-MNS4. Les auto anticorps anti-MNS3 peuvent être responsables d'anémie hémolytique auto-immune.

3. Les particularités africaines

3.1. L'antigène MNS6 (He)

L'antigène MNS6 est antithétique de l'antigène MNS30 ('N'). Des études sérologiques ont permis d'évaluer l'occurrence de l'antigène MNS6 dans les populations afro-antillaises. Ainsi, 2,1% des donneurs afro-américains d'Atlanta et New-York expriment l'antigène MNS6

et 7% des africains (Reid et al., 1995). L'épitope de MNS6 est porté par un variant de GPB ; et il est localisé dans la région amino-terminale de la protéine. Ainsi, les cinq acides aminés N-terminaux de la forme mature à la base de l'antigène MNS6 sont Trp-Ser-Thr-Ser-Gly (Daniels, 2013a; Huang et al., 1997). Plusieurs gènes hybrides plus ou moins complexes codent pour l'expression de MNS6, tous ont en commun une insertion d'une partie de l'exon A2 du gène *GYP A* dans l'exon B2 de *GYP B*.

Tableau 20 : Glycophorines hybrides exprimant MNS6.

Variants de GPB exprimant MNS6	Nature de l'hybride (acides aminés forme mature)
GP.He	GPB(1-4*)-GPA ^M (5-26)-GPB(27-72)
GP.He(GL)	GPB(1-4*)-GPA ^M (5-26)-GPB(28-59)
GP.He(Cal)	GPB(1-4*)-GPA ^M (5-99)
GP.He(NY) [§]	GPB(1-4*)-GPA ^M (5-26)-GPB*
GP.He(P2) [§]	GPB(20-23*)-GPA ^M (5-26)-GPB*

* indique que la séquence présente des polymorphismes par rapport à la séquence sauvage de la protéine concernée

[§] les glycophorines GP.He(NY) et GP.He(P2) codées par les allèles *GYPB*03N.01* et *GYPB*03N.03* seront détaillés dans le chapitre suivant.

3.2. Le phénotype MNS : -3,-4 (S-s-)

3.2.1 Le phénotype MNS : -3,-4,-5 (S-s-U-)

Le phénotype MNS :-3,-4,-5 est dû à l'absence totale d'expression de la GPB. Au niveau moléculaire, une délétion des exons B2 à B6 ainsi que de l'exon 1 du gène *GYPE* ont été mis en évidence (Figure 11) (Huang et al., 1987; Rahuel et al., 1991).

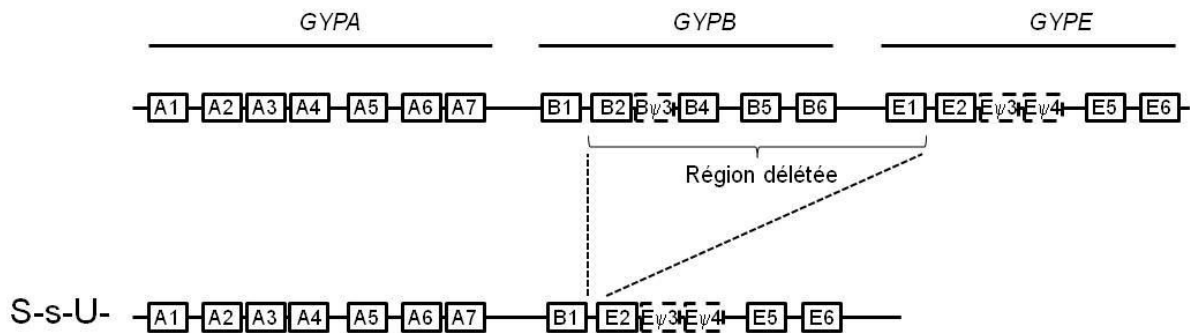


Figure 11 : Base moléculaire associée au phénotype S-s-U-.

3.2.2 Le phénotype MNS : -3,-4, 5^w (S-s-U^{var})

Le phénotype U^{var} (U^{faible}) est toujours associé à un phénotype MNS-3,-4. Il est lié à la présence à l'état homozygote, hémizygotique ou hétérozygote composite de quatre allèles dérivés d'un allèle *GYPB*03* : les allèles *GYPB*03N.01*, *GYPB*03N.02*, *GYPB*03N.03* et *GYPB*03N.04* (Figure 12). Ces différents allèles sont associés à un épissage alternatif au niveau de l'exon B5 (Storry et al., 2003).

Les allèles *GYPB*03N.01* et *GYPB*03N.02* (également appelés *GYPB(NY)* et *GYPBHe(NY)*) se caractérisent par deux polymorphismes dans l'exon B5. Les transitions 208G>T et 230C>T sont des polymorphismes faux-sens (respectivement Val70Leu et Thr77Met) qui activent un site cryptique accepteur d'épissage en position 251G qui conduit à un saut d'exon partiel de l'exon B5.

Les allèles *GYPB*03N.03* et *GYPB*03N.04* (également appelés *GYPBHe(P2)* et *GYPB(P2)*) présentent le polymorphisme IVS5+5g>t dans le site donneur d'épissage de l'exon 5 qui a pour conséquence un saut de l'exon 5 lors de l'épissage du transcrite. La protéine traduite à partir de ce transcrite ne possède donc pas de domaine transmembranaire et, en raison d'un décalage du cadre de lecture, à une extrémité carboxy-terminale altérée et plus longue.

Les produits des allèles *GYPB*03N.02* et *GYPB*03N.03* expriment l'antigène MNS6 en raison de l'insertion d'une portion de *GYPA* au niveau de l'exon 2.

Bien que considéré comme exclusif des populations afro-antillaises, un cas de phénotype MNS :-3,-4,U^{var} a été récemment décrit dans une famille suisse (Saison et al., 2014). Il définit

un troisième mécanisme (GYPB(P3)) et consiste en un polymorphisme intronique IVS5+5g>a porté par un allèle *GYPB*03*.

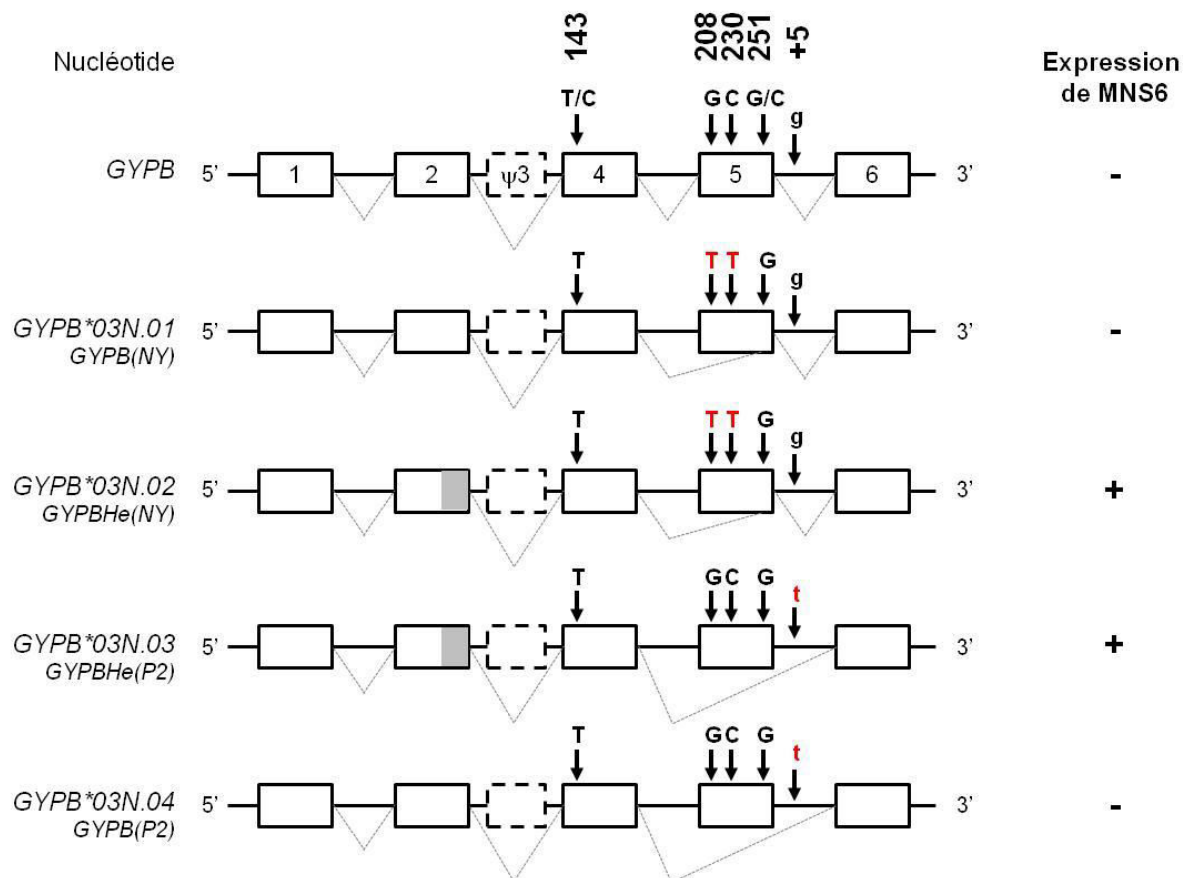


Figure 12 : Allèles liés au phénotype MNS :-3, -4, 5^w. L'exon 2 hybride B2A2 codant l'antigène MNS6 est montré ainsi que les différents polymorphismes responsables de l'épissage alternatif de l'exon B5 d'après (Storry et al., 2003).

3.2.3 Fréquence des phénotypes MNS :-3,-4

Le phénotype MNS :-3,-4 est observé chez 1% des afro-américains (Reid M, 2012). Les études sérologiques ont montré que 23 à 37% des échantillons MNS :-3,-4 expriment MNS6 (He) (Reid et al., 1996; Storry et al., 2003). En raison de l'absence d'anticorps anti-MNS5 fiable, les fréquences respectives des phénotypes MNS-5 et U^{var} sont inconnues dans les populations d'Afrique et très variables chez les afro-américains (0.2 à 4% suivant les études) (Daniels, 2013b). Les données les plus fiables sont issues des analyses moléculaires qui ciblent *GYPB* et plus particulièrement les polymorphismes 230C>T et IVS5+5g>t à la base des phénotypes U^{var}. Ainsi, 48% des échantillons de phénotype MNS :-3, -4 sont également

MNS :-5 (délétion de *GYPB*); 46.8% présentent le polymorphisme IVS5+5g>t (allèle *GYPB*03N.03* et/ou *GYPB*03N.04*); et 5.2% le polymorphisme 230C>T (allèle *GYPB*03N.01* et/ou *GYPB*03N.02*) (Storry et al., 2003).

La fréquence des allèles *GYPB*03N.03* et *GYPB*03N.01* est respectivement de 1.5 et 0.4% chez les afro-américains (Hashmi et al., 2007). Cependant, des fréquences atteignant 5,2% pour *GYPB*03N.03* et 1,8% pour *GYPB*03N.01* ont été observées chez les afro-brésiliens (Faria et al., 2012; Omoto et al., 2008).

Les sujets MNS :-5 peuvent développer un anti-MNS5 dans un contexte transfusionnel ou obstétrical. Les MHFNN associées aux anti-MNS5 sont de sévérité variable pouvant conduire à une mort intra-utérine (Ringressi et al., 2012; Rosse et al., 1990; Smith et al., 1998). Des anti-MNS5 ou des anti-MNS5-like (anti-U like) ont également été rapportés chez des sujets U^{var} (Peyrard et al., 2012; Storry et al., 2003). Dans certains cas, l'association de l'anti-MNS5 à un anti-MNS2 impose d'avoir recours à des unités MNS :-5 et MNS :-2.

3.3. Le phénotype Dantu

L'antigène Dantu (MNS25) est un antigène de basse fréquence résistant aux protéases (papaine, ficine, bromelaine, trypsine, α -chymotrypsine, pronase). Les GR Dantu+ sont également MNS2+ et expriment faiblement l'antigène MNS4. L'antigène MNS2 exprimé par les GR de phénotype Dantu est résistant aux protéases. L'expression de MNS5 (U) est également affectée : l'antigène apparaît faible mais l'existence d'anti-MNS5 chez les sujets Dantu suggère un phénotype partiel (Nataf, 2013). Le phénotype Dantu est presque exclusivement retrouvé dans les populations originaires d'Afrique.

L'antigène Dantu résulte d'un crossing-over inégal impliquant les gènes *GYPB* et *GYPB*. Le gène hybride *GYPB/GYPB* peut se trouver au sein de différents haplotypes dont le plus fréquent (type NE) comprend un gène *GYPB* (allèle *GYPB*01*) en *cis* du gène hybride dupliqué (Figure 13). Le point de cassure du gène hybride est localisé dans l'intron 4 et la protéine possède les acides aminés N-terminaux de GPB jusqu'à la proline 39 suivis des acides aminés de GYPB (72 à 131) (Blumenfeld et al., 1987; Huang and Blumenfeld, 1988). Le point de jonction des exons B4 et A5 serait à l'origine de l'antigène Dantu et une modification de la conformation de la protéine semble responsable de l'expression de

l'antigène MNS2 résistant aux protéases, de l'affaiblissement de l'antigène MNS4 et du caractère partiel de MNS5.

Des études *in vitro* suggèrent que les GR de phénotype Dantu seraient moins sensibles à une infection par *P. falciparum* (Field et al., 1994).

Le phénotype Dantu de type Ph est beaucoup plus rare (un seul patient décrit) et présente un niveau d'expression plus faible du gène hybride *GYPB/GYPA*. Les données sérologiques et biochimiques suggèrent que le gène *GYPA* est en *cis* du gène hybride non dupliqué (Figure 13) (Contreras et al., 1984; Dahr W 1986; Merry et al., 1986; Unger et al., 1987).

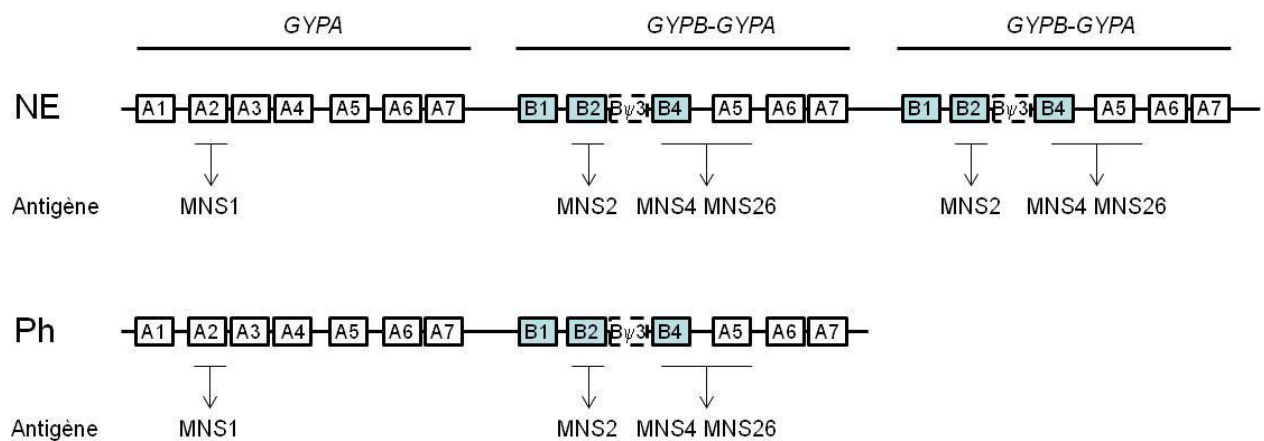


Figure 13 : Bases moléculaires associées aux phénotypes Dantu NE et Ph observés dans les populations d'origine africaine. Les exons *GYPA* sont représentés en blanc, les exons *GYPB* sont représentés en bleu.

Les rares études menées pour déterminer la fréquence de l'antigène Dantu ont consisté à screener des GR traités à la ficine avec la lectine *Vicia graminea*, spécifique de l'antigène MNS2. Ainsi, la fréquence du phénotype est estimée à 0, 5% chez les afro-américains (Unger et al., 1987).

Les anticorps anti-MNS25 sont généralement non immuns et sont détectés dans des sérums complexes. Un cas de MHFNN sans signes cliniques a cependant été rapporté (Contreras et al., 1984; Dahr W 1986; Merry et al., 1986).

B. Objectifs

Nous avons vu dans l'introduction l'organisation pratique de la transfusion sanguine au Mali et ses difficultés qui sont d'une part administratives et d'autre part liées à la conception architecturale des locaux du CNTS, la formation du personnel ainsi qu'à la connaissance parcellaire des groupes sanguins érythrocytaires au Mali. La description des bases moléculaires des systèmes de groupes sanguins d'intérêt transfusionnel a pris en compte un rappel sur les particularités africaines qui définissent un nombre important d'allèles variant, pour la plupart non dépistables lors du phénotypage et pouvant être responsables d'antigènes à caractère partiel, voire de groupes sanguins rares, avec un risque d'alloimmunisation. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à la connaissance parcellaire des groupes sanguins érythrocytaires au Mali. Ainsi nous proposons trois études avec les objectifs suivants :

1. De déterminer les fréquences des allèles des systèmes de groupes sanguins d'intérêt transfusionnel (RH, KEL, MNS, JK, FY, DO et HPA) à partir des donneurs volontaires du CNTS de Bamako ;
2. De réaliser un recensement des variants *RHD* et *RHCE* chez les Dogons et Peulhs de la 5^{ème} région (Mopti) ;
3. De déterminer les fréquences des allèles codant des antigènes de groupes sanguins de haute et basse fréquence *via* l'étude de population d'Afrique de l'ouest, du centre et de l'est ;

De définir à partir des résultats obtenus, des stratégies/orientations d'amélioration de la sécurité transfusionnelle au Mali mais aussi pour optimiser la prise en charge transfusionnelle des migrants maliens en Europe.

C. Résultats et discussion

I. Etude des groupes sanguins chez les donneurs de Bamako

La santé est un facteur essentiel de développement des sociétés humaines. Son amélioration est un levier de croissance qui a pour effet de réduire la pauvreté et les inégalités. De ce fait, la transfusion sanguine qui est fondamentale pour élever le niveau sanitaire d'un pays, à travers l'autosuffisance, la qualité et la sécurité des unités de sang, sont encore des objectifs très inégalement atteints à travers de nombreux pays et en particulier ceux d'Afrique subsaharienne comme le Mali. Pour remédier à cette situation, un plan d'actions globales incluant un état des lieux et les objectifs à atteindre au regard des besoins du pays doivent être définis en fonction des capacités et de l'environnement de chaque pays concerné. La population malienne est multiethnique, et est caractérisée par sa jeunesse (47,6% des maliens ont moins de 15 ans). Le taux de scolarisation en école primaire est de 88% (2012). À l'opposé, la pauvreté reste un phénomène généralisé qui touche près de 43,6 % des ménages. Fort de ce constat, le Mali possède un réservoir d'autosuffisance adossé à un maillage scolaire efficient qui représente un socle positif pour faire évoluer positivement son service de transfusion sanguine.

Dans un premier volet, nous avons déterminé les fréquences des allèles des systèmes de groupes sanguins d'intérêt transfusionnel (RH, KEL, MNS, JK, FY, DO et HPA) à partir de 300 donneurs volontaires du CNTS de Bamako. Dans un second volet, notre objectif a été d'évaluer l'expression d'antigène partiel et l'absence d'expression d'antigène de haute fréquence associée ou non à l'expression d'antigène de basse fréquence, à la base de phénotypes rares. Cette approche devrait permettre de préciser le profil génotypique et phénotypique déduit des donneurs de Bamako.

Les résultats de cette étude sont rapportés dans une publication sous presse à la revue *Transfusion and Apheresis Science*.

Article n°1 : Ba, A., Bagayoko, S., Chiaroni, J., Bailly, P. and Silvy, M.

Genotyping of 28 blood group alleles in blood donors from Mali: prediction of rare phenotypes. *Transfus. Apher. Sci. (in press)*



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Transfusion and Apheresis Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/transci

Genotyping of 28 blood group alleles in blood donors from Mali: Prediction of rare phenotypes

Alhassane Ba^{a,b,c}, Seydou Bagayoko^a, Jacques Chiaroni^{b,c}, Pascal Bailly^{b,c},
Monique Silvy^{b,c,*}

^a Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS), BP E344, Bamako, Mali

^b Etablissement Français du Sang Alpes Méditerranée, Marseille, France

^c UMR 7268 ADÉS, Aix-Marseille Université – EFS – CNRS, Marseille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 May 2015

Received in revised form 26 October 2015

Accepted 28 October 2015

Keywords:

Genotyping

Africa

Allele frequencies

ABSTRACT

We determined the frequencies of clinically relevant blood group alleles in 300 blood donors from Mali. Multiplex test based on xMAP technology was used to investigate six blood group systems (RH, KEL, MNS, FY, JK, DO, HPA) and complementary analysis were conducted for MNS and RH systems. Polymorphisms that affect the specificity of molecular tests leading to discrepant genotype results are discussed. Antigen expressions were predicted showing that 50% of donors expressed at least one traditional low prevalence antigen, and 11.6% lacked the ability to express at least one high prevalence antigen compatible with Dob-, HPA1a-, S-s-U-, Jsb-, RH:-31 and/or RH:-34 phenotypes.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The International Society of Blood Transfusion (ISBT) has designated more than 300 inherited blood group antigens on the surface of human red cells. Red blood groups are polymorphic and the distribution of antigens varies among different populations and ethnic groups. Ethnic variations in red blood cell (RBC) antigens can be a source of alloimmunization, especially in migrant populations. A 3.9% alloimmunization rate was reported in the general American population [1] but a higher rate was observed in sickle cell disease (SCD) patients treated in the USA or France (around 40%) [2,3]. This was suggested to result from various types of blood group polymorphisms. The first involves differences between donors and recipients of the common but highly immunogenic antigens C, E, Fy^a, Jk^b and S of the Rh, Duffy, Kidd and MNS systems, respectively; these antigens

are more prevalent in Caucasians than in Blacks [4]. The second involves the absence of high-prevalence antigens, which may or may not be associated with the expression of low-prevalence antigens [5]. Thirdly, partial antigens (mainly for D, C, c, e and U^{var}) can be associated with a risk of alloimmunization against the missing immunogenic epitopes of the protein, when the carrier is exposed to the complete protein [2]. Knowledge of blood group antigen distribution in continental Africa and countries with African migrants would help to improve transfusion safety. Blood group antigen frequencies quoted for Africans are often based on data from Afro-Caribbean populations in the United States who have Caucasian admixture [6] that do not reflect the regional differences found throughout the continent of Africa.

Molecular basis of almost all blood group antigens has been determined to provide the alternative to predict blood group phenotype from genomic DNA with a high degree of accuracy. Typing for RBC polymorphisms at the DNA level is important in transfusion medicine [7–9]. Genotyping circumvents the limitations of hemagglutination in patients and through multiplexing enables extensive typing of donors. Many molecular techniques for blood group genotyping that have been developed are dedicated to patients or donors [10–18].

This study was funded by Établissement Français du Sang, France.

* Corresponding author. EFS Alpes Méditerranée, Laboratoire d'Hématologie Moléculaire, 207 Boulevard Sainte Marguerite, Marseille 13009, France. Tel.: +33 1 4 91 17 06 95; fax: +33 1 4 91 17 01 78.

E-mail address: monique.silvy@efs.sante.fr (M. Silvy).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2015.10.018>

1473-0502/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

A few genotyping investigations were conducted in continental sub Saharan Africa [19–21] but large-scale genotyping data are lacking for African populations. In order to determine the frequencies of clinically relevant blood group alleles in Mali, we investigated 300 blood donors from Bamako, located in south-west of Mali. The survey was conducted by using a multiplex genotyping kit allowing the detection of 28 alleles belonging to RH, Kell, MNS, Duffy, Kidd, Dombrock and HPA systems together with some *RHCE* polymorphisms relevant in Africa.

We attempted to achieve two main objectives: First, we aimed to evaluate the utility of multiplex tools combining the detection of antigens considered clinically relevant together with *RHCE* polymorphisms for African population in countries hosting migrant populations. Second, we aimed to raise awareness on alloimmunization against rare antigens among medical staff in Mali.

2. Materials and methods

2.1. Blood samples

Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) blood samples were collected from 300 blood donors at the Centre National de Transfusion Sanguine, Bamako. Participants provided written informed consent. Study and consent protocols were approved by the *Comité d'éthique institutionnel de l'Institut National de Recherche en Santé Publique* in Mali.

2.2. Genomic DNA extraction and blood group genotyping

Genomic DNA was isolated from 200 µl of whole blood using the QIAmp Blood DNA Mini-kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to manufacturer instructions.

Genotyping of six blood group systems and HPA platelet was performed by the reverse sequence specific oligonucleotide (PCR-RSSO) method using the Lifecodes RBC kit (Gen-Probe, Belgium) according to the manufacturer's instructions. This multiplex assay method based on Luminex xMAP technology was designed for detection of the following alleles: *RHCE**C/*c, *RHCE**E/*e, *KEL**01/*02/*03/*04/*06/*07/*21, *GYP*A*01/*02, *GYP*B*03/*04/*03N.01/*03N.03, *FY**01/*02/*02M.01/*02N.01, *JK**1/*2/*2N.06, *DO**01/*02 and *HPA**1a/*1b. Eight SNPs in *RHCE* gene are also investigated, that is, 106G > A, 122A > G, 667G > T, 697C > G, 712C > G, 733C > G, 1006C > T, 1025C > T. Briefly, the technique consisted of asymmetric PCR-amplification of 50–150 ng of DNA in a final volume of 25 µl containing 10 µl of master mix Lifecodes RBC and 0.25 µl of Taq DNA polymerase (Gen-Probe). Amplification was performed on a Biometra thermocycler (Labgene) and includes an initial denaturation step of 4 minutes at 94 °C followed by 45 cycles (30 s at 94 °C, 45 s at 51 °C, 2 minutes 30 s at 65 °C) and a terminal elongation of 5 minutes at 65 °C. PCR amplicons were hybridized to complementary allele-specific oligonucleotide probes immobilized on fluorescent-coded microsphere beads. At the same time, the biotinylated PCR products were labeled with phycoerythrin-conjugated streptavidin and acquisition was performed immediately on a Luminex 100. Genotype determination and data analysis were performed automatically

using the Gen-Probe RBC MatchIT!-RBC software (Lifecodes, Belgium) according to the manufacturer's instructions.

2.3. Complementary investigation

GYP(B-A) gene rearrangement encoding Dantu antigen was detected by PCR (2300 bp) using a forward (5'-ctcctcttctcattatctttacatg) primer specific of *GYPB* and reverse primers (5'-ataaacctctcttagagctgttcagat) specific of *GYP*A. Amplification of *RHCE* exon 6 (forw: 5'-cctgtaatccaatattttgaaa; rev: 5' bacaccctgtagcctggt; product size 831 bp) was used as internal control. *GYP* and *RHCE* primers were used at 100 nM and 200 nM respectively. Amplification was performed on 100 ng of genomic DNA in the presence of PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 40 ng/µl BSA, 0.2 mM of each dNTP, 0.05 unit of Taq DNA-polymerase (Life Technologies, Saint-Aubin, France). PCR included a 5-minute denaturation step at 94 °C followed by amplification cycles consisting of 30 s at 94 °C, 30 s at 62 °C, and 1 min at 72 °C. PCR products were analyzed on 1% agarose gel and visualized using Sigh DNA stain (Euromedex, Strasbourg, France).

PCR-amplification of *GYPB* exons 4–5 was performed using a primer-pair that generates a 2194 pb product (forw: 5'-gaaattactaatggaagactgacac; rev: 5'ctgttctctctgagtttaactg). PCR performed with 100 ng of genomic DNA in the presence of PCR buffer, 2 mM MgSO₄, 0.2 mM of each dNTP, 0.05 unit of Platinum Taq DNA-polymerase (Life Technologies, Saint-Aubin, France), 200 nM of each primer. PCR included a 2 min denaturation step at 94 °C followed by amplification cycles consisting of 30 s at 94 °C, 30 s at 57 °C, and 1 min at 68 °C. PCR product was purified and cloned in pGEMT vector (Promega, Charbonnières, France) according to manufacturer's instructions. Clones were sequenced using the Sanger technique (GATC Biotech Konstanz, Germany).

Complementary investigation in RH system consisted of sequencing of *RHD* and *RHCE* [21], detection of *RHCE**Ce-D(4)-Ce allele [22] and specific amplification of (C)ce^s type 1 [23].

2.4. Comparisons and statistical analysis

Allele frequencies were compared between blood donors in Mali and literature data using Fisher's exact test (<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/exact/exact.html>). Differences with p value ≤ 0.05 were considered as statistically significant.

3. Results

3.1. *KEL*, *Duffy*, *Kidd*, *MNS*, *Dombrock* and *HPA-1* genotypes and alleles frequencies

A cohort of 300 blood samples from Malian donors was investigated for blood group alleles. The genotypes and alleles frequencies are reported in Table 1 and Table 2 respectively. Only two samples were genotyped as heterozygous for *KEL**01/*02 (0.7%); the others were *KEL**02/*02. *KEL**06 allele was detected in a total of 44 samples (two of them being homozygous).

In the Duffy system, 99% of the samples were homozygous for the *FY**02N.01 allele encoding a Fy(a-b-) phenotype.

Table 1
Genotypes observed in 300 blood donors.

System	Genotype	Predicted phenotype	n	Frequencies
Kell	<i>KEL*01/*01</i>	K+ k-	0	0
	<i>KEL*01/*02</i>	K+ k+	2	0.007
	<i>KEL*02/*02</i>	K- k+	298	0.993
	<i>KEL*06/*06</i>	Js(a+ b-)	2	0.007
	<i>KEL*06/*07</i>	Js(a+ b+)	42	0.140
	<i>KEL*07/*07</i>	Js(a- b+)	256	0.853
	Duffy	<i>FY*01/*01</i>	Fy(a+ b-)	0
<i>FY*01/*02</i>		Fy(a+ b+)	0	0
<i>FY*01/*02N.01</i>		Fy(a+ b-)	1	0.003
<i>FY*02/*02</i>		Fy(a- b+)	0	0
<i>FY*02/*02N.01</i>		Fy(a- b+)	2	0.007
<i>FY*02N.01/*02N.01</i>		Fy(a- b-)	297	0.990
Kidd		<i>JK*01/*01</i>	Jk(a+ b-)	172
	<i>JK*01/*02</i>	Jk(a+ b+)	117	0.390
	<i>JK*02/*02</i>	Jk(a- b+)	11	0.037
MNS ^a	<i>GYPA*01/*01</i>	M+ N-	54	0.180
	<i>GYPA*01/*02</i>	M+ N+	146	0.487
	<i>GYPA*02/*02</i>	M- N+	99	0.333
	<i>GYPB deletion</i>	S- s- U-	4	0.013
	<i>GYPB*03/*03^b</i>	S+ s- U+	17	0.057
	<i>GYPB*03/*04</i>	S+ s+ U+	42	0.140
	<i>GYPB*04/*04^b</i>	S- s+ U+	225	0.750
	<i>GYPB*04/*03N.01</i>	S- s+ U+	1	0.003
	<i>GYPB*04/*03N.03</i>	S- s+ U+	8	0.027
	<i>GYPB*03N.03/*03N.03^b</i>	S- s- U ^{var}	2	0.007
Dombrock	<i>DO*01/*01</i>	Do(a+ b-)	22	0.073
	<i>DO*01/*02</i>	Do(a+ b+)	116	0.387
	<i>DO*02/*02</i>	Do(a- b+)	162	0.540
HPA	<i>HPA-1a/1a</i>	HPA1(a+ b-)	244	0.813
	<i>HPA-1a/1b</i>	HPA1(a+ b+)	50	0.167
	<i>HPA-1b/1b</i>	HPA1(a- b+)	6	0.02

^a Results for MNS are given for 299 samples since one remained unresolved.

^b Presence of *GYPB* deletion associated with hemizygosity cannot be ruled out.

Samples expressing a low prevalence antigen are in bold and samples that lack the ability to express one high prevalence antigen are underlined.

Table 2
Allele frequencies in Mali blood donors.

System	Allele	Frequencies	Somali [4]	African American [10]	African American [24]	Afro Caribbean [25]	Comorian [25]	South Africa [26]	Brazil [27]
Kell	<i>KEL*01</i>	0.003	0.005	0.010	0.008				
	<i>KEL*02</i>	0.997	0.995	0.990	0.993				
	<i>KEL*06</i>	0.077			0.083	0.082	0.117		
	<i>KEL*07</i>	0.923			0.917	0.918	0.883		
Duffy	<i>FY*01</i>	0.002		0.136				0.030	
	<i>FY*02</i>	0.003		0.144				0.175	
	<i>FY*02N.01</i>	0.995		0.715				0.795	
	<i>FY*02M.01</i>	0		0.005					
Kidd	<i>JK*01</i>	0.768	0.690	0.725					
	<i>JK*02</i>	0.232	0.310	0.275					
MNS	<i>GYPA*01</i>	0.423	0.519	0.570	0.495				
	<i>GYPA*02</i>	0.577	0.481	0.430	0.505				
	<i>GYPB deletion</i>	0.013							0.063
	<i>GYPB*03</i>	0.127							0.416
	<i>GYPB*04</i>	0.837							0.469
	<i>GYPB*03N.01</i>	0.002							0
Dombrock	<i>GYPB*03N.03</i>	0.020							0.052
	<i>DO*01</i>	0.267		0.295					
HPA	<i>DO*02</i>	0.733		0.705					
	<i>HPA-1a</i>	0.897							
	<i>HPA-1b</i>	0.103							

Frequencies in Somali [4], African American [24] and South Africa [26] were deduced from phenotype data.

Frequencies in bold are different from those in Malian donors.

Table 3
Inconsistent samples.

System		Sequencing results		RBC Results		
		Genotype		Median [Q1-Q3] of		
				MFI _{mutated allele} /MFI _{wt allele}		
MNS	SNP in <i>GYPB</i>			143T > C	230C > T	IVS5 + 5g>t
	Control samples	<i>GYPB</i> *3/*4 (n = 8) heterozygous for <i>GYPB</i> *03N.01 (n = 8) heterozygous for <i>GYPB</i> *03N.03 (n = 3)		0.9 [0.87–0.92]	1.29 [1.24–1.41]	1.28 [1.17–1.32]
	Discordant sample	Unknown		0.58	0.77	0.9
RH	SNP in <i>RHCE</i> exon 5			667G > T	712A > G	733C > G
	Control samples	heterozygous for <i>RHCE</i> * <i>ceMO</i> (n = 12) heterozygous for <i>RHCE</i> * <i>ceAR</i> or * <i>ceEK</i> (n = 6) heterozygous for <i>RHCE</i> * <i>ce(733G)</i> (n = 16)		1.09 [1.02–1.14]	1.14 [0.84–1.43]	0.48 [0.45–0.48]
	Discordant samples	<i>RHD</i> * <i>RHD(744T)</i> /* <i>DAU-0</i>	<i>RHCE</i> * <i>ce/*ce(733G)</i>	0.67	0.83	0.83
		<i>RHD</i> * <i>RHD(744T)</i> /* <i>DAR</i>	<i>RHCE</i> * <i>Ce/*ceAR</i>	0.48	1.68	1.01
		<i>RHD</i> * <i>RHD(744T)</i> /* <i>DAU-5</i>	<i>RHCE</i> * <i>Ce/*ce</i>	0.80	0.91	0.31

In bold, discordances presumably linked to amplification of two *RHCE* alleles wild type for the considered SNP and one *RHD***RHD(744)* allele; in italic, discordances presumably linked to amplification of one *RHCE* wild type allele, one *RHCE* mutated allele and one *RHD***RHD(744)* allele.

One sample was genotyped *FY**01/*FY**02N.01 and two were *FY**02/*FY**02N.01.

The Kidd genotypes frequencies were: *JK**01/*01, 57.3%; *JK**01/*02, 39.0%; and *JK**02/*02, 3.7%. The allele frequencies of *JK**01 and *JK**02 alleles were 0.768 and 0.232 respectively.

The allele frequencies of *GYPB**01 and *GYPB**02 were 0.423 and 0.477 respectively. Homozygous deletion of *GYPB* was observed in four samples (allele frequency 0.013). A large proportion of samples were homozygous for *GYPB**04 (75.0%); 14% were heterozygous *GYPB**03/*04; and 5.7% were homozygous for *GYPB**03/*03. The remaining samples had *GYPB**03N.03 (2 homozygous) or *GYPB**03N.01 allele. Testing for *GYP(B-A)* rearrangement encoding Dantu antigen failed to detect any positive sample.

One sample was heterozygous for 143T > C in exon 4; 230C > T in exon 5 and +5g>t in intron 5 of *GYPB*. Assay signal intensities (MFI, mean fluorescence intensity) produced in RBC kit for these SNPs (mutated/wild type allele) were compared to those in control samples (Table 3) showing ratios ranging from 60 to 70% of control values. Genomic fragment encompassing exons 4 and 5 of *GYPB* was PCR amplified and cloned into pGMT to demonstrate co-linearity. We identified clones with 143T and 230T (compatible with *GYPB**03N.01 allele), clones with 143T and +5t (compatible with *GYPB**03N.03 allele) and clones with 143C (compatible with *GYPB**04 allele), suggesting the sample had three alleles (not shown).

Twenty-two samples (7.3%) were homozygous for *DO**01 allele; 116 (38.7%) were *DO**01/*02 and 162 (54.0%) were homozygous for *DO**02.

Human Platelet Antigen-1 genotypes revealed a highly uneven distribution of *HPA-1a* and *HPA-1b* with allele frequencies of 0.897 and 0.103 respectively. Only six samples were homozygous for *HPA-1b*.

3.2. *RHCE* genotypes

As expected, a large proportion of samples were homozygous for *RHCE***ce* allele (n = 223, 74.34%). Five samples were homozygous for *RHCE***ce* (1.66%) and two for *RHCE***Ce*

(0.67%). Others were heterozygous for *RHCE***ce* and *RHCE***Ce* (n = 35, 11.66%) or *RHCE***ce* and *RHCE***Ce* (n = 33, 11.00%). The two remaining samples (0.67%) had *RHCE***C*, *RHCE***c*, *RHCE***E* and *RHCE***e*. The test also detects eight additional polymorphisms in *RHCE* gene associated with variant alleles. Overall, RBC kit showed that at least one *RHCE* polymorphism was observed in 51.6% of samples (Table 4).

No sample had 106G > A (encoding C^x antigen); 122A > G (encoding C^w antigen); or 697C > G (encoding Crawford antigen). Among the samples bearing polymorphisms in *RHCE*, two were *RHCE***C*/**c* with three heterozygous SNPs at positions 667G > T; 712C > G; and 733C > G in exon 5. A third sample was bearing the same heterozygous SNPs in exon 5 on an *RHCE***c*/**c* background. Since such a configuration is unknown, *RHCE* was sequenced in the three samples revealing *RHCE***Ce*/**ceAR*, *RHCE***Ce*/**ce* and *RHCE***ce*/**ce(733G)* genotypes. Inconsistency between RBC kit and *RHCE* sequencing led us to suspect alteration in *RHD* gene which might affect specificity of RBC test. Thus, *RHD* was sequenced showing that the three samples were bearing *RHD(744T)* allele. The MFI produced in RBC kit for each of these SNPs in inconsistent samples was compared to those observed in control samples heterozygous for 667G > T, 712C > G, or 733C > G (Table 3). Different values were observed between inconsistent and control samples, and data were in agreement with amplification of three alleles, strengthening that the presence of *RHD(744T)* allele affects the specificity of *RHCE* exon 5 amplification in RBC kit.

Table 4
Polymorphisms in *RHCE*.

SNP	Probable allele	n	Homozygous
667G > T	<i>RHCE</i> * <i>ceMO</i>	10	0
712A > G	<i>RHCE</i> * <i>ceAR</i> /* <i>ceBI</i> /* <i>ceEK</i>	3	0
733C > G	many	139	15
1006C > T	<i>RHCE</i> * <i>(48C,733G,1006T)</i>	19 ^a	1
1025C > T	<i>RHCE</i> * <i>ceTI</i> or * <i>ceTI(D2)</i>	11 ^b	0

^a 16/19 had (C)ces type 1 haplotype.

^b 3/11 had *RHCE***ceTI(D2)* allele in cis to *RHD***DIVa*.

Samples with 1006C > T (n = 19) were tested for (C)ces type 1 haplotype and 16 were positive. There were 3/11 samples with 1025C > T found to present *RHCE*ceTI(D2)*. All samples with *RHCE*C* allele were tested for *RHCE*RHCE-(D4)-Ce*, showing 12 samples heterozygous for this allele.

4. Discussion

Three hundred blood samples from African donors collected in Bamako were investigated for nine blood group systems. Allele frequencies for *HPA-1a* and *HPA-1b* were comparable to those observed in Benin, Congo and Cameroun [28]. Overall allele frequencies in Kell system were similar to previous report (Table 2). Frequencies of *JK* and *GYP A* alleles were different from previous report in Somali (p = 0.03 and p = 0.04 respectively) [4], suggesting a regional or ethnic difference in the frequencies as already reported in other blood group systems [20,29].

As expected, frequency of *FY*02N.01* allele in Mali was very high (0.995), leading to 99% of individuals with the Fy(a-b-) predicted phenotype. Directional selection had occurred at the Duffy locus leading to fixation (that is, frequencies of 100%) in parts of West, Central and East Africa. Around this high frequency region, steep clines into the Sahel in the north, and Namibia and South Africa in the south led to median phenotypic frequencies of <10% in parts of these extremities [30,31]. This may explain the difference in allele frequencies between Mali and South Africa (p < 0.001). Comparison with African American also showed a significant variation (p < 0.001) which could be explained by Caucasian admixture in Afro-Americans [6].

The Dombrock blood group was investigated for *DO*01* and *DO*02* alleles. The results were consistent with genotyped data reported by Hashmi et al. [10]. However, a large number of variant alleles have been described in individuals of African ancestry [19,32–34]. In particular, *DO*02.-04* and *DO*01.-05* alleles (encoding lack of Hy and Jo antigens, respectively) were shown to be frequent in some ethnic groups of sub-Saharan Africa [20]. As well, regional differences in the frequencies of *DO*02.-04* were reported in Brazilian population [29]. Dombrock antigens have been implicated in both immediate and delayed transfusion reactions. Moreover, active hemolysis by anti-Hy has been reported [35]. These data suggest that it would be of interest to include at least detection of *DO*02.-04* and *DO*01.-05* alleles in the African populations.

S-s-U- phenotype (due to deletion of *GYPB*) and S-s-U^{var} phenotypes encoded by *GYPB*03N.01* and *GYPB*03N.03* alleles are expressed by people from African ancestry. However, good anti-U serums are scarce and the results of screening donors with anti-U are unreliable. Thus, the frequency of U-phenotype is unknown in Africans and remains tricky in African Americans (between 0.2 and 1.4%) according to the proportion of S-s-U^{var} samples that give positive or negative results with the antibody reagent used [24]. We report a 1.3% (4/300) frequency of S-s-U-predicted phenotype which is comparable to data in African Americans (4/271) [10] but less than those reported in African Brazilians ranging from 5.2 to 7.8% [36]. Similarly, frequencies of *GYPB*03N.03* and *GYPB*03N.01* were comparable between Malian Donors (0.020 and 0.002 respectively) and African

Americans (0.015 and 0.004 respectively) [10]. Higher frequencies were described in African Brazilians (ranging from 0.039 to 0.052 for *GYPB*03N.03* and from 0 to 0.018 for *GYPB*03N.01*) [27,36]. No allele encoding the Dantu antigen was found in our cohort. This finding is compatible with the 0.5% occurrence of the Dantu antigen (MNS25) estimated in African Americans that had predicted a total of three samples positive for this allele in our cohort of 300 individuals [24]. One sample remained unresolved for MNS genotype. Indeed, it was found with *GYP A*02/*02* genotype and was apparently bearing three *GYPB* alleles (*GYPB*03N.03*, *GYPB*03N.01* and *GYPB*04*). More likely this sample could have, additionally to *GYP A* and *GYPB* genes, a hybrid allele implicating *GYPE* and *GYPB* genes or *GYP A* and *GYPB* genes [24]. The presence of a hybrid gene could explain the discrepant results of genotype analysis as recently demonstrated for *GYP A* [37]. To confirm this hypothesis, further molecular investigations are required which have not been achievable due to the lack of blood sample compatible with RNA study and/or complementary immunological assays. Altogether, analysis of *GYPB* alleles and Dantu highlights that Africans are similar to African Americans regarding S, s, U and Dantu antigens.

The test also detects seven polymorphisms in *RHCE* gene associated with variant alleles. Three samples were heterozygous for 667G > T, 712C > G, and 733C > G either on an *RHCE*c/*c* background (n = 1) or on a *RHCE*C/*c* background (n = 2). Further investigations showed that all three samples had an *RHD*RHD(744T)* allele. This allele previously observed in sickle cell disease patient [3] is predicted to encode a normal RhD expression since the 744C > T polymorphism is a synonymous one (p.Ser248Ser). Our results indicate that *RHD*RHD(744T)* allele affects RBC accuracy, exemplifying the limits of genotyping tests and the need of precaution for interpretation.

According to previous report, the 733C > G polymorphism was the most frequently observed [25]. Three samples had *RHCE*ceTI(D2)* allele leading to an allele frequency of 0.01% in Malian donor population as compared to 2.4% in Dogon ethnic group from Mali [38]. From the 19 samples with 1006C > T, 16 were bearing (C)ces type 1 haplotype. The 3 remaining may express *DIIIa ces* or (C)ces type 2 haplotypes [39]. Notably, one sample was homozygous for (C)ces type 1 leading to a predicted RH:-34 phenotype. Twelve samples were heterozygous for *RHCE*RHCE-(D4)-Ce* predicting that 4% of donors were positive for the RH:54 antigen (DAK) which was shown to be immunogenic [40]. This observation strengthens our previous report based on both *RHD* and *RHCE* genotyping, which predicted a 8.1% prevalence of RH:54 in Africa [21]. It also highlights that since some specificities relevant in Black are lacking in the test, phenotypes reported as important in transfusion medicine were not detected. Indeed, the test does not allow detection of neither DAK-positive samples (encoded by *RHCE*RHCE-(D4)-Ce*, *RHD*DOL* and *RHD*DIIIa*), nor potential RH:-46 donors (homozygous for *RHCE*RHCE-(D4)-Ce* allele), nor potential Hy-negative, Jo-negative donors (encoded by homozygosity for *DO*02.-04* and *DO*01.-05* respectively) [3,21,24,38].

Altogether, the multiplex kit allowed identification of 150 donors (50%) expressing at least one low prevalence antigen, namely, K⁺ (n = 2), Js(a⁺) (n = 44), U^{var+} (n = 2) or

RH:10/20 + (n = 138), and 35 samples (11.6%) which lack the ability to express at least one high prevalence antigen like Js(b-) (n = 2), U- (n = 4), Do(b-) (n = 22), HPA1a-negative (n = 6) or RH:-34 (n = 1). This demonstrates the high risk of alloimmunization against high and/or low prevalence antigens in patients and should be considered in Mali.

5. Conclusion

Our results provide the first data on blood group polymorphisms in blood donors from Mali and confirm the effectiveness of genotyping strategy for identifying rare donors. Moreover, we show the interest of multiplex tools including both extended genotyping and warning sign for rare phenotypes like RH:-34; RH:-18 or RH:-46. This also highlights the need for genotyping strategies based on ethnicity of donors.

Acknowledgments

We wish to thank Sophie Beley for her expert technical assistance.

Author contribution

AB performed the research; SB collected samples and performed phenotyping; JC assisted in study design; and PB and MS contributed to study design, analyzed the data and wrote the article.

References

- Higgins JM, Sloan SR. Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: evidence for a distinct population of immunologic responders. *Blood* 2008;112(6):2546–53.
- 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;122(6):1062–71.
- 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;99(7):e115–7.
- Badjie KS, Tauscher CD, van Buskirk CM, Wong C, Jenkins SM, Smith CY, et al. Red blood cell phenotype matching for various ethnic groups. *Immunohematology* 2011;27(1):12–9.
- Noizat-Pirene F, Lee K, Pennec PY, Simon P, Kazup P, Bachir D, et al. Rare RHCE phenotypes in black individuals of Afro-Caribbean origin: identification and transfusion safety. *Blood* 2002;100(12):4223–31.
- Solovieff N, Hartley SW, Baldwin CT, Klings ES, Gladwin MT, Taylor JG, et al. Ancestry of African Americans with sickle cell disease. *Blood Cells Mol Dis* 2011;47(1):41–5.
- Bakanay SM, Ozturk A, Ileri T, Ince E, Yavasoglu S, Akar N, et al. Blood group genotyping in multi-transfused patients. *Transfus Apher Sci* 2013;48(2):257–61.
- Manfroi S, Pagliaro P. Genotyping patients' and donors' blood groups for efficient blood therapy. *Blood Transfus* 2014;12(Suppl. 1):s305–7.
- Shafi H, Abumuhor I, Klapper E. How we incorporate molecular typing of donors and patients into our hospital transfusion service. *Transfusion* 2014;54(5):1212–9.
- Hashmi G, Sharif T, Zhang Y, Cristobal J, Chau C, Seul M, et al. Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. *Transfusion* 2007;47(4):736–47.
- Di Cristofaro J, Silvy M, Chiaroni J, Bailly P. Single PCR multiplex SNaPshot reaction for detection of eleven blood group nucleotide polymorphisms: optimization, validation, and one year of routine clinical use. *J Mol Diagn* 2010;12(4):453–60.
- Le Goff GC, Brès JC, Rigal D, Blum LJ, Marquette CA. Robust, high-throughput solution for blood group genotyping. *Anal Chem* 2010;82(14):6185–92.
- Jungbauer C. Routine use of DNA testing for red cell antigens in blood centres. *Transfus Apher Sci* 2011;45(1):61–8.
- Flôres MA, Visentainer JE, Guelsin GA, Fracasso Ade S, de Melo FC, Hashimoto MN, et al. Rh, Kell, Duffy, Kidd and Diego blood group system polymorphism in Brazilian Japanese descendants. *Transfus Apher Sci* 2014;50(1):123–8.
- Latini FR, Gazito D, Armoni CP, Muniz JG, de Medeiros Person R, Carvalho FO, et al. A new strategy to identify rare blood donors: single polymerase chain reaction multiplex SNaPshot reaction for detection of 16 blood group alleles. *Blood Transfus* 2014;12(Suppl. 1):s256–63.
- Meyer S, Vollmert C, Trost N, Brönnimann C, Gottschalk J, Buser A, et al. High-throughput Kell, Kidd, and Duffy matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry-based blood group genotyping of 4000 donors shows close to full concordance with serotyping and detects new alleles. *Transfusion* 2014;54(12):3198–207.
- Paris S, Rigal D, Barlet V, Verdier M, Coudurier N, Bailly P, et al. Flexible automated platform for blood group genotyping on DNA microarrays. *J Mol Diagn* 2014;16(3):335–42.
- Hopp K, Weber K, Bellissimo D, Johnson ST, Pietz B. High-throughput red blood cell antigen genotyping using a nanofluidic real-time polymerase chain reaction platform. *Transfusion* 2010;50(1):40–6.
- Chapel-Fernandes S, Callebaut I, Halverson GR, Reid ME, Bailly P, Chiaroni J. Dombrock genotyping in a native Congolese cohort reveals two novel alleles. *Transfusion* 2009;49(8):1661–71.
- Silvy M, Beley S, Granier T, Ba A, Chiaroni J, Bailly P. Heterogeneity of alleles encoding high- and low-prevalence red blood cell antigens across Africa: useful data to facilitate transfusion in African patients. *Br J Haematol* 2013;163(4):528–36.
- 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* 2013;53(11 Suppl. 2):3009–17.
- 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* 2010;50(1):13–9.
- 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.
- Daniels G, editor. *Human blood groups*. 3rd ed. Wiley-Blackwell; 2013.
- Silvy M, Di Cristofaro J, 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.
- Olsson ML, Hansson C, Arent ND, Akesson IE, Green CA, Daniels GL. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion* 1998;38(2):168–73.
- Faria MA, Martins ML, Schmidt LC, Malta MC. Molecular analysis of the GYPB gene to infer S, s, and U phenotypes in an admixed population of Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2012;34(3):212–6.
- Halle L, Bigot A, Mullen-Imandy G, M'Bayo K, Jaeger G, Anani L, et al. HPA polymorphism in sub-Saharan African populations: Beninese, Cameroonian, Congolese, and Pygmies. *Tissue Antigens* 2005;65(3):295–8.
- Piassi FC, Santos SM, de Castilho LM, Baleotti Júnior W, Suzuki RB, da Cunha DM. Dombrock genotyping in Brazilian blood donors reveals different regional frequencies of the HY allele. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013;35(6):400–3.
- Hamblin MT, Di Rienzo A. Detection of the signature of natural selection in humans: evidence from the Duffy blood group locus. *Am J Hum Genet* 2000;66(5):1669–79.
- Howes RE, Patil AP, Piel FB, Nyangiri OA, Kabaria CW, Gething PW, et al. The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun* 2011;2:266.
- Baleotti W Jr, Rios M, Reid ME, Hashmi G, Fabron A Jr, Pellegrino J Jr, et al. Dombrock gene analysis in Brazilian people reveals novel alleles. *Vox Sang* 2006;91(1):81–7.
- Costa FP, Hue-Roye K, Sausais L, Velliquette RW, Da Costa Ferreira E, Lomas-Francis C, et al. Absence of DOMR, a new antigen in the Dombrock blood group system that weakens expression of Do(b), Gy(a), Hy, Jo(a), and DOYA antigens. *Transfusion* 2010;50(9):2026–31.

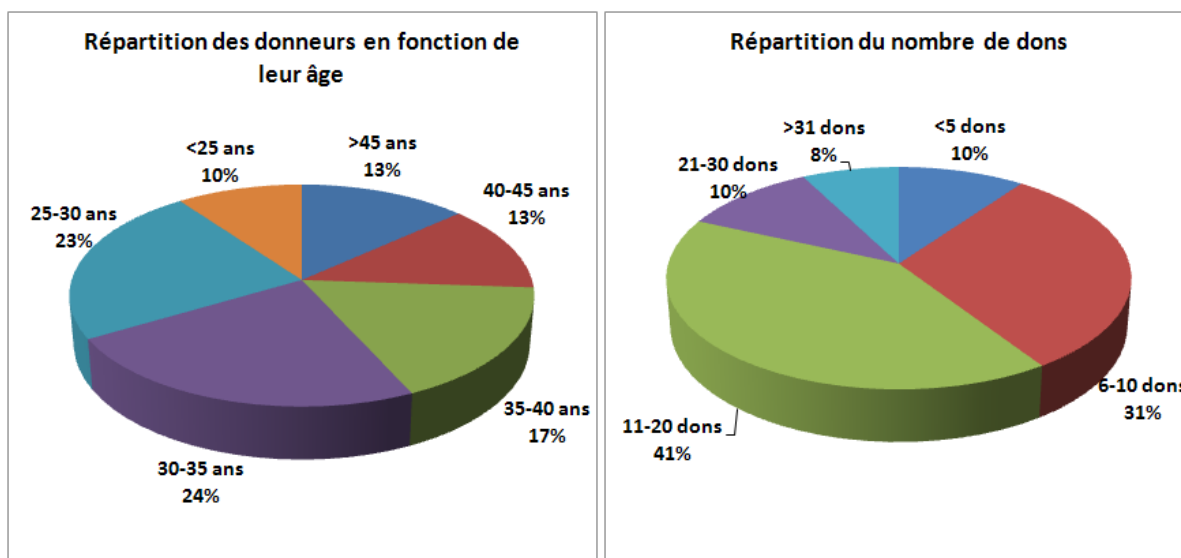
- [34] Mayer B, Thornton N, Yürek S, Wylie D, Hue-Roye K, Poole J, et al. New antigen in the Dombrock blood group system, DOYA, ablates expression of Do(a) and weakens expression of Hy, Jo(a), and Gy(a) antigens. *Transfusion* 2010;50(6):1295–302.
- [35] Beattie KM, Castillo S. A case report of a hemolytic transfusion reaction caused by anti-Holley. *Transfusion* 1975;15(5):476–80.
- [36] Omoto R, Reid ME, Castilho L. Molecular analyses of GYPB in African Brazilians. *Immunohematology* 2008;24(4):148–53.
- [37] Polin H, Danzer M, Reiter A, Brisner M, Gaszner W, Weinberger J, et al. MN typing discrepancies based on GYPA-B-A hybrid. *Vox Sang* 2014;107(4):393–8.
- [38] Ba A, Beley S, Chiaroni J, Bailly P, Silvy M. RH diversity in Mali: characterization of a new haplotype RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2). *Transfusion* 2015;15(6):1423–31.
- [39] Pham BN, Peyrard T, Juszcak G, Dubeaux I, Gien D, Blancher A, et al. Heterogeneous molecular background of the weak C, VS+, hr(B)-, Hr(B)- phenotype in black persons. *Transfusion* 2009;49(3):495–504.
- [40] Reid ME, Storry JR, Sausais L, Tossas E, Rios M, Hue-Roye K, et al. DAK, a new low-incidence antigen in the Rh blood group system. *Transfusion* 2003;43(10):1394–7.

Cette étude est la première évaluation par génotypage de 300 échantillons de sang provenant de donneurs africains recueillis à Bamako. Cette cohorte de donneurs en milieu urbain est constitué majoritairement par des hommes (290 sur 300 soit 96,6%) avec un âge moyen de 34 ans démontrant que les plus jeunes constituent un réservoir à mobiliser. Le caractère multiethnique est démontré avec 30,3% de Bambara, 19,6% de Soninke, 15% de Peulh, 10,6% de Malinke et 5% de Dogon. Les professions les plus représentées sont les commerçants (20,0%), les enseignants/étudiants (19,6%) et les chauffeurs (5,3%). Le nombre de dons réalisés par donneur montre une fidélisation forte de ces derniers avec une moyenne de 13 dons par donneurs et plus de 5 dons pour 90% des donneurs (Figure 14).

A partir de ces prélèvements biologiques recueillis après consentement écrit du donneur, l'ADN génomique a été extrait et vingt huit allèles de groupes sanguins des systèmes RH, KEL, MNS, FY, JK, DO et HPA ainsi que 5 polymorphismes *RHCE* ont été déterminés à l'aide du kit Lifecodes RBC (Gen-Probe Belgium). Ce kit est basé sur une réaction de PCR multiplexe allèle spécifique (PCR-SSO) utilisant la technologie Luminex xMAP. Cet outil moléculaire a la caractéristique d'explorer des polymorphismes à la base d'allèles exprimés dans la population africaine comme *KEL*06*, *GYPB*03N.01*, *GYPB*03N.03*, *DO*01*, *DO*02* et des variants du gène *RHCE*ce*.

Parallèlement, des explorations moléculaires complémentaires ont été mises en œuvre : la recherche du gène hybride *GYP(B-A)* (codant l'antigène Dantu) et le séquençage des exons 4 et 5 du gène *GYPB* (voir matériels et méthode de l'article), le séquençage des régions exoniques des gènes *RHD* et *RHCE* (Granier et al., 2013) et la détection de l'allèle hybride *RHCE*Ce(RN)* (Tournamille et al., 2010b) et de l'haplotype *(C)ces type 1* (Silvy et al., 2013b).

Figure 14 : Caractérisation de la cohorte de 300 donateurs volontaires de Bamako.



Génotypage étendu

Nos résultats de génotypage étendu (KEL, MNS, JK, DO et HPA) (Tableau 21) révèlent que 57 donateurs (19%) expriment des antigènes de basse fréquence à savoir : 2 donateurs génotypés *KEL*01/*02* (0,7%), 44 donateurs porteurs de l'allèle *KEL*06* dont deux homozygotes et 11 donateurs exprimant un phénotype déduit U^{var} dont 2 donateurs avec un génotype *GYPB*03N.03/*03N.03* de phénotype déduit $S-s-U^{var}$. A l'opposé, 34 donateurs (11,3%) n'expriment pas des antigènes de haute fréquence à savoir 2 donateurs homozygotes pour l'allèle *KEL*06* n'exprimant pas l'antigène Js(b), 4 donateurs délétés pour le gène *GYPB* de phénotype déduit $S-s-U-$, 22 donateurs de génotype *DO*01/*01* de phénotype déduit $Do(a+b-)$ et 6 donateurs de génotype *HPA-1b/1b* déficitaires pour l'antigène HPA1(a). Au niveau des fréquences alléliques (Tableau 2 de l'article), nos résultats montrent que les fréquences des deux allèles *HPA-1a* (0,897) et *HPA-1b* (0,103) sont comparables à celles observées au Bénin, au Congo et au Cameroun (Halle et al., 2005). Les fréquences des allèles *KEL*01* (0,003), *KEL*02* (0,997), *KEL*06* (0,077) et *KEL*07* (0,923) du système Kell sont similaires aux fréquences précédemment rapportées pour les différentes populations originaires d'Afrique investiguées. Les fréquences des allèles *JK*01* (0,768), *JK*02* (0,232), *GYPB*01* (0,423) et *GYPB*02* (0,577) diffèrent de celles rapportées dans la population somalienne (Badjie et al., 2011) et une cohorte de 2000 afro-américains (Hashmi et al., 2007) suggérant une différence

régionale ou ethnique des fréquences alléliques de groupes sanguins comme cela a déjà été signalé (Piassi et al., 2013; Silvy et al., 2013a).

Tableau 21 : Fréquences des phénotypes déduits pour **l'expression d'antigènes de base fréquence** et **l'absence d'expression d'antigènes de haute fréquence** chez les 300 donateurs de Bamako.

Système	Génotype	Phénotype déduit	n =	Fréquence phénotypique
Kell	<i>KEL*01/*02</i>	K+ k+	2	0.007
	<i>KEL*06/*06</i>	Js(a+ b-)	2	0.007
	<i>KEL*06/*07</i>	Js(a+ b+)	42	0.140
Duffy	<i>FY*02N.01/*02N.01</i>	Fy(a- b-)	297	0.990
MNS	<i>GYPB deletion</i>	S- s- U-	4	0.013
	<i>GYPB*04/*03N.01</i>	S- s+ U+ U ^{var}	1	0.003
	<i>GYPB*04/*03N.03</i>	S- s+ U+ U ^{var}	8	0.027
	<i>GYPB*03N.03/*03N.03^S</i>	S- s- U ^{var}	2	0.007
Dombrock	<i>DO*01/*01</i>	Do(a+ b-)	22	0.073
HPA	<i>HPA-1b/1b</i>	HPA1(a- b+)	6	0.02

Comme attendu, la fréquence de l'allèle *FY*02N.01* (0,995) qui conduit à l'absence de protéine FY dans les globules rouges et empêche *Plasmodium Vivax* de pénétrer dans les cellules de l'hôte, est prépondérante au Mali comme dans un grand nombre de pays d'Afrique subsaharienne aboutissant à 99% de la population malienne avec un phénotype Fy(a-b-). En effet, une sélection «directionnelle» ou darwinienne a eu lieu au niveau du locus Duffy conduisant à une fixation extrême proche de 100% de l'allèle nul dans les régions ouest, centrale et orientale de l'Afrique. A l'opposé, cet allèle nul montre une fréquence fortement diminuée dans le nord du Sahel, la Namibie et la région sud de l'Afrique du Sud et il est pratiquement absent des populations originaires d'autres régions du monde. La comparaison avec les populations afro-américaines (0,995 *versus* 0,715) montre une variation significative ($p < 0,001$) qui peut s'expliquer par le métissage qui caractérise les afro-Américains (Solovieff et al., 2011).

Les fréquences des allèles *DO*01* (0,267) et *DO*02* (0,733) déterminées à partir de la cohorte de donateurs maliens sont conformes aux données rapportées par Hashmi et collaborateurs (Hashmi et al., 2007) soit 7,3% d'homozygote *DO*01/*01*, 38,7% d'hétérozygote *DO*01/*02* et 54% d'homozygote *DO*02/*02*. Néanmoins, un grand nombre d'allèles variants non investigués par l'outil moléculaire mis en œuvre dans cette étude, sont

décrits chez les individus d'ascendance africaine, en particulier les allèles *DO*02.-04* et *DO*01.-05* respectivement responsable de l'absence d'expression des antigènes Holley (Hy) et Joseph (Jo^a). Étant donné que des anticorps anti-Do sont impliqués dans des réactions hémolytiques après transfusion, il serait judicieux d'inclure au minimum la détection des deux polymorphismes en position 323 et 350 définissant les allèles *DO*02.-04* et *DO*01.-05* pour le génotypage des populations d'ascendance africaine.

Le phénotype S-s-U- résultant de la délétion du gène *GYPB* et le phénotype S-s-U^{var} codé par les allèles variants *GYPB*03N.01* et *GYPB*03N.03* sont caractéristiques des personnes d'ascendance africaine. Du fait de l'absence d'anticorps performant anti-U, la fréquence de phénotype U-négatif en Afrique n'est pas connue et reste imprécise pour la population afro-américaine (entre 0,2 et 1,4%). En effet, les prélèvements de phénotypes S-s-U^{var} donnent des résultats positifs ou négatifs avec les anticorps sériques actuellement disponibles (Daniels, 2013b). Notre étude révèle une fréquence de 1,3% (4/300) de phénotype prédit S-s-U- qui est comparable à la fréquence observée dans la population afro-américaine (4/271) (Hashmi et al., 2007), mais inférieure aux fréquences rapportées pour les individus d'origine africaine du Brésil (5,2 à 7,8%) (Omoto et al., 2008). De même, les fréquences des allèles variants *GYPB*03N.01* et *GYPB*03N.03* à la base du phénotype S-s-U^{var}, sont comparables entre les donneurs maliens (respectivement, 0,002 et 0,02) et afro-américains (respectivement, 0,004 et 0,015). Des fréquences supérieures ont néanmoins été rapportées pour les individus d'origine africaine du Brésil (pour l'allèle *GYPB*03N.01* entre 0 et 0,018 et pour l'allèle *GYPB*03N.03* entre 0,039 et 0,052) (Faria et al., 2012; Omoto et al., 2008).

Parallèlement, la recherche de l'allèle hybride *GYP(B-A)* à la base du néo-antigène privé Dantu (MNS25) a été réalisée par PCR sachant qu'une prévalence de 0,5% est estimée chez les Afro-américains. Nos résultats n'ont identifié aucun allèle hybride parmi nos 300 donneurs, seul un échantillon génotypé *GYP(A)*02/*02*, est apparemment identifié porteur de trois allèles *GYPB*03N.03*, *GYPB*03N.01* et *GYPB*04*. Il est fort probable que nous sommes en présence, en plus des gènes *GYP(A)* et *GYP(B)*, d'un gène hybride impliquant les gènes *GYP(E)* et *GYP(B)* ou les gènes *GYP(B)* et *GYP(A)* comme cela a été précédemment rapporté (Daniels, 2013b; Polin et al., 2014a). Des explorations complémentaires seraient nécessaires mais actuellement impossibles en raison de l'absence de l'échantillon de sang compatible avec l'étude des ARNm et des analyses immunologiques complémentaires. Dans l'ensemble,

l'analyse des allèles *GYPB* et *GYP(B-A)* pour Dantu a permis de mettre en évidence que les donneurs du Mali sont similaires aux Afro-américains en ce qui concerne les spécificités S, s, U, U^{var} et Dantu.

Sur le plan méthodologie, une corrélation supérieure à 99,3 % à été observée entre le phénotype étendu (RhCcEe, K, S/s, Jka/b et Fya/b) déduit du génotype et l'analyse phénotypique utilisant la technique d'agglutination en gel réalisée au CNTS de Bamako.

Exploration des polymorphismes RHCE

Cette analyse montre comme attendu une proportion élevée de donneurs *RHCE*ce* homozygote soit 74,34% (n=223) des donneurs de la cohorte. Parallèlement, 5 donneurs sont génotypés homozygotes *RHCE*cE* (1,66%) et deux autres sont homozygotes *RHCE*Ce* (0,67%). Enfin, 11,66% (soit 35 donneurs) sont hétérozygotes *RHCE*ce/*cE*, 11% (soit 33 donneurs) sont hétérozygotes *RHCE*ce/*Ce* et les deux derniers donneurs (0,67%) sont *RHCE*C*, *RHCE*c*, *RHCE*E* et *RHCE*e*.

Parallèlement, l'exploration des 3 polymorphismes *RHCE* aux positions 106G>A, 122A>G et 697C>G a montré comme attendu l'absence des variants européens codant pour les antigènes C^x (106G>A) et C^w (122A>G), ainsi que l'absence de l'allèle rare *RHCE*ceCF* (Crawford, 697C>G) qui donne un signal RhD partiel avec certains anticorps anti-RhD.

L'exploration des 5 autres polymorphismes *RHCE* en position 667(G>T), 712(A>G), 733(C>G), 1006(C>T) et 1025(C>T) associée à des explorations complémentaires (voir matériels et méthode de l'article), a montré que le polymorphisme 733C>G est le plus fréquent entraînant l'expression des antigènes de base fréquence RH:10(V) et/ou RH:20(VS) chez 139 donneurs (Tableau 22). Il est à noter que 15 d'entre eux sont homozygotes 733G impliquant l'absence de l'antigène de haute fréquence RH:31(hr^B). Dix-neuf donneurs sont porteurs du polymorphismes 1006T dont 15 à l'état hétérozygote au sein d'un haplotype *(C)ces type 1* et 3 donneurs pouvant être porteur d'un haplotype *DIIIa ces* ou *(C)ces type 2*. Le dix-neuvième d'entre eux est porteur du polymorphisme 1006T au sein de l'haplotype *(C)ces type 1* à l'état homozygote définissant un phénotype rare caractérisé par l'absence des antigènes de haute fréquence RH31(hr^B) et RH34(Hr^B) et l'expression des antigènes de basse fréquence RH:20(VS) et RH:42 ainsi que l'expression partielle des antigènes C, c et e.

Le polymorphisme 712C>G caractéristique des allèles *RHCE*ceAR/*ceBI/*ceEK/*ceSM* est identifié à l'état hétérozygote chez 3 donneurs. Le polymorphisme 667T caractéristique de l'allèle *RHCE*ceMO* est présent chez 10 donneurs dont deux donneurs de génotype *RHCE*ceMO/*ce* n'exprimant pas l'antigène de haute fréquence RH:19(hr^S). Enfin le polymorphisme 1025C>T à l'état hétérozygote définit 8 donneurs porteurs d'un allèle *RHCE*ceTI* et 3 donneurs porteurs de l'allèle variant *RHCE*ceTI(D2)* définissant pour ce dernier une fréquence allélique de 0,01% chez les donneurs du Mali à comparer à la fréquence de 2,4% observée précédemment chez l'ethnie Dogon du Mali (voir chapitre suivant). Il est à noter que l'expression des antigènes de haute et basse fréquence par les allèles variants *RHCE*ce* mentionnés ci-dessus, sont toujours associés à une expression partielle de l'antigène Rhe voire de l'antigène Rhc.

Des analyses complémentaires ont permis de mettre en évidence que douze donneurs soit 4% sont porteurs d'un allèle hybride *RHCE*Ce-(D4)-Ce* (ou *RHCE*CeRN*) et par conséquent expriment les antigènes RH:54(DAK) et RH:32. Ce résultat est en accord avec des résultats antérieurs qui prédisent un taux de prévalence de 8,1% de RH:54 en Afrique (Granier et al., 2013). A l'opposé, aucun homozygote *RHCE*Ce-(D4)-Ce* déficitaire pour l'antigène RH46 n'a été observé.

Enfin, trois ADNg de donneurs ont montré des résultats discordants entre les résultats du kit utilisé et une approche par séquençage direct des exons. Ces discordances aux positions 667, 712 et 733 sont très probablement liées à la présence d'un polymorphisme synonyme supplémentaire *RHD(744T)* connu (Silvy et al., 2011b) qui affecterait la spécificité des couples d'amorces *RHCE* mises en œuvre dans le kit. Ce constat illustre les limites des tests de génotypage et la nécessité de précaution pour l'interprétation des données. Ce travail met également en lumière que la détection de certains allèles fréquents dans les populations originaires d'Afriques et pertinents en médecine transfusionnelle, font défaut dans le kit mis en œuvre dans cette étude. Pour mémoire nous citerons l'absence de détection : (i) de l'allèle *RHCE*Ce-(D4)-Ce* qui à l'état homozygote est associé au phénotype rare RH:-46, RH:32 et RH:54(DAK), (ii) des allèles *RHCE*Ce-(D4)-Ce*, *RHD*DOL* et *RHD*DIIIa* pour l'expression du phénotype DAK-positif, (iii) des allèles *DO*02.-04* et *DO*01.-05* pour respectivement l'expression des phénotypes Hy-négatif et Jo-négatif (Daniels, 2013b; Granier et al., 2013; Pham et al., 2009c; Silvy et al., 2014) et (iv) des allèles

*RHCE*ces(340)* et *RHCE*ce(254)* pour respectivement l'absence d'expression des antigènes de haute fréquence RH:57(CEST) et RH59:(CEAG) .

Dans son ensemble, l'outil moléculaire a permis l'identification de 178 donneurs (59,3%) qui expriment au moins un antigène de base fréquence, à savoir, K+ (n=2), Js(a+) (n=44), U^{var}-positif (n=11), RH:10/20 positif (n = 139) ou RH:54 (DAK, n=12), et en dehors du génotype homozygote *FY*02N.01* prépondérant, 47 donneurs (15,6%) qui n'expriment pas un antigène de haute fréquence comme Js(b-) (n=2), U-négatif (n=4), Do(b-) (n=22), HPA1a-négatif (n=6) ou RH:-19 et RH :-61 (n=2), RH:-31 (n=15) ou RH -34 (n=1).

Tableau 22 : Fréquences des polymorphismes *RHCE*ce* et leurs expression associées des antigènes de haute et basse fréquence

SNP	Allèle probable	n =	Status homozygote	Ag de haute fréquence absent	Ag altéré (partiel)	Ag de basse fréquence exprimé
667G>T	<i>RHCE*ceMO</i>	10	0	RH:19(hr ^S), RH:31(hr ^B), RH:61	e	-
712A>G	<i>RHCE*ceAR</i>	3	0	RH:18(Hr ^S), RH:19(hr ^S)	c, e	RH:10(V)
	<i>RHCE*ceEK</i>			RH:18(Hr ^S), RH:19(hr ^S)	e	-
	<i>RHCE*ceBI</i>			RH:18(Hr ^S), RH:19(hr ^S)	e	RH:49(STEM)
	<i>RHCE*ceSM</i>			RH:18(Hr ^S), RH:19(hr ^S)	e	RH:49(STEM)
733C>G	Nombreux allèles	139	15	oui	e	oui
1006C>T	<i>RHCE*(48C,733G,1006T)</i>	19 [#]	1	RH:31(hr ^B), RH:34(hr ^B)	e	RH:20(VS)
1025C>T	<i>RHCE*ceTI</i> ou <i>*ceTI(D2)</i>	11 [†]	0	RH:18(Hr ^S), RH:19(hr ^S)	c, e	-

[#] 16 sur 19 correspondent à un haplotype (*C*)*ces type 1*

[†] 3 sur 11 correspondent à un allèle *RHCE*ceTI(D2)* en *cis* d'un allèle *RHD*DIVa*

Conclusion

Nos résultats fournissent les premières données de polymorphismes érythrocytaires chez les donneurs de sang du Mali et confirment l'efficacité de la stratégie du génotypage multiplex pour déduire du génotype un phénotype étendu et avoir des polymorphismes d'alertes pour identifier des donneurs potentiellement rares (RH:-34, RH:-18 et RH -46). Ce travail souligne également la nécessité de développer des stratégies de génotypage basées sur l'origine ethnique des individus.

À partir de ce constat et compte tenu que les allèles variants *RHCE* partiels se retrouvent très fréquemment au sein d'haplotype *RHD/CE* avec une expression antigénique RhD partiel, il s'est imposé dès lors l'objectif de réaliser un recensement précis des variants *RHD* et *RHCE* par séquençage en fonction de l'origine ethnique. Deux groupes ethniques les Dogons et les Peulhs de la 5^{ème} région (Mopti) ont été choisis et prélevés, ce qui à fait l'objet du chapitre suivant.

II. Diversité génétique du système RH chez les Dogons et les Peulhs

Le système RH est l'un des plus polymorphes et des plus immunogènes parmi les 36 systèmes de groupes sanguins érythrocytaires définis par l'International Society Blood Transfusion (ISBT). Les anticorps anti-Rh sont impliqués dans la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né, les réactions transfusionnelles hémolytiques ou dans les anémies hémolytiques auto-immunes.

La complexité du système RH est liée à la grande diversité des antigènes (plus de 50 antigènes) et au grand nombre de variants (Reid M, 2012). Ils résultent de différents mécanismes moléculaires incluant le polymorphisme nucléotidiques simples (SNP), la conversion génique, le "crossing-over", l'insertion et la délétion de nucléotides.

La plupart des variants *RH* s'expriment chez les personnes d'ascendance africaine. Certains variants tels que *RHD*DAU-3*, *RHCE*ceTI* et *RHCE*Ce-D(4)-Ce* (ou *RHCE*Ce(RN)*) codent pour des polypeptides qui expriment des antigènes Rh partiels associés à la production d'allo-anticorps anti-Rh (Tournamille et al., 2010b; Wagner et al., 2002). D'autres variants sont dit faibles puisqu'aucune allo-immunisation n'a été rapportée. Le locus *RH* constitué de 2 gènes liés, peut conduire à des phénotypes partiels à la fois pour les antigènes D, C, c et/ou e comme par exemple avec les haplotypes *RHD*DIIIa/RHCE*ce(1025T)* (Westhoff et al., 2013a), *RHD*DIVa/RHCE*ceTI* (Westhoff et al., 2013a), *RHD*DOL/RHCE*CeBI* (Roussel et al., 2013) et *(C)ces type 1*.

Parallèlement, des changements d'acides aminés *via* des polymorphismes de l'ADNg peuvent conduire à l'expression d'antigènes de basse fréquence ou la perte d'expression d'antigènes de haute fréquence. Par exemple, les polypeptides Rh codés par les allèles *RHD*DIIIa*, *RHCE*DOL* et *RHCE*Ce-D(4)-Ce* expriment l'antigène de basse fréquence RH:54(DAK) qui est présumé cliniquement relevant vis-vis de l'allo-immunisation. À l'opposé, des phénotypes rares n'expriment pas les antigènes de haute fréquence. On peut citer (i) le phénotype RH:-18 observé chez l'individu homozygote apparent *RHD*DAR* présentant en *cis* un allèle *RHCE*ceAR* ou *RHCE*ceEK* à l'état homozygote ou hétérozygote composite, (ii) le phénotype RH:-34 résultant de l'homozygotie des haplotypes *(C)ces type 1*, *(C)ces type 2*, ou *RHD*DIIIa/RHCE*CE(733G, 1006T)*, et (iii) le phénotype RH:- 46 produit par l'homozygotie de l'allèle *RHCE*Ce-D(4)-Ce* (Noizat-Pirenne et al., 2002b; Pham et al., 2009c). En cas d'allo-immunisation, la production d'anticorps anti-RH18, anti-RH34, ou anti-RH46 peut être cliniquement relevant et nécessiter des précautions particulières en cas de grossesse ou de

transfusion, en particulier, *via* l'utilisation d'unité de sang rare dépourvu de l'antigène concerné (Noizat-Pirenne et al., 2002b).

Fort de ces constats, il est évident que des analyses de grandes cohortes d'individus appartenant à différents groupes ethniques d'Afrique seraient bénéfiques pour définir la prévalence et la répartition des allèles ainsi que les phénotypes associés. A l'issue de telles démarches, des stratégies adaptées aux populations ou ethnies pourront être élaborées afin d'optimiser la sécurité transfusionnelle et en particulier en direction des patients drépanocytaires qui nécessitent des transfusions itératives. Dans cette optique, nous avons choisi de décrire la diversité génétique du locus *RH* par séquençage des régions exoniques et introniques proximales de deux groupes ethniques du Mali, les Dogons et les Peulhs de la 5^{ème} région (Mopti).

Les résultats de cette étude sont rapportés dans une publication publiée dans la revue *Transfusion*.

Article n°2 : Ba, A., Beley, S., Chiaroni, J., Bailly, P. and Silvy, M.

RH diversity in Mali: characterization of a new haplotype *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)*
Transfusion. 2015 Jun;55(6 Pt 2):1423-31.

RH diversity in Mali: characterization of a new haplotype *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)*

Alhassane Ba,^{1,3} Sophie Beley,^{2,3} Jacques Chiaroni,^{2,3} Pascal Bailly,^{2,3} and Monique Silvy^{2,3}

BACKGROUND: Knowledge of RH variants in African populations is critical to improving transfusion safety in countries with populations of African ancestry and to providing valuable information and direction for future development of transfusion in Africa. The purpose of this report is to describe RH diversity in individuals from Mali.

STUDY DESIGN AND METHODS: Blood samples collected from 147 individuals self-identified as Dogon and Fulani were analyzed for Rh antigens and alleles.

RESULTS: The most common *RHD* allele variant was *RHD*DAU0*. Five predicted partial-D phenotypes were attributed to *RHD*DAU3* or *RHD*DIVa*. Neither *RHD*DAR* nor *RHD*DIIIa* was found. Investigation of *RHCE* revealed three predicted partial-e antigens encoded by *RHCE*ce(254G)* in trans to *RHCE*cE*. Regarding C antigen, 28 Fulani typed as C+ and 16 of 28 harbored at least one *RHCE*Ce-D(4)-ce*, two being homozygous and predicted to show a rare RH:32, -46 phenotype. A new *RHCE*ceTI* with replacement of Exon 2 by *RHD (RHCE*ceTI(D2))* was identified in Dogon and was identified by inheritance study to be in cis to *RHD*DIVa*. These samples typed C- with anti-C polyclonal antibody and monoclonal antibodies (MoAbs) MS24, P3X2551368+MS24, and MS273, but positive with anti-RhCe MoAb-BS58. The same pattern was observed in sample with *RHD*DIVa/RHCE*ceTI*.

CONCLUSION: Our survey indicated an uneven distribution of *RH* variant alleles between Dogon and Fulani, suggesting that study in well-documented cohorts is warranted. A high incidence of predicted partial-C phenotype encoded by *RHCE*Ce-D(4)-ce* was found in Fulani. Further study will also be needed to clarify the clinical significance of the new *DIVa/ceTI(D2)* haplotype encoding partial D and variant ce antigens.

The RH blood group is one of the most polymorphic and immunogenic blood group systems. Antibodies directed against Rh antigens have been implicated in hemolytic disease of the fetus and newborn, hemolytic transfusion reactions, and autoimmune hemolytic anemia. Rh antigens are encoded by the homologous *RHD* and *RHCE* genes that share 93.8% homology over all introns and coding exons. These two genes consist of 10 exons each and are closely linked in opposite orientation on chromosome 1p36.11.¹

The complexity of the RH blood group is related to the high diversity of Rh antigens (n = 54) and *RH* variant alleles.² *RH* alleles originate from a variety of molecular mechanisms including single-nucleotide polymorphism (SNP), genetic conversion, crossing over, and insertion-deletion. Most *RH* allele variants have been encountered in people of African ancestry. Some variants such as *RHD*DAU3*, *RHCE*ceTI*, and *RHCE*Ce-D(4)-ce* (also known as *RHCE*CeRN*) encode proteins considered as partial due to their association with antibody production.³⁻⁵ Other variants are referred to as weak since no immunization has been described. Interlinkage between *RHD* and *RHCE* can lead to phenotypes with both partial D and c and/or e antigens as observed for *RHD*DIIIa/*

ABBREVIATIONS: SCD = sickle cell disease; SNP(s) = single-nucleotide polymorphism(s).

From the ¹Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS), Bamako, Mali; and the ²Etablissement Français du Sang Alpes Méditerranée and ³UMR 7268 ADÉS, Aix-Marseille Université-EFS-CNRS, Marseille, France.

This study was funded by Établissement Français du Sang, France

Address reprint requests to: Monique Silvy, PhD, Laboratoire d'Hématologie Moléculaire, EFS Alpes Méditerranée, 207 Boulevard Sainte Marguerite, 13009, Marseille, France; e-mail: monique.silvy@efs.sante.fr.

Received for publication September 8, 2014; revision received March 3, 2015; and accepted March 9, 2015.

doi:10.1111/trf.13109

© 2015 AABB

TRANSFUSION 2015;55:1423-1431

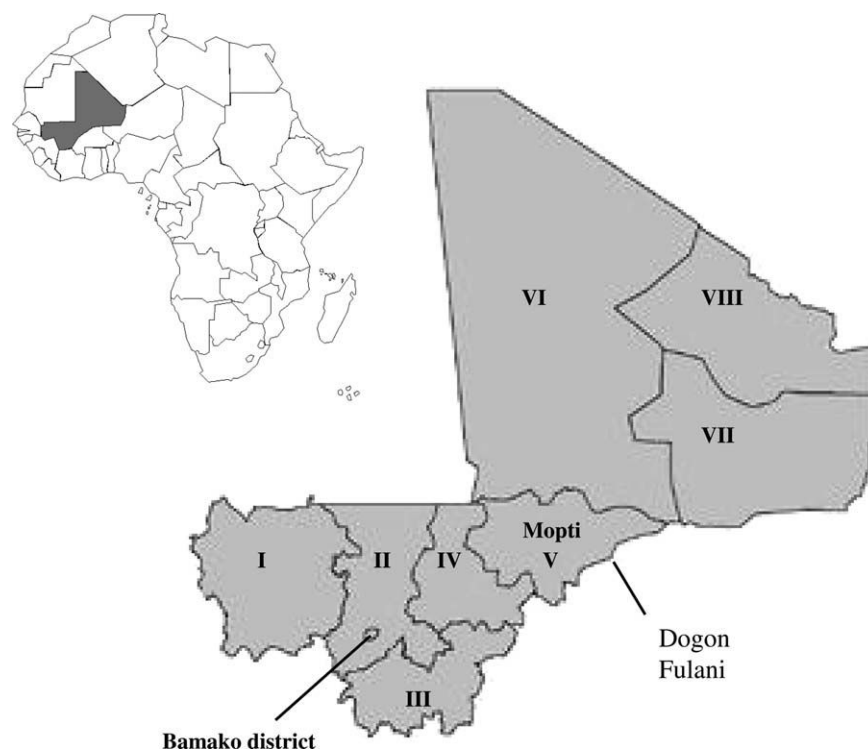


Fig. 1. Geographic localization of Mali. The eight administrative regions (I to VIII) and Bamako district are shown. Dogon and Fulani were from Region V (Mopti).

*RHCE*ce(1025T)*,⁴ *RHD*DIVa/RHCE*ceTI*,⁴ and *RHD*DOL/RHCE*ceBI* haplotype.⁶

Amino acid changes encoded by DNA polymorphisms can induce expression of low-prevalence antigens or lack of expression of high-prevalence antigens. Accordingly, Rh proteins encoded by *RHD*DIIIa*, *RHD*DOL*, or *RHCE*Ce-D(4)-ce* express the low-prevalence RH:54 antigen that is presumed to be of clinical significance.² Several rare phenotypes have been observed. RH:–18 is encountered in individuals who are apparent homozygous for *RHD*DAR* in cis to *RHCE*ceAR* or **ceEK* (or compounds heterozygous). RH:–34 has been linked to homozygosity for the (*C*)*ceS Type 1*, (*C*)*ceS Type 2*, or *RHD*DIIIa/RHCE*ce(733G,1006T)* haplotypes. RH:46 is lacking in individuals who are homozygous for *RHCE*Ce-D(4)-ce* allele.^{7–9} Production of anti-RH18, anti-RH34, or anti-RH46 can be clinically significant requiring special precautions for pregnancy and transfusion, for example, use of equivalent rare antigen-negative red blood cells (RBCs).⁷

In a recent editorial in **TRANSFUSION**, it was suggested testing of large cohorts of selected ethnic groups to assess allele and phenotype prevalence is essential to allow future evidence-based decisions¹⁰ to optimize transfusion safety, especially for sickle cell disease (SCD) patients who undergo chronic transfusions. The purpose of this report is to describe genetic diversity observed by sequencing *RHD* and *RHCE* alleles in a random survey of individuals from two ethnic groups in Mali.

MATERIALS AND METHODS

Serologic study

Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) blood samples were collected from 147 individuals self-identified as Dogon (n = 101) and Fulani (n = 46) in Region V of Mali (Mopti; Fig. 1). Participants provided written informed consent. Study and consent protocols were approved by the Comité d’Ethique Institutionnel de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d’Odontostomatologie in Mali.

All blood samples were phenotyped for D, C, E, c, and e antigens using the gel column agglutination method (Ortho Clinical Diagnostics, Illkirch, France) with the following monoclonal antibodies (MoAbs): D7B8 for anti-D, MS24 for anti-C, C2 for anti-E, MS42 for anti-c, and MS16 + MS21 + MS63 for anti-e. Additional testing for C expression was performed on one sample with *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)* haplotype and samples with the *RHD*DIVa/RHCE*ceTI* haplotype. Direct agglutination test (DAT) in gel matrix, test tube, and microplate was performed using anti-C MoAbs MS24 (Ortho Clinical Diagnostics), MS273 (Eurobio, Courtaboeuf, France), P3X2551368+MS24 (Diagast, Loos, France), respectively. Indirect antiglobulin tests (IATs) were performed with anti-Ce MoAb BS58.¹¹

Sequencing of *RHD* and *RHCE*

Genomic DNA was isolated from 200 μ L of whole blood using a blood DNA mini-kit (QIAmp, Qiagen,

TABLE 1. Rh phenotypes in Dogon and Fulani

Rh phenotype	Dogon (n = 101)		Fulani (n = 46)		Total (n = 147)		Frequency in Africa ² (%)
	Number	Frequency (%)	Number	Frequency (%)	Number	Frequency (%)	
D+C-c+E-e+	61	60.4	16	34.8	77	52.4	45.8
D+C+c+E-e+	14*	13.9	21	45.7	35	23.8	21.0
D+C-c+E+e+	17	16.8	1	2.2	18	12.2	18.6
D-C-c+E-e+	4	4.0	2	4.3	6	4.1	6.8
D+C+c+E+e+	3*	3.0	1	2.2	4	2.7	4.0
D+C+c-E-e+	0	0	5	10.9	5	3.4	2.0
D+C-c+E+e-	0	0	0	0	0	0.7	0.2
D-C+c+E-e+	2*	2.0	0	0	2	1.4	Rare
D-C-c+E+e+	0	0	0	0	0	0	Rare

* C+ phenotype was due to (C)ceS Type 1 haplotype in two samples with D+C+c+E-e+ phenotype, one sample with D+C+c+E+e+ phenotype, and two samples with D-C+c+E-e+ phenotype.

Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) assay was performed on the 10 exons of the *RHD* and *RHCE* genes as previously described.¹² Briefly, amplification was performed with 100 ng of genomic DNA in a final volume of 50 μ L containing PCR buffer, 2 mmol/L MgCl₂, 80 ng/ μ L bovine serum albumin, 0.2 mmol/L of each dNTP, 0.05 unit of *Taq* DNA polymerase, and 200 nmol/L of each primer. Touchdown PCR included a 5-minute denaturation step at 94°C followed by amplification cycles consisting of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at the annealing temperature, and 1 minute at 72°C. Hybridization temperature was lowered 1°C every 2 cycles from 66 to 61°C and then a 30-cycle annealing step was performed at 60°C. Determination of the presence or absence of each exon of *RHD* and *RHCE* genes was performed on 2% agarose gel and visualized using DNA stain (Sight, Euromedex, Strasbourg, France). PCR products were sequenced using the Sanger technique (GATC Biotech, Konstanz, Germany). Sequence alignment to identify polymorphisms was performed using computer software (SeqMan Pro, DNASTAR, Inc., Madison, WI). The presence of the *RHCE**Ce-D(4)-ce allele was confirmed by allelic discrimination using probes (TaqMan, Life Technologies, Carlsbad, CA) as previously described.⁵

Allele frequencies were determined by counting. Since no *RHD* zygosity determination was performed, results were based on sequencing data. We assumed that any sample with heterozygous polymorphism (SNP or STR in coding or noncoding sequence) was dizygous. When no information on zygosity was available (apparent homozygous), *RHD* allele frequency was calculated in the two extreme conditions (hemizygous and dizygous). Any polymorphism compared to conventional sequence was considered as defining a variant allele independently of clinical relevance (Table 2). Partial predicted c and e phenotypes were deduced from published data showing anti-*alloimmunization* in e+ patient or anti-c in c+ patient.

RESULTS

D and CE phenotypes

A total of 147 blood samples collected from two ethnic groups (Dogon and Fulani) in Mali were phenotyped for D, C, E, c, and e antigens. Analysis of phenotype frequency in the overall cohort indicated a typical African profile with a predominance of D+C-c+E-e+ (52.4%) and D+C+c+E-e+ (23.8%; Table 1). Comparison of Dogon and Fulani demonstrated a number of differences. The D+C+c-E-e+ phenotype was absent in Dogon and frequent in Fulani (10.9%) while the D+C-c+E+e+ phenotype was uncommon in Fulani (2.2%) but frequent in Dogon (16.8%).

RHD allele variants

Eight samples, that is, six Dogon and two Fulani, were typed as D-. This phenotype was linked to homozygous *RHD* deletion in four Dogon and one Fulani or the presence of *RHD* pseudogene (*RHD**DPsi) and/or (C)ceS Type 1 haplotype. One Fulani was homo- or hemizygous for *RHD**DPsi. One Dogon had (C)ceS Type 1 in trans to *RHD* deletion and another was heterozygous for *RHD**DPsi and (C)ceS Type 1.

No variant *RHD* allele was observed in 35 Dogon and 34 Fulani. In the remaining 78 samples, a variety of variant alleles were found (Table 2). The most common *RHD* allele variant was *RHD**DAU0 with a frequency of 0.217 to 0.247 in Dogon and 0.076 in Fulani. The *RHD**DAU0.1 allele was identified in six Dogon. Four *RHD* alleles encoding D partial phenotype were found with the most frequent being *RHD**DIVa in Dogon (frequency, 0.029) and *RHD**DAU3 in Fulani (frequency, 0.043). Four samples with *RHD**DIVa or *RHD**DAU3 allele homo- or hemizygous (or in trans to silent allele) were predicted to express a partial D phenotypes, that is, three in Dogon (2.9%) and one in Fulani (2.2%). All samples with predicted partial D phenotypes were typed D+ by hemagglutination.

TABLE 2. Distribution of RHD and RHCE variants identified in Dogon and Fulani

Allele and haplotype variant	Predicted Rh partial antigen*	Number of alleles				Allele frequency			Published frequency		
		Dogon (n = 202)	Fulani (n = 92)	Dogon (n = 202)	Fulani (n = 92)	Dogon (n = 202)	Fulani (n = 92)	Sub-Saharan Africa ¹²	French donors ²⁰	SCD patient (France) ¹⁷	SCD patient (US) ¹⁶
RHD		84-102	51-78	0.416-0.0500	0.554-0.848	NT	NA	NA	NA	NA	
RHD*DIVa	D	6	0	0.029		0.009	0.019	0.018	0.018	0.009	
RHD*DAU3	D	4-5	4-5	0.019-0.024	0.043-0.054	0.030-0.034	0.041	0.021	0.021	0.018	
RHD*DAU5	D	2	0	0.009		0.016	0.019	0.015	0.015	0.020	
RHD*DFR-2	D	1	0	0.004			NA				
RHD*weak Type 4.0		5	0	0.024		0.018-0.020	0.038	0.022	0.022	0.049	
RHD*DAU0		44-50	7	0.217-0.247	0.076	0.177-0.261	0.022	0.187	0.187	0.164	
RHD*DAU0.1		6-8	0	0.029-0.039		NT	NT	NT	NT	NT	
RHD*DiIla-CE(4-7)-D†	C	5	0	0.024		0.027	0.032	0.026	0.026	0.046	
RHD*Dpsi		7	1-2	0.034	0.010-0.020	0.050-0.057	0.107	0.028	0.028	0.027	
RHD deletion†		8	2	0.199	0.147	NT	NA	NT	NT	NT	
RHCE*cE(48C)		2	0	0.009		0.252	NA	0.186	0.186	0.192	
RHCE*ce(48C)		47	14	0.227	0.152	NT	NT				
RHCE*ce(48C,105T)		2	0	0.009		NT	NT				
RHCE*ce(48C,254G)	e	1	0	0.004		NT	NT				
RHCE*ce(254G)§	e	20	11	0.099	0.119	NT	NT	0.047	0.047	0.058	
RHCE*ceT(D2)		5	0	0.024			NT				
RHCE*ceT§	c, e	1	0	0.004		0.020	0.032	0.015	0.015	0.033	
RHCE*ceMO§	c, e	1	0	0.004		0.030	0.028	0.012	0.012	0.015	
RHCE*ce(733G)§	c, e	16	14	0.074	0.152	0.182	NA	0.224	0.224	0.197	
RHCE*ce(48C,733G)§	c, e	21	5	0.108	0.054						
RHCE*ce(733G,1006T)†§	c, e	1	0	0.004			NA	0.006	0.006	0.006	
RHCE*ce(48C,733G,1006T)†§	c, e	4	0	0.019		0.030	0.016	0.006	0.006	0.002	
RHCE*Ce-D(4)-ce§	C	0	18		0.195		0.030				

* Partial predicted phenotypes were deduced from published data showing anti-e alloimmunization in e+ patient or anti-c in c+ patient.

† Part of (C)ceS Type 7 haplotype.

‡ Frequency of RHD deletion was calculated based on homozygous samples.

§ Alleles encoding protein that lacks expression of high-prevalence antigen(s).

NA = not available; NT = not tested.

TABLE 3. Relevant nucleotide polymorphisms in samples with *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)* haplotype*

Sample	Genotype	RHD		RHCE	
		Intron1/Exon 2	Exon 1	Intron 1/Exon 2	Intron 2/Exon 3
1	<i>DIVa ceTI(D2)</i> <i>(C)ceS Type 1</i>	<i>IVS1-485g/a</i> IVS-376g 186T	48C	<i>IVS1-204c/t</i> <i>IVS1-29g/c</i> <i>IVS1-20a/g</i> 150C/T 178C/A 201A/G 203A/G 307C/T	<i>IVS2-91a/g</i> <i>IVS2-32c/t</i>
2	<i>DIVa ceTI(D2)</i> <i>Weak D Type 4.0 ce</i>	<i>IVS1-376a/g</i> IVS-29c 186G/T	48G/C	<i>IVS1-204c/t</i> <i>IVS1-20a/g</i> 150C/T 178C/A 201A/G 203A/G 307C/T	<i>IVS2-91a/g</i> <i>IVS2-32c/t</i>
3	<i>DIVa ceTI(D2)</i> <i>DAU0.1 ce(254G)</i>	<i>IVS1-376a/g</i> 186G/T	48G/C	<i>IVS1-204c/t</i> <i>IVS1-20a/g</i> 150C/T 178C/A 201A/G 203A/G 254C/G 307C/T	<i>IVS2-91a/g</i> <i>IVS2-32c/t</i>
4	<i>DIVa ceTI(D2)</i> <i>DAU0 ce(48C)</i>	<i>IVS1-766g/a</i> <i>IVS1-376a/g</i> 186G/T	48C	<i>IVS1-204c/t</i> <i>IVS1-20a/g</i> 150C/T 178C/A 201A/G 203A/G 307C/T	<i>IVS2-91a/g</i> <i>IVS2-32c/t</i>
5	<i>DIVa ceTI(D2)</i> <i>(C)ceS Type 1</i>	<i>IVS1-485g/a</i> <i>IVS1-376a/g</i> IVS1-29c 186T	48C	<i>IVS1-204c/t</i> <i>IVS1-20a/g</i> 150C/T 178C/A 201A/G 203A/G 307C/T	<i>IVS2-91a/g</i> <i>IVS2-32c/t</i>

* Heterozygous SNPs are in italics.

RHCE allele variants

A total of 11 *RHCE*ce* variant alleles and one *RHCE*Ce* variant allele were identified in this population study. In addition, two samples carried a *RHCE*ce* allele with 48G>C transversion. The most frequent *RHCE*ce* variant allele was *RHCE*ce(48C)* with a frequency of 0.227 in Dogon and 0.152 in Fulani. Four alleles encoding partial e antigen, that is, *RHCE*ce(48C,254G)*, *RHCE*ce(254G)*, *RHCE*ceMO*, and *RHCE*ceTI*, were identified. The most frequent allele encoding partial e antigen was *RHCE*ce(254G)*, occurred in 20 Dogon and 11 Fulani. One Dogon sample exhibited *RHCE*ceTI* characterized by a 48G>C and 1025C>T transitions and five Dogon samples exhibited a new allele (see below). Altogether, three samples were predicted to be partial for e antigen.

Twenty-eight of the 47 Fulani in this cohort were typed as C+ including 16 bearing at least one *RHCE*Ce-D(4)-ce* allele. Two samples were predicted to exhibit a rare RH:32,-46 phenotype featuring a *RHCE*Ce-D(4)-ce*

allele in homozygous state. Altogether, five Dogon and 15 Fulani exhibited a predicted partial C phenotype based on the presence of either *(C)ceS Type 1* haplotype in Dogon or *RHCE*Ce-D(4)-ce* in Fulani.

Comparison of phenotype and genotype revealed that three out of five samples with the new allele as well as two samples with *RHCE*Ce-D(4)-ce* allele were C-. No other discrepancies were observed.

New *RHCE*ceTI(D2)* allele

Sequencing of genomic DNA revealed a new *RHCE* allele in five Dogon. This allele displayed 48C, 150T, 178A, 201G, 203G, 307T (Table 3), and 1025T. The 48C and 1025T SNPs are characteristic of the *RHCE*ceTI* allele. The remaining are common to Exon 2 of the *RHD* gene and *RHCE*C* allele. Since the new allele did not exhibit the 109-bp insertion characteristic feature of the *RHCE*C* allele (data not shown), we assume that the new allele was a *RHCE*ce*

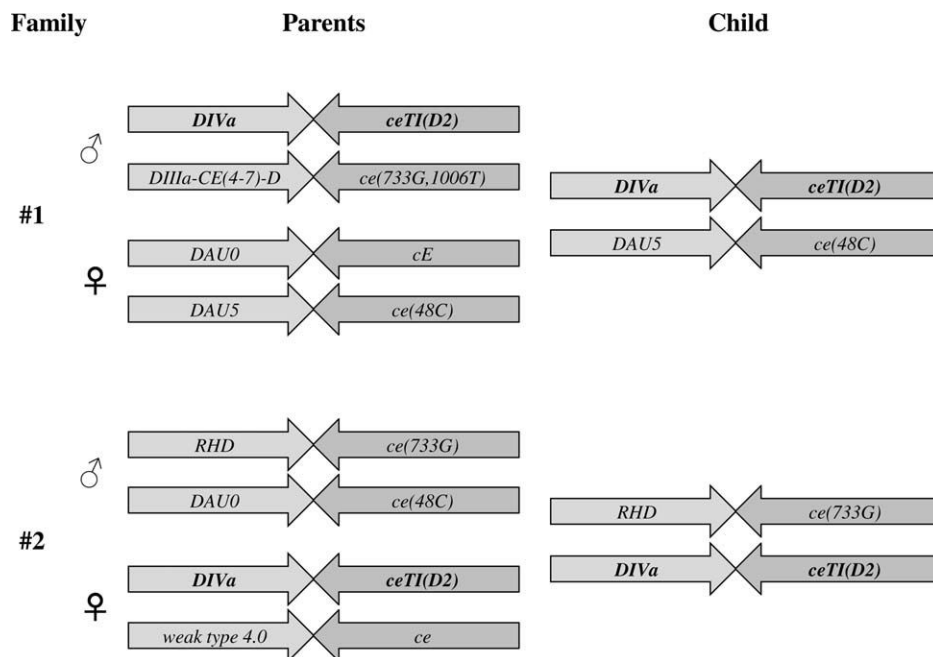


Fig. 2. Inheritance study of *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)* haplotype in two families.

variant with Exon 2 being replaced by its *RHD* counterpart. The presence of heterozygous SNPs in exons and introns ascertains the amplification of two alleles for *RHCE* Exons 1 to 3. Two samples (Table 3, Samples 1 and 5) showed 186T in Exon 2 of *RHD* because of *RHD*DIVa* in trans to *RHD*DIIIa-CE(3-7)-D*. Therefore the Exon 2 with 150T, 178A, 201G, 203G, and 307T amplified during *RHCE* analysis is not carried by *RHD* locus. Altogether, DNA sequencing showed that the new *RHCE* allele was a *RHCE*ce-D(2)-ce* hybrid allele with 48C and 1025T, which is thereafter referred to as *RHCE*ceTI(D2)*. Study of intron sequence also revealed that, like *RHCE*ceTI*, this allele also bore three polymorphisms in Introns 2 and 6, that is, IVS2-91a>g, IVS2-32C>T, and IVS6 + 52C>T.

To support the molecular basis of the new allele, an inheritance test was carried out to study transmission in two families. As shown in Fig. 2, the *RHCE*ceTI(D2)* allele is in cis to the *RHD*DIVa* allele and the haplotype *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)* was integrally transmitted.

Based on the nucleotide sequence observed in coding regions, samples bearing *RHCE*ceTI(D2)* might express all or part of C antigen. Thus, hemagglutination to detect C expression was performed in one sample bearing *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)* and in samples with *RHD*DIVa/RHCE*ceTI*. In all cases, DAT in gel matrix, tube, and microplate using anti-C MoAbs MS24, MS273, and P3X2551368+MS24, respectively consistently showed a C- phenotype (Table 4). As previously reported,¹¹ MoAb BS58 showed no reactivity on C-c+E+e- sample, a weak reactivity on C-c+E-e+ sample, and a strong one on C+c-E-e+ sample. IAT with anti-Ce MoAb BS58 showed

TABLE 4. DAT characterization of *DIVa/ceTI(D2)* and comparison with *DIVa/ceTI*

Technique	Anti-C clone	Reactivity	
		<i>RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)</i>	<i>RHD*DIVa/RHCE*ceTI</i>
Tube	MS273	-	-
Plate	P3X2551368 +MS24	-	-
Gel matrix	MS24	-	-
	BS58*	+	+

* Reactivities using anti-Ce MoAb BS58 are shown in Fig. S1 (available as supporting information in the online version of this paper).

reactivity similar to that observed in the C+c-E-e+ control sample and sample with *RHD*DIVa/RHCE*ceTI* haplotype (Fig. S1, available as supporting information in the online version of this paper). Unfortunately, because of paucity of blood sample neither RNA analysis nor further serologic investigations using a larger anti-C panel were achieved.

DISCUSSION

Antibodies against Rh antigens have been implicated in transfusion reactions and hemolytic disease of the fetus and newborn. The high incidence of variant *RHD* or *RHCE* alleles in African black persons has been deduced from clinical experience and screening for certain variant *RH* alleles.¹²⁻¹⁷ However, data on large cohorts of selected ethnic groups are lacking. Only one study investigating *RHD*

variants has been performed in Mali in blood donors.¹³ The purpose of this report is to describe a comprehensive study of *RHD* and *RHCE* variants in Dogon and Fulani in Mali. This approach was used because Mali is a multiethnic country and some *RH* variants repeatedly occur in a single ethnic group.⁸

Phenotyping demonstrated a profile comparable to those reported previously in African populations.² However, a number of frequency differences were observed between the two ethnic groups. Ethnic differences have already been noted in Nigeria.^{18,19}

Results of *RH* genotyping were roughly similar to those of previous data.^{12,16,17,20} The most common *RHD* alleles were belonging to the usual three African D clusters, that is, DAU, DIVa, and weak D Type 4.²¹ As expected, alleles from the DAU cluster were the most frequent^{12,22} and three out of five partial predicted D phenotypes were related to the *RHD*DAU3* allele. This supports the suggestion of Wagner and colleagues³ that DAU cluster is a major source of D variability and anti-D immunization in patients of African ancestry. The frequency of the *RHD*DAU0.1* allele was 0.029 to 0.039 in Dogon compared to 0.017 in blood donors from Mali.¹³ The frequency of *RHCE* alleles was broadly similar to previous reports with a high frequency of *RHCE*ce(48C)*.^{12,20,23} However, frequencies of *RHCE*ceMO* and *RHCE*ceTI* were lower than that reported by Granier and coworkers¹² who investigated 220 African samples from six ethnic groups. The most likely explanation for this discrepancy is cohort size. Our data showed that the frequency of *RHCE*ce(254G)* was around 10% in both ethnic groups and that it accounted for all the partial predicted e phenotypes (3/3); lower frequencies (around 5%) were noted in SCD patients.^{16,17}

Neither *RHD*DIIIa* allele nor *RHD*DAR/RHCE*ceAR*ceEK* haplotype was detected in this study. This finding was surprising since the frequency of these alleles and haplotypes ranged from 3% to 5% in other studies^{12,15} and indicated that African populations may be more heterogeneous than previously suggested.¹² The frequency of the *RHD*DIVa* allele (today considered to be the same allele as *RHD*DIVa.224*) in Dogon was 3%. This is interesting since this allele was absent in samples from Congo-Brazzaville and Kenya whereas it showed a frequency of approximately 10% in two West African ethnic groups (Mandenkas and Yorubas).¹² This observation supports the notion that the *RHD*DIVa* allele is specific to or at least more frequent in West Africa. The geographic origin of investigated samples could at least partially explain the wide range of *RHD*DIVa* frequencies previously reported which were 0.018 and 0.019 in French blood donors from African origin and SCD from France, respectively compared to 0.009 in both sub-Saharan Africa and SCD from the United States.^{12,16,17,20}

Several differences were observed between Dogon and Fulani. The frequency of *RHD*DAU0* was 0.217 to

0.247 in Dogon compared to 0.076 in Fulani. The *RHCE*Ce-D(4)-ce* allele was found exclusively in Fulani with a high frequency (0.195). Moreover, two of 46 samples were homozygous for this allele leading to the predicted RH:–46 phenotype.¹⁰ Surprisingly, two samples with *RHCE*Ce-D(4)-ce* in trans to *RHCE*ce* and *RHCE*ce(254G)*, respectively, were typed C– with MS24 anti-C which reacts usually 3+ in Ortho column agglutination technique. Unfortunately, no blood sample compatible with immunohematologic tests was available to confirm the typing after molecular investigations. The finding that 53.6% of C+ Fulani had a partial predicted C phenotype supports systematic search for *RHCE*Ce-D(4)-ce* allele in this population especially in hosting countries. This is also supported by the finding that 7.3% of C+ SCD patients from unknown ethnic group harbored *RHCE*Ce-D(4)-ce*.⁵ Another approach would be to consider all C+ patients from African ancestry as potentially being partial C and straightaway transfuse them with C– RBC units. However, such an approach would require the use of already scarce resources since most donors are from Caucasian ethnicity and only 32% are C–.

This study also identified the new *RHCE*ceTI(D2)* allele characterized by seven SNPs in Dogon. An inheritance study showed that transmission of this new allele was part of a haplotype with *RHD*DIVa*. Two of the polymorphisms, that is, 48G>C and 1025C>T, were in common with the *RHCE*ceTI* allele that encodes a partial e phenotype.⁴ Since these alleles shared three intronic SNPs, that is, IVS2-91a>g, IVS2-32C>T, and IVS6 + 52C>T, it seems reasonable to think that they have the same origin. It is likely that the new allele arose from a rearrangement between *RHCE*ceTI* and *RHD*. Based on the nucleotide sequence observed in coding regions as well as on previously published data showing that the expression of C antigen is related to the exofacial serine 103 resulting from the 307C>T transition,^{25,26} it can be thought that samples bearing *RHCE*ceTI(D2)* express all or part of C-antigen. Surprisingly, five of the seven samples bearing *RHCE*ceTI(D2)*, that is, five from the Dogon population in this study plus the two from children included in the inheritance study, typed C– with MoAb MS24 while the two remaining carried (*C*)*ceS Type 1* in trans to *RHCE*ceTI(D2)*. In the light of findings showing that *RHD*DIVa* expresses weak, variable, and unstable positive RBC reactions with some anti-C,⁴ additional immunohematologic tests were carried out on samples with either *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)* or *RHD*DIVa/RHCE*ceTI* haplotypes. Since anti-C yielded similar results on both samples, it was not possible to demonstrate specific C reactivity encoded by *RHCE*ceTI(D2)* allele. Use of a larger anti-C panel will be needed to clearly determine the C profile associated with this allele. Since *RHCE*ceTI* was shown to encode partial phenotypes for both antigens,⁴ study of partial c and e antigen expression encoded

by *RHCE*ceTI(D2)* would also have been useful but c and e investigation was rendered impossible because *RHCE*ceTI(D2)* was in trans to the *RHCE*ce* allele in all samples.

Taken together, our results revealed an uneven distribution of some *RH* variant alleles in Mali Africa, suggesting the need for further study in well-documented cohorts. A wider study in donors of African descent will also be required to determine the frequency of the new haplotype *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)* associating an allele encoding partial D, variant ce antigens, and aberrant reactivity with anti-C and to evaluate its potential impact on transfusion strategy.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the contributions of Thomas Granier for his technical assistance and Elisabeth Durieux-Roussel for her contribution in serologic testing. We also thank Andrew Corsini for proofreading the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have disclosed no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus Apher Sci* 2011;44:81-91.
2. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. The blood group antigens FactsBook. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2012.
3. Wagner FF, Ladewig B, Angert KS, et al. The DAU allele cluster of the RHD gene. *Blood* 2002;100:306-11.
4. Westhoff CM, Vege S, Halter Hipsky C, et al. *RHCE*ceTI* encodes partial c and partial e and is often in cis to *RHD*DIVa*. *Transfusion* 2013;53:741-6.
5. Tournamille C, Meunier-Costes N, Costes B, et al. Partial C antigen in sickle cell disease patients: clinical relevance and prevention of alloimmunization. *Transfusion* 2010;50:13-19.
6. Roussel M, Poupel S, Nataf J, et al. *RHD*DOL1* and *RHD*DOL2* encode a partial D antigen and are in cis with the rare *RHCE*ceBI* allele in people of African descent. *Transfusion* 2013;53:363-72.
7. Noizat-Pirenne F, Lee K, Le Pennec PY, et al. Rare *RHCE* phenotypes in black individuals of Afro-Caribbean origin: identification and transfusion safety. *Blood* 2002;100:4223-31.
8. Le Pennec PY, Rouger P, Klein MT, et al. A serologic study of red cells and sera from 18 Rh:32,-46 (RN/RN) persons. *Transfusion* 1989;29:798-802.
9. Pham BN, Peyrard T, Juszcak G, et al. Heterogeneous molecular background of the weak C, VS+, hr(B)-, Hr(B)- phenotype in black persons. *Transfusion* 2009;49:495-504.
10. Nance ST, Lomas-Francis C. Where are we in efforts to unravel the complexity of Rh to guide transfusion decisions? *Transfusion* 2013;53(11 Suppl 2):2840-3.
11. Sonneborn HH, Ernst M, Tills D, et al. Comparison of the reactions of the Rh-related murine monoclonal antibodies BS58 and R6A. *Vox Sang* 1990;58:219-23.
12. Granier T, Beley S, Chiaroni J, et al. A comprehensive survey of both RHD and RHCE allele frequencies in sub-Saharan Africa. *Transfusion* 2013;53(11 Suppl 2):3009-17.
13. Wagner FF, Moulds JM, Tounkara A, et al. RHD allele distribution in Africans of Mali. *BMC Genet* 2003;4:14.
14. Grootkerk-Tax MG, van Wintershoven JD, Ligthart PC, et al. RHD(T201R, F223V) cluster analysis in five different ethnic groups and serologic characterization of a new Ethiopian variant DARE, the DIII type 6, and the RHD(F223V). *Transfusion* 2006;46:606-15.
15. Hemker MB, Ligthart PC, Berger L, et al. DAR, a new RhD variant involving exons 4, 5, and 7, often in linkage with ceAR, a new Rhce variant frequently found in African blacks. *Blood* 1999;94:4337-42.
16. Chou ST, Jackson T, Vege S, et al. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood* 2013;122:1062-71.
17. Silvy M, Tournamille C, Babinet 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;99:e115-7.
18. Jeremiah ZA, Buseri FI. Rh antigen and phenotype frequencies and probable genotypes for the four main ethnic groups in Port Harcourt, Nigeria. *Immuno-hematology* 2003;19:86-88.
19. Jeremiah ZA, Odumody C. Rh antigens and phenotype frequencies of the Ibibio, Efik, and Ibo ethnic nationalities in Calabar, Nigeria. *Immuno-hematology* 2005;21:21-4.
20. Kappler-Gratias S, Auxerre C, Dubeaux I, et al. Systematic TH genotyping and variant identification in French donors of African origin. *Blood Transfus* 2014;12 Suppl 1:s264-72.
21. Flegel WA, von Zabern I, Doescher A, et al. D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian D clusters. *Transfusion* 2009;49:1059-69.
22. Touinssi M, Chapel-Fernandes S, Granier T, et al. Molecular analysis of inactive and active RHD alleles in native Congolese cohorts. *Transfusion* 2009;49:1353-60.
23. Silvy M, Di Cristofaro J, Beley S, 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;154:260-70.
24. Reid ME, Ripaux M, Auxerre C, et al. DIVa and DIVa-2 are encoded by the same RHD allele [abstract]. *Transfusion* 2012;52:34A.
25. Noizat-Pirenne F, Mouro I, Pennec L, et al. Evidence that serine at position 103 is not sufficient for complete C antigen expression [abstract]. *Transfusion* 1999;39:103S.
26. Vege S, Johnson NC, Velliquette RW, et al. A novel allele with nucleotide 307C > T (Pro103Ser) on *RHCE*ceAG* (254C > G) encodes robust C antigen [abstract]. *Transfusion* 2013;53:30A. ■

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website:

Fig. S1. Immunohematological characterization of *DIVa/ceTI(D2)* and comparison with *DIVa/ceTI* by IAT using

the anti-Ce MoAb BS58. Reactivities on control samples are shown along with results of direct antiglobulin test (DAT). *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)* haplotype was in *trans* to *RHD*DAU5/RHCE*ce* and *RHD*DIVa/RHCE*ceTI* was in *trans* to *RHD*D/RHCE*ce(48C,733G)*.

La forte incidence des allèles variants *RHD* ou *RHCE* chez les personnes originaires d'Afrique subsaharienne est principalement déduite de l'analyse clinique des patients en particulier drépanocytaires, et du dépistage de certains variants *RH* au sein de différentes cohortes (Granier et al., 2013; Silvy et al., 2014). Cependant, des données de répartition et de fréquence issues de grandes cohortes d'individus sélectionnés sur la base de l'ethnicité font défaut. Seule une étude partielle des variants *RHD* a été réalisée à partir de 58 donneurs du Mali (Wagner et al., 2003). Au regard du caractère multiethnique de la population du Mali et la répartition de certains variants (Le Pennec et al., 1989), notre objectif est de réaliser un recensement exhaustif des variants *RHD* et *RHCE* par séquençage chez les populations Dogon et Peulh de la 5^{ième} région (Mopti) (Figure 1 de l'article).

Ainsi, une cohorte de 147 individus volontaires comprenant 101 Dogons et 46 Peulhs a été constituée. L'analyse phénotypique RhD, C, c, E et e utilisant la technique d'agglutination en gel filtration (voir matériels et méthode de l'article) a montré un profil phénotypique Rh comparable à ceux déjà rapportés pour les populations d'Afrique avec une prépondérance des phénotypes D+C-c+E-e+ (52,4%) et D+C+c+E-e+ (23,8%) (Tableau 1 de l'article). Néanmoins, des différences font jour entre les Dogons et les Peulhs. Le phénotype D+C+c-E-e+ est absent des Dogons et fréquent chez les Peulhs (10,9%). À l'opposé, le phénotype D+C-c+E+e+ est peu commun chez les Peulhs (2,2%) et plus fréquent chez les Dogons (16,8%). De telles différences ont également été observées au Nigeria (Jeremiah and Buseri, 2003; Jeremiah and Odumody, 2005). Parallèlement, seuls 8 individus sont de phénotype D-négatifs.

Génotype *RHD*

L'analyse systématique des séquences exoniques *RHD* montre que parmi les 8 individus de phénotypes RhD-négatif, quatre Dogons et un Peulh sont homozygotes délétés pour le gène *RHD*, un Peulh est homo ou hémizygoté pour le gène silencieux *RHD*DPsi*, un Dogon est génotypé (*C*)*ces type 1* en *trans* de la délétion *RHD* et le dernier est hétérozygoté pour *RHD*DPsi* et (*C*)*ces type 1*. Parmi les individus de phénotype RhD-positifs, 35 Dogons soit 34,6% et 34 Peulhs soit 73,9% ne présentent aucun variant *RHD*.

Comme attendu, les variants *RHD* observés appartiennent au trois cluster dits africains c'est-à-dire les clusters DAU, DIVa et D faible type 4 (Tableau 2 de l'article). L'allèle *RHD*DAU0* est le variant le plus fréquent avec une fréquence allélique de 0,217-0,247 chez

les Dogons et 0,076 chez les Peulhs (Tableau 23). Parmi les allèles *RHD* codant un antigène RhD partiel, le plus fréquent chez les Dogons est l'allèle *RHD*DIVa* (0,029) et le plus fréquent chez les Peulhs est l'allèle *RHD*DAU3* (0,043-0,054 *versus* 0,019-0,024 chez les Dogons). Ainsi, 3 Dogons (2,9%) et un Peulh (2,2%) expriment un phénotype RhD partiel résultant d'un de ces 2 allèles à l'état homozygote ou hémizygotique ou en *trans* d'un allèle silencieux. Ces quatre phénotypes partiels prédits ont tous été typés RhD positif par la technique d'agglutination en gel filtration.

Ces résultats soutiennent que les clusters DAU et DIVa sont sources majeures de variabilité et d'allo-immunisation anti-RhD pour les individus originaires de l'Afrique subsaharienne comme cela a été déjà souligné par Wagner et collaborateurs au sujet du cluster DAU (Wagner et al., 2002).

Parallèlement, nous constatons que ni l'allèle *RHD*DIIIa*, ni les haplotypes *RHD*DAR/RHCE*ceAR/*ceEK* n'ont été observés dans notre cohorte alors que leurs fréquences respectives varient entre 3% et 5% dans d'autres études (Granier et al., 2013; Hemker et al., 1999). L'allèle *RHD*DIVa* montre une fréquence de 2,9% chez les Dogons. Une fréquence d'environ 10% a été rapportée dans deux groupes ethniques d'Afrique de l'Ouest (les Mandenkas et les Yorubas), alors que cet allèle est absent dans les échantillons provenant du Congo-Brazzaville et du Kenya (Granier et al., 2013). Ces observations supportent la notion que l'allèle *RHD*DIVa* est restreint, ou au moins plus fréquent en Afrique de l'Ouest. Ainsi, l'origine géographique des prélèvements génotypés pourrait en partie expliquer les variations de fréquences de l'allèle *RHD*DIVa* qui sont respectivement de 0,018 et 0,019 chez les donneurs de sang français d'origine africaine et les patients drépanocytaires suivis en France, contre 0,009 pour les populations d'Afrique subsaharienne et les patients drépanocytaires aux Etats-Unis (Chou et al., 2013a; Granier et al., 2013; Kappler-Gratias et al., 2014; Silvy et al., 2014). Ce constat supporte l'idée que les populations africaines peuvent être plus hétérogènes que ce qui a été précédemment suggéré (Granier et al., 2013).

Génotype RHCE

Concernant les variants *RHCE* (Tableau 2 de l'article), onze variants *RHCE*ce* (dont 6 n'exprimant pas des antigènes de haute fréquence), un seul variant *RHCE*Ce* et un variant *RHCE*cE* avec la transversion 48G>C sont identifiés. Les fréquences de ces variants sont

globalement similaires à celles rapportées précédemment dans différentes études (Granier et al., 2013; Kappler-Gratias et al., 2014; Silvy et al., 2011b) avec néanmoins une fréquence plus élevée pour l'allèle *RHCE*ce(48C)* qui présente une fréquence allélique de 0,227 chez les Dogons et 0,152 chez les Peulhs. Les antigènes de basse fréquence RH:10(V) et/ou RH:20(VS) résultant des allèles *RHCE*ce(733G)*, *RHCE*ce(48C, 733G)*, *RHCE*ce(733G, 1006T)* et *RHCE*ce(48C, 733G, 1006T)* sont exprimés par 41,58% des Dogons et 41,4 % des Peulhs. Cinq Dogons sont porteurs du nouvel allèle *RHCE*ceTI(D2)* (voir paragraphe suivant). Quatre allèles *RHCE*ce(48C, 254G)*, *RHCE*ce(254G)*, *RHCE*ceMO* et *RHCE*ceTI* codant pour un antigène Rhe partiel ont été observés. Le plus fréquent est l'allèle *RHCE*ce(254G)* avec une fréquence allélique de 0,099 et 0,119 respectivement chez les Dogons et les Peulhs. Ainsi, il est à la base du phénotype Rhe partiel de 3 individus Dogons (3%). À l'opposé, on relève des fréquences plus faibles pour les allèles *RHCE*ceMO* et *RHCE*ceTI* comparé à l'étude des 220 africains appartenant à 6 groupes ethniques (Granier et al., 2013) qui peuvent s'expliquer par la différence de tailles des cohortes analysées.

Parallèlement, vingt-huit des quarante six Peulhs sont phénotypés RhC+ incluant les 16 individus porteurs d'au moins un allèle hybride *RHCE*Ce-(D4)-Ce*. Parmi eux, deux sont présumés *RHCE*Ce-(D4)-Ce* homozygote à la base du phénotype rare RH:32, -46. Au total, 4 Dogons et 14 Peulhs expriment un phénotype déduit RhC partiel résultant soit de la présence d'un haplotype *(C)ces type 1* pour les Dogons soit la présence d'au moins un allèle hybride *RHCE*Ce-(D4)-Ce* pour les Peulhs. Seuls deux prélèvements génotypés *RHCE*Ce-(D4)-Ce* ont été phénotypés RhC-négatifs.

Le nouvel haplotype RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)

Sept polymorphismes 48C, 150T, 178A, 201G, 203G, 307T et 1025T sont identifiés à partir de l'ADNg de cinq Dogons et de deux enfants de l'étude génétique de transmission familiale lors de l'analyse du gène *RHCE*. Le premier (48C) et le dernier (1025T) de ces polymorphismes sont caractéristiques d'un allèle *RHCE*ceTI* qui code un antigène Rhe partiel, alors que les cinq autres polymorphismes sont communs à l'exon 2 du gène *RHD* et de l'allèle *RHCE*C*. Parallèlement, l'insertion de 109 paires de bases caractéristique d'un allèle *RHCE*C* est absente ce qui nous amène à formuler un nouvel allèle *RHCE*ce* sous la forme d'un allèle hybride *RHCE*ce-D(2)-ce* associé aux polymorphismes 48C et 1025T, lequel est référé sous le nom *RHCE*ceTI(D2)*. Il est à noter que ce nouvel allèle et l'allèle

*RHCE*ceTI* ont en commun trois polymorphismes introniques (IVS2-91a>g, IVS2-32c>t, et IVS6152c>t) qui suggèrent une même origine. Ainsi, Il est fort probable que le nouvel allèle *RHCE*ceTI(D2)* résulte d'un réarrangement entre un allèle *RHCE*ceTI* et le locus *RHD*. Pour conforter sa base moléculaire, une étude génétique de transmission familiale a été réalisée dans deux familles. Comme le montre le tableau 3 et la figure 2 de l'article, le nouvel allèle *RHCE*ceTI(D2)* est toujours en *cis* d'un allèle *RHD*DIVa*, et l'haplotype *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)* est intégralement transmis.

Au niveau phénotypique, à partir de la base moléculaire du nouvel allèle *RHCE*ceTI(D2)*, prenant en considération que l'expression de l'antigène RhC est lié à la sérine 103 en position exofaciale résultant du polymorphisme 307C, ce nouvel allèle pourrait exprimer tout ou partie de l'antigène RhC. De plus, l'allèle *RHD*DIVa* en *cis* est connu pour montrer des réactions d'hémagglutination positives faibles, variables ou instables avec certains anti-RhC. À partir de ces éléments, une analyse phénotypique pour détecter une expression RhC a été réalisée par hémagglutination à partir de prélèvements sanguins génotypés *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)* et *RHD*DIVa/RHCE*ceTI*. Les tests directs d'agglutination en gel filtration, tube et plaque avec les différents anticorps monoclonaux anti-RhC MS24, MS273 et P2X2551368+MS24 montrent tous un phénotype RHC-négatif (Figure 15 A). Comme le clone BS58 de spécificité référencée RhCe révèle une réactivité positive en "smear" similaire pour les échantillons typés *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)* et *RHD*DIVa/RHCE*ceTI* ainsi que pour le contrôle RhC+c-E-e+, il n'a pas été possible de démontrer si la réactivité RhC est liée au nouvel allèle *RHCE*ceTI(D2)* (figure 15).

La qualité des prélèvements sanguins n'a pas permis d'aller plus avant pour caractériser le profil RhC de l'allèle *RHCE*ceTI(D2)* avec un large panel d'anticorps anti-RhC. Considérant le caractère partiel des antigènes Rhc et Rhe exprimés par l'allèle *RHCE*ceTI*, une étude des ces deux spécificités codées par le nouvel allèle *RHCE*ceTI(D2)* aurait également été informative. Malheureusement, tout nos échantillons génotypés *RHCE*ceTI(D2)* présentent en *trans* un allèle de type *RhCE*ce*.

Tableau 23 : Distribution des allèles variants *RHD* et *RHCE* chez les Dogons et les Peulhs.

Allele variant et haplotype	Antigène [#] Rh Prédit partiel	Nombre d'allèles		Fréquence allèle		Fréquence publiée			
		Dogon (n=202)	Peulh (n=92)	Dogon (n=202)	Peulh (n=92)	Afrique sub- Saharienne	Donneurs français Fy(a-,b-)	Patient drépanocytaire (France)	Patient drépanocytaire (Etats-Unis)
<i>RHD</i>		84-102	51-78	0,416-0,0500	0,554-0,848	nt	nd		nd
<i>RHD*DIVa</i>	D	6	0	0,029	.	0,009	0,019	0,018	0,009
<i>RHD*DAU3</i>	D	4-5	4-5	0,019-0,024	0,043-0,054	0,030-0,034	0,041	0,021	0,018
<i>RHD*DAU5</i>	D	2	0	0,009	.	0,016	0,019	0,015	0,020
<i>RHD*DFR-2</i>	D	1	0	0,004	.	.	nd	.	.
<i>RHD*weak type 4.0</i>	-	5	0	0,024	.	0,018-0,020	0,038	0,022	0,049
<i>RHD*DAU0</i>	-	44-50	7	0,217-0,247	0,076	0,177-0,261	0,022	0,187	0,164
<i>RHD*DAU0.1</i>	-	6-8	0	0,029-0,039	.	nt	nt	nt	nt
<i>RHD*DIIIa-CE(4-7)-D[§]</i>	C	5	0	0,024	.	0,027	0,032	0,026	0,046
<i>RHD*Dpsi</i>	-	7	1-2	0,034	0,010-0,020	0,050-0,057	0,107	0,028	0,027
<i>Délétion RHD[‡]</i>	-	8	2	0,199	0,147	nt	nd	nt	nt
<i>RHCE*cE(48C)</i>	-	2	0	0,009
<i>RHCE*ce(48C)</i>	-	47	14	0,227	0,152	0,252	nd	0,186	0,192
<i>RHCE*ce(48C,105T)</i>	-	2	0	0,009	.	nt	nt	.	.
<i>RHCE*ce(48C,254G)</i>	e	1	0	0,004	.	nt	nt	.	.
<i>RHCE*ce(254G)[†]</i>	e	20	11	0,099	0,119	nt	nt	0,047	0,058
<i>RHCE*ceTI(D2)</i>	-	5	0	0,024	.	.	nt	.	.
<i>RHCE*ceTI[†]</i>	c, e	1	0	0,004	.	0,020	0,032	0,015	0,033
<i>RHCE*ceMO[†]</i>	c, e	1	0	0,004	.	0,030	0,028	0,012	0,015
<i>RHCE*ce(733G)[†]</i>	c, e	16	14	0,074	0,152	0,182	nd	0,224	0,197
<i>RHCE*ce(48C,733G)[†]</i>	c, e	21	5	0,108	0,054
<i>RHCE*ce(733G,1006T)^{§†}</i>	c, e	1	0	0,004	.	.	nd	0,006	0,006
<i>RHCE*ce(48C,733G,1006T)^{§†}</i>	c, e	4	0	0,019	.	0,030	0,016	.	.
<i>RHCE*Ce-D(4)-ce[†]</i>	C	0	18	.	0,195	.	0,030	0,006	0,002

nt: non testé; nd: non disponible; § partie de l'haplotype (C)CES type 1; # Phénotypes prédits partiel ont été déduits des données publiées montrant l'allo-immunisation anti-e chez le patient e + ou anti-c chez patient c +; † allèles codant pour des protéines qui manquent pour exprimer l'antigène (s) à haute fréquence; ‡ Fréquence de la *délétion RHD* calculée sur la base des échantillons homozygotes.

A

Technique	Clone	Réactivité	
		<i>RHD*DIVa/ RHCE*ceTI(D2)</i>	<i>RHD*DIVa/ RHCE*ceTI</i>
Tube	MS273	-	-
Plaque	P3X2551368 +MS24	-	-
Gel filtration	MS24	-	-
	BS58	+	+

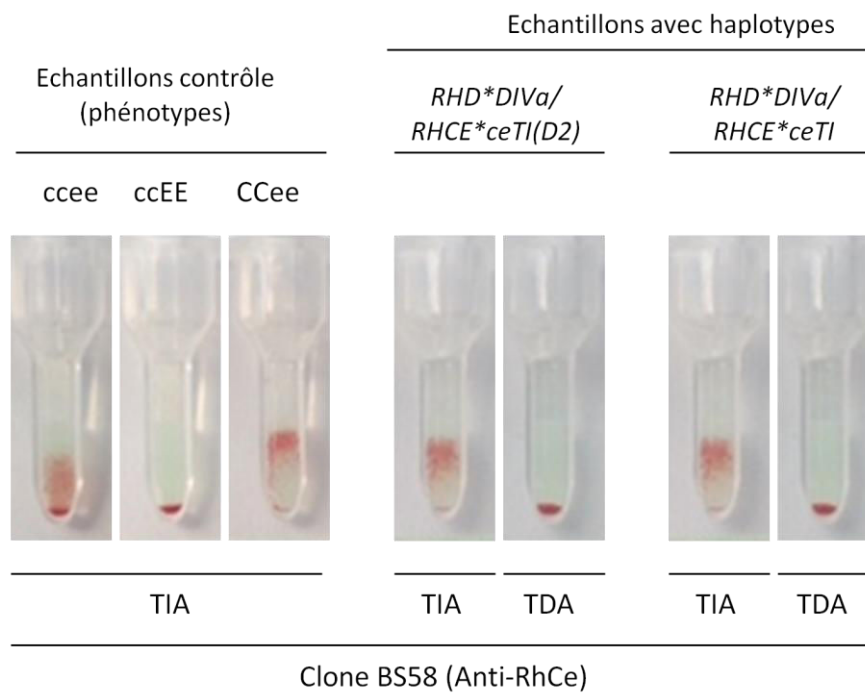
B

Figure 15 : Caractérisation immunohématologique de l'haplotype *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)*.

Les réactivités des échantillons *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)* et *RHD*DIVa/RHCE*ceTI* sont similaires avec les techniques utilisées (A) ; les réactivités utilisant l'anti-RhCe (clone BS58) sont présentées dans la partie (B).

Conclusion

En résumé, cette étude a mis en évidence plusieurs différences entre les deux groupes ethniques investigués. Premièrement, la différence de fréquence de l'allèle *RHD*DAU0*, respectivement, 0,217-0,247 pour les Dogons *versus* 0,076 pour les Peulhs. Deuxièmement, le caractère antigénique partiel toute spécificité confondue est plus important chez les Peulhs que chez les Dogons (32,6% *versus* 13,8%). Troisièmement, l'allèle hybride *RHCE*Ce-(D4)-Ce* est absent chez les Dogons alors qu'il a une fréquence élevée chez les Peulhs (0,195). Parmi ces derniers, deux sont homozygotes pour l'allèle hybride *RHCE*Ce-(D4)-Ce* à la base d'un phénotype rare RH:32, -46. Le constat qu'un Peulh sur deux (14/27) phénotypés RhC-positifs a une expression RhC partielle, soutient la recherche systématique de cet allèle hybride parmi les individus appartenant à ce groupe ethnique et en particulier dans les pays d'accueil. Ceci est également soutenu par la constatation que 7,3% des patients drépanocytaires phénotypés RhC-positifs et sans information sur l'origine ethnique, ont un allèle *RHCE*Ce-(D4)-Ce* (Tournamille et al., 2010b). Une alternative à la recherche de cet allèle hybride serait de considérer tous les patients RhC-positifs d'ascendance africaine RhC-partiel et de les transfuser avec des unités de sang RhC-négatives sachant néanmoins que seulement 32% (41% R0+r) des donneurs européens *versus* 70% (R0+r) des africains sont de phénotype RhC-négatif.

L'ensemble de nos résultats révèlent une répartition inégale de certains allèles *RHD* et *RHCE* à travers l'étude de deux groupes ethniques du Mali ce qui suggère la nécessité d'autres études menées à partir de cohortes bien documentées au niveau de l'appartenance ethnique des participants. Cette démarche permettrait également de préciser la fréquence du nouvel haplotype *RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2)* associant un allèle *RHD*DIVa* codant pour un antigène RhD partiel, des antigènes Rhce potentiellement partiels, et une réactivité partielle avec anti-RhC, et d'évaluer son impact dans le contexte transfusionnel.

III. Etudes des groupes sanguins en Afrique subsaharienne d'Est en Ouest

Les antigènes des systèmes des groupes sanguins ABO, RH, KEL, JK, MNS et FY sont généralement considérés comme cliniquement relevant. Après une transfusion ou une grossesse, ils peuvent être à l'origine de réactions hémolytiques transfusionnelles modérées ou sévères (HTR) et de la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né (MHFNN), ce qui a généré de nombreuses études pour définir leurs fréquences dans différentes populations (Badjie et al., 2011; Hashmi et al., 2007).

L'exemple le plus typique de la variabilité ethnique d'un antigène érythrocytaire est donné par le système de groupe sanguin Duffy (FY) pour lequel l'allèle dominant à l'échelle mondiale est l'allèle *FY*01* codant l'antigène Fy^a , tandis que l'allèle dominant en Afrique est l'allèle silencieux *FY*02N.01* (ou *FY*Fy*) (Howes et al., 2011).

Après une allo-immunisation, une compatibilité plus poussée est nécessaire en cas de nouvelle transfusion et/ou grossesse pour déterminer la spécificité des allo-anticorps produits. A cet effet, le sérum du patient doit être testé vis-à-vis d'un panel d'hématies phénotypées associé à un contrôle autologue *via* ses propres hématies.

Si un allo-anticorps contre un antigène de haute prévalence est soupçonné, la connaissance de l'origine ethnique du patient peut aider à sélectionner les globules rouges négatifs les plus fréquents par exemple des globules rouges Kp(b-) ou Yt(a-) pour les Européens et des globules rouges Js(b-) pour les personnes originaires d'Afrique. Cependant, l'obtention des fréquences des antigènes a été ralentie par différentes difficultés techniques en particulier par l'absence de sérums commerciaux comme par exemple des anticorps anti-Lu^b, -Di^b, -Co^a et -Yt^a. Le même constat existe pour le typage des antigènes Dombrock. Bien que des anticorps sériques existent, ils sont souvent de faible réactivité en mélange avec d'autres anticorps et disponibles en faible quantité (Lomas-Francis & Reid, 2010). Pour ces différentes raisons, le génotypage érythrocytaire à partir de l'ADNg a permis de contourner ces obstacles et d'obtenir les données de fréquences alléliques comme cela a été réalisé avec l'identification des allèles *RHCE* et *KEL* par génotypage de 1021 Afro-Caraïbéens et 184 Comoriens (Silvy et al, 2011).

Ainsi, avec la même démarche et afin de définir l'absence d'antigènes de haute fréquence et/ou l'expression d'antigènes de basse fréquence, nous avons déterminé les fréquences des allèles codant pour ces deux types d'antigènes dans différents groupes ethniques d'Afrique subsaharienne.

Dans un premier volet, nous présenterons plus spécifiquement les résultats obtenus à partir des deux groupes ethniques du Mali précédemment étudiés pour le système RH, c'est-à-dire les Dogons et les Peulhs. Le second volet sera consacré à une analyse globale des résultats de 11 groupes ethniques repartis en Afrique subsaharienne d'Est en Ouest en distinguant les pygmöides des non-pygmoïde, avec une évaluation de la diversité génétique.

L'ensemble des données a été compilé et rapporté dans une publication publiée dans la revue *British Journal of Haematology*.

Article n°3 : Silvy, M., Beley, S., Granier, T., Ba, A., Chiaroni, J., and Bailly, P.

Heterogeneity of alleles encoding high- and low-prevalence red blood antigens across Africa: useful data to facilitate transfusion in African patients

British Journal of Haematology. 2013, 163:528-536.

Heterogeneity of alleles encoding high- and low-prevalence red blood cell antigens across Africa: useful data to facilitate transfusion in African patients

Monique Silvy,^{1,2} Sophie Beley,^{1,2}
Thomas Granier,^{1,2} Alhassane Ba,^{1,3}
Jacques Chiaroni^{1,2} and Pascal Bailly^{1,2}

¹Établissement Français du Sang Alpes Méditerranée, ²Aix Marseille Université, EFS, ADES UMR 7268, Marseille, France and ³Centre National de Transfusion Sanguine, Bamako, Mali

Received 22 April 2013; accepted for publication 20 July 2013

Correspondence: Pascal Bailly, PhD, EFS Alpes Méditerranée, Laboratoire d'Hématologie Moléculaire, CNRS UMR 7268, Aix Marseille Université, 207 Boulevard Sainte Marguerite, 13009 Marseille, France.

E-mail: pascal.bailly@efs.sante.fr

This study was supported by Établissement Français du Sang, France (all co-authors).

Summary

Ethnic variations in red blood cell (RBC) antigens can be a source of alloimmunization, especially in migrant populations. To improve transfusion safety in continental Africa and countries with African migrants, we performed RBC genotyping to determine allele frequencies coding for high- and low-prevalence antigens. A total of 481 blood samples were collected in ethnic groups from West, Central and East Africa. Molecular typing was performed using a polymerase chain reaction – reverse sequence specific oligonucleotide method. Results demonstrated no *DI*1*, *DI*3*, *YT*2*, *SC*2*, *LW*7*, *KN*2* alleles in any sample and the *CO*2* allele was rare. The frequency of *LU*1* was comparable to that of European-Caucasians (2%) except in Biaka pygmies (8%). The frequency of *CROM*–1* was high in Mbuti pygmies (13%). High frequency of *KN*7* and *KN*6* may reflect selection pressure in the countries investigated. Analysis of Dombrock allele patterns confirmed uneven distribution of the *DO*1* and *DO*2* alleles with high frequencies of *DO*–4* and *DO*–5* in all groups. Altogether, findings demonstrated extensive allele-frequency heterogeneity across Africa and suggested that knowledge of patient ethnicity gives information about the high-prevalence antigens that may be lacking. These data are medically useful to support transfusion care of African migrants living in countries where the majority of the population is from a different ethnical background.

Keywords: African blood group heterogeneity, genotyping, high and low prevalence antigens, African ethnic groups.

Exposure to red blood cell (RBC) antigens as a result of transfusion or pregnancy can lead to the production of alloantibodies that can cause moderate to severe haemolytic transfusion reactions (HTRs) or haemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN). According to the stochastic model proposed by Higgins and Sloan (2008), approximately 13% of patients are responders at risk of producing alloantibodies. However, African migrants undergoing transfusion therapy for sickle cell anaemia are at higher risk, primarily because of exposure to multiple donors and differences in RBC blood groups between Black African recipients and, frequently, Caucasian donors (Westhoff, 2008). As a result, supplying compatible blood for transfusion can be challenging in countries with large migrant populations.

Of the 33 blood group systems recognized by the International Society of Blood Transfusion, the ABO, RH, KEL, JK,

MNS and FY systems are usually considered clinically relevant. Because of their involvement in HTR and HDFN, these antigens and/or alleles have been widely studied to determine frequencies in various populations (Hashmi *et al*, 2007; Badjie *et al*, 2011). A typical example of high ethnic variability is provided by the Duffy blood group in which the most prevalent allele is *FY*1* (encoding Fy(a+) antigen) globally while the predominant allele across sub-Saharan Africa is the silent *FY*02N.01* (*FY*Fy*) variant (Howes *et al*, 2011). After alloimmunization, more extensive matching is necessary for subsequent transfusion. Testing the patient's serum against a panel of reagent RBCs and the patient's autologous RBCs can detect irregular antibodies. If alloantibodies to high prevalence antigens are suspected, knowledge of the patient ethnic origin can assist investigation by allowing selection of the more common negative high-prevalence RBC antigens, e.g.

Kp(b-), Yt(a-) RBCs for Caucasians and U-negative, Js(b-) RBCs for African Americans. However, conventional study to obtain the necessary data on antigens frequencies in ethnic groups has hitherto been hindered by various technical issues. One problem has been the absence of commercially produced antisera reagents, e.g. anti-Lu^b, -Di^b, -Co^a and -Yt^a. Similarly, RBC typing for Do^a, Do^b, Hy and Jo^a is notoriously difficult because the corresponding antibodies, albeit significant, are often weakly reactive only in small volume and in sera containing other antibodies (Lomas-Francis & Reid, 2010). For these reasons, testing for DNA polymorphisms is more efficient for antigen typing than haemagglutination, as previously demonstrated in Afro-Caribbean and Comorian donors with *RH* and *KEL* allele genotyping (Silvy *et al*, 2011).

The aim of the present report is to provide data pertinent for predicting the most probable high-prevalence negative antigens in patients of African descent. For this purpose, we determined the frequencies of alleles coding for high- and low-prevalence antigens in blood samples collected from various ethnic groups in Africa and evaluated genetic diversity between eleven ethnic groups from across Africa.

Materials and methods

Blood and DNA samples

EDTA-anticoagulated peripheral blood samples were collected from two populations in Congo and two in Mali. The Ngala Congolese ($n = 161$) in the north region of Congo-Brazzaville was the largest population, accounting for 161 samples. This

cohort included individuals from three ethnic groups, i.e. 60 Akwa, 51 Mbochi and 50 Kuyu. The second Congolese population, accounting for 61 samples, comprised Tswa Pygmies ($n = 61$) living in equatorial forest areas located close to the Teke villages. The two Malian populations were made up of individuals from the Dogon and Fulani ethnic groups living in the Mopti region and accounted for 101 and 46 samples, respectively. All samples were collected and used after informed consent in accordance with current local ethical recommendations.

DNA samples were obtained from the Centre d'Étude du Polymorphisme Humain–Human Genome Diversity Panel (CEPH-HGDP, <http://www.cephb.fr/>). Ethnic groups were from across Africa including 24 Mandenka from Senegal, 25 Yoruba from Nigeria, 12 Bantu from N.E. Kenya, 36 Biaka pygmies from the Central African Republic (CAR) and 15 Mbuti pygmies from the Democratic Republic of Congo (DRC). All individuals self identified their ethnicity and each ethnic group was collected in single defined region.

Together these blood and DNA samples provided a panel representing Sub-Saharan Africa. The Mandenka, Dogon, Fulani and Yoruba ethnic groups are from West-Africa, Ngala-Congolese from Central-Africa and Bantu N.E. from East-Africa (Fig 1).

Genomic DNA extraction and whole genome amplification

For the Congo and Mali samples, genomic DNA was extracted from 200 μ l total blood using the QIAmp Blood DNA Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to

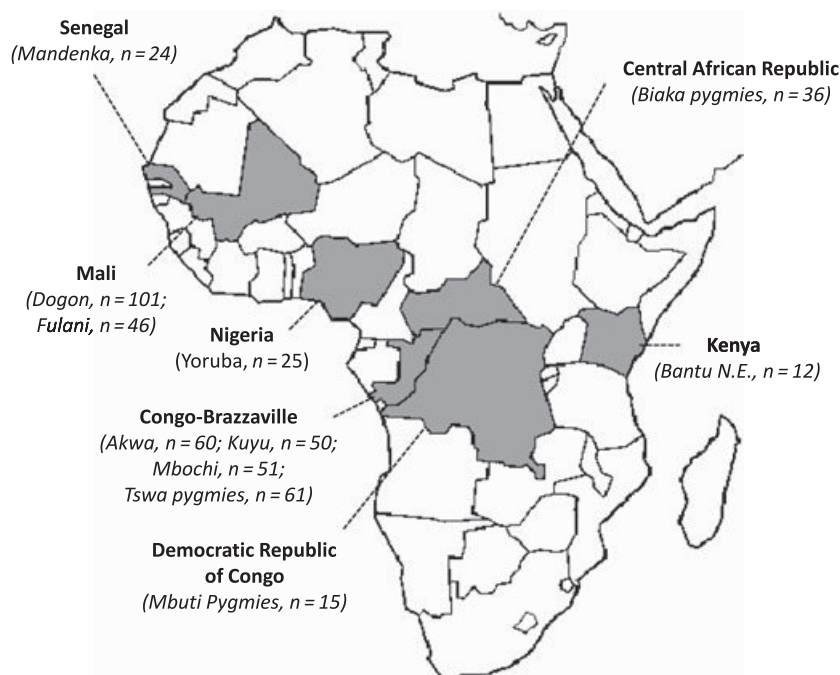


Fig 1. Geographic localization of ethnic groups included in this study.

the manufacturer's instructions. For DNA samples from the CEPH collection, whole genome amplification (WGA) was performed using the repli-G mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Briefly, DNA diluted in Tris-EDTA (TE) buffer was denatured and then, after neutralization, mixed with 40 µl of reaction buffer. Incubations were carried out at 30°C for 16 h in a thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). Following amplification, WGA-DNA was purified on a QIAamp column and eluted in water.

Blood group genotyping

Genotyping of nine blood group systems was performed by the polymerase chain reaction – reverse sequence specific oligonucleotide (PCR-RSSO) method using the LIFE-CODES RBC-R kit (Gen-Probe, Nijlen, Belgium) according to the manufacturer's instructions. This multiplex assay method, based on Luminex xMAP technology, was designed for detection of the following alleles: $CO^*1/2$, $YT^*1/2$, $DO^*1/2/*-4/*-5$, $SC^*1/2$, $LU^*1/2$, $DI^*1/2/*3/*4$, $LW^*5/7$, $KN^*1/2/*3/*4/*6/*7$ and $CROM^*+1/*-1$. Briefly, the technique consisted of asymmetric PCR-amplification of 50–150 ng of DNA using Gen-Probe Taq polymerase in a Biometra thermocycler followed by acquisition on a Luminex 100 and analysed using Lifecodes MATCH IT!-RBC software (Gen-Probe).

Comparisons and statistical analysis

Fisher's exact test was used for comparison of the frequency distribution of each antigen across Africa (<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/exact/exact.html>). For each blood group, allele frequencies were compared between pygmies and non-pygmies. Frequencies of West- Central- and East-Africa were compared with frequencies in non-pygmy Africa. Allele frequencies were also compared between ethnic groups within West- and Central-Africa (no comparison was performed for East-Africa because a single ethnic group was investigated in this location). Lastly, allele frequencies of Biaka, Tswa and Mbuti pygmies were compared with frequencies in pygmy-group to evaluate heterogeneity of pygmies. Differences with P value ≤ 0.05 were considered as statistically significant.

Results

Validation of WGA replicate products

To determine if the WGA products were valid replicates of the original unamplified DNA samples, blood group typing by Luminex-based PCR-RSSO was performed on 20 unamplified DNA samples and corresponding WGA products. In all samples and all loci tested, the genotypes obtained using WGA products were fully concordant with those generated from unamplified DNA. This validation step is further

supported by previous studies using various biological samples for successful human leucocyte antigen (HLA)-typing of WGA products (Singh & Spector, 2007; Creary *et al*, 2009).

Allele frequencies in African populations

Given that pygmies are quite distinct anthropologically, pygmy ($n = 112$) and non-pygmy (369) samples were studied separately. None of the 481 samples investigated exhibited DI^*1 , DI^*3 , YT^*2 , SC^*2 , LW^*7 or KN^*2 alleles. For other blood groups, genotypes of the 481 samples are given in Table I. The frequency of alleles in the different ethnic group is presented in Table II and allele distribution across Africa is reported in Table III. The frequency of CO^*2 and LU^*1 alleles was low in all ethnic groups. The CO^*2 allele was detected in only two samples (Biaka Pygmy and Mbochi) in the heterozygous state. The $LU^*1/1$ genotype, encoding a Lu (a+,b-) predictive phenotype, was observed in one Biaka Pygmy. The $LU^*1/2$ genotype was found in a total of 17 individuals from various ethnic groups (see Table I). All 25 Yoruba and 61 Tswa pygmies were homozygous for the LU^*2 allele. Overall, LU^*1 allele frequency ranged from 0% in Yoruba and Tswa pygmies to 8% in Biaka pygmies.

The Cromer, Dombrock, and Knops blood groups showed greater frequency variations. The frequency of the $CROM^*-1$ allele was low (<5%) in all ethnic group except Mbuti pygmies (13%). One sample was predicted to harbour the rare Cr(a-) phenotype due to homozygosity for the $CROM^*-1$ allele. The frequency of the DO^*1 allele ranged from 0% to 26%. The DO^*-4 allele (encoding the Holley-negative antigen) was not detected in Mbuti pygmies but its frequency reached 13% in both Biaka pygmies and Kuyu. A similar discrepancy was noted for the DO^*-5 allele (encoding the Joseph-negative antigen) whose frequency ranged from 0% in Tswa pygmies to 15% in Mandenka. Only one Dogon sample was homozygous for DO^*-5 that predicts the rare Jo-negative phenotype. The DO^*-4/DO^*-5 heterozygous genotype was found in six individuals (Table I).

The frequency of the KN^*6 allele was around 25% in half of the ethnic groups ranging from 13% in Mbuti pygmies and Bantu up to 40% in Fulani. The KN^*7 allele showed a wide range of frequencies, from 96% in Tswa pygmies to 53% in Biaka pygmies. Heterozygous $KN^*3/6$ and $KN^*4/7$ genotypes were found in a total of 71 samples (14.7%) including 20 Dogon, 16 Fulani, 11 Akwa, 5 Mbochi, 5 Biaka pygmies, 4 Kuyu, 4 Yoruban, 2 Mbuti pygmies, 2 Tswa pygmies, 1 Bantu, and 1 Mandenka.

Statistical analysis revealed that the Dombrock and KN^*4/KN^*7 alleles frequency in pygmies differed from that of non-pygmies ($P = 0.003$ and $P = 0.042$, respectively, Table III). The overall homogeneity of allele distributions in non-pygmy Africa was highlighted by a lack of significant difference when the frequency of each allele in West-, Central-, or East-Africans was compared to the non-pygmy Africans. Conversely, the pygmy group displayed great heterogeneity

Table 1. Genotypes and predicted phenotypes observed in 11 African ethnic groups.

Blood group system	Genotype	Predicted phenotype†	Mandenka n = 24	Dogon n = 101	Fulani n = 46	Yoruba n = 25	Akwa n = 60	Kuyu n = 50	Mbochi n = 51	Bantu N.E n = 12	Biaka pygmies n = 36	Tswa pygmies n = 61	Mbuti pygmies n = 15
Colton	CO*1/*1	Co(a+, b-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CO*1/*2	Co(a+, b+)	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-
	CO*2/*2	Co(a-, b+)	24	101	46	25	60	50	50	12	35	61	15
Lutheran	LU*1/*1	Lu(a+, b-)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
	LU*1/*2	Lu(a+, b+)	2	1	1	-	4	1	2	1	4	-	1
	LU*2/*2	Lu(a-, b+)	22	100	45	25	56	49	49	11	31	61	14
Cromer	CROM*+1/*+1	Cr(a+)	23	97	44	24	57	48	50	11	33	61	12
	CROM*+1/*-1	Cr(a+)	1	4	2	1	3	2	1	1	3	-	2
	CROM*-1/*-1	Cr(a-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Knops	KN*3/*3	McC(a+, b-)	14	52	14	15	29	31	30	9	26	20	11
	KN*3/*6	McC(a+, b+)	8	38	27	8	27	13	17	3	9	35	4
	KN*6/*6	McC(a-, b+)	2	11	5	2	4	6	4	-	1	6	-
	KN*4/*4	Sla+, ViI-	-	8	5	2	5	6	6	2	8	-	3
	KN*4/*7	Sla+, ViI+	4	44	22	8	25	19	20	6	18	5	4
	KN*7/*7	Sla-, ViI+	20	49	19	15	30	25	25	4	10	56	8
Dombrock	DO*1/*1	Do(a+, b-)	1	1	3	2	3	-	1	1	-	-	-
	DO*1/*2	Do(a+, b+)	5	24	13	7	14	8	10	4	5	20	-
	DO*1/*-4	Do(a+, b+ ^w)	2	6	3	1	1	3	-	-	-	1	-
	DO*1/*-5	Do(a+, b-)	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-
	DO*2/*2	Do(a-, b+)	7	58	21	10	32	23	28	4	21	32	14
	DO*2/*-4	Do(a-, b+)	2	6	3	1	4	7	5	-	9	8	-
	DO*2/*-5	Do(a+ ^w , b+)	6	4	3	3	5	6	6	2	1	-	1
	DO*-4/*-4	Do(a-, b+ ^w , Hy-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DO*-4/*-5	Do(a+ ^w , b+ ^w , Hy+)	1	-	-	-	-	3	1	1	-	-	-
	DO*-5/*-5	Do(a+ ^w , b-, Jo-)	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

†^w, weak.

Table II. Allele frequencies in African ethnic groups.

Ethnic group	Non-pygmies										Pygmies									
	Mandenka <i>n</i> = 24	Senegal West	Dogon <i>n</i> = 101	Fulani <i>n</i> = 46	Mali West	Yoruba <i>n</i> = 25	Akwa <i>n</i> = 60	Kuyu <i>n</i> = 50	Mbochi <i>n</i> = 51	Bantu N.E. <i>n</i> = 12	Biaka pygmies <i>n</i> = 36	Tswa pygmies <i>n</i> = 61	Mbuti pygmies <i>n</i> = 15							
Country Location in Africa	Senegal West		Mali West		Mali West		Nigeria West		Congo-B Central		Congo-B Central		Kenya East		CAR		Congo-B		DRC	
Allele (antigen)	Co(a+)	1	1	1	1	1	1	1	0.99	1	0.99	1	1	1	0.99	1	0.99	1	1	1
CO*2	Co(b+)	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0	0.01	0	0	0	0.01	0	0.01	0	0	0
LU*1	Lu(a+)	0.04	0.01	0.01	0.01	0	0.03	0.01	0.02	0.04	0.08	0	0	0	0.08	0	0.08	0	0	0.03
LU*2	Lu(b+)	0.96	0.99	0.99	0.99	1	0.97	0.99	0.98	0.96	0.92	1	1	1	0.92	1	0.92	1	1	0.97
CROM*+1	Cr(a+)	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.97	0.98	0.99	0.96	0.96	1	1	1	0.96	1	0.96	1	1	0.87
CROM*-1	Cr(a-)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.01	0.04	0.04	0	0	0	0.04	0	0.04	0	0	0.13
DO*1	Do(a+)	0.19	0.16	0.24	0.24	0.26	0.18	0.11	0.12	0.25	0.07	0.17	0	0	0.07	0.17	0.07	0.17	0	0
DO*2	Do(b+)	0.56	0.74	0.66	0.66	0.62	0.73	0.67	0.75	0.58	0.79	0.75	0.75	0.75	0.79	0.75	0.79	0.75	0.75	0.97
DO*-4	Hy-	0.10	0.06	0.07	0.07	0.04	0.04	0.13	0.06	0.04	0.13	0.07	0	0	0.13	0.07	0.13	0.07	0	0
DO*-5	Jo(a-)	0.15	0.03	0.03	0.03	0.08	0.05	0.09	0.07	0.13	0.01	0	0	0	0.01	0	0.01	0	0	0.03
KN*3	McC(a+)	0.75	0.70	0.60	0.60	0.76	0.71	0.75	0.75	0.88	0.85	0.61	0.61	0.61	0.85	0.61	0.85	0.61	0.61	0.87
KN*6	McC(b+)	0.25	0.30	0.40	0.40	0.24	0.29	0.25	0.25	0.13	0.15	0.39	0.39	0.39	0.15	0.39	0.15	0.39	0.39	0.13
KN*4	Sl(a+)	0.08	0.30	0.35	0.35	0.24	0.29	0.31	0.31	0.42	0.47	0.04	0.04	0.04	0.47	0.04	0.47	0.04	0.04	0.33
KN*7	Vil+	0.92	0.60	0.60	0.65	0.76	0.71	0.69	0.69	0.58	0.53	0.96	0.96	0.96	0.53	0.96	0.53	0.96	0.96	0.67

Difference in Dombrock alleles distribution between Mbuti ethnicity and pygmy-group is shown in italics (see Table III). Differences in KN*4/KN*7 alleles distribution between Biaka ethnicity and pygmy-group and between Tswa ethnicity and pygmy-group are underlined (see Table III).

Table III. Geographic distribution of allele frequencies in Africa and comparison with published data.

Allele (antigen)	Non pygmies										Black Detroit donors <i>n</i> = 8858	
	Pygmies <i>n</i> = 112	Mean Africa <i>n</i> = 369	West-Africa <i>n</i> = 196	Central-Africa <i>n</i> = 161	East-Africa <i>n</i> = 12	Western Hadza (Tanzania) <i>n</i> = 162	Eastern Hadza (Tanzania) <i>n</i> = 102	African American (USA)† <i>n</i> = 223	Teke (Congo) <i>n</i> = 41	Gambia <i>n</i> = 853		Malawi <i>n</i> = 395
Ethnic group/origin/Location												
<i>CO*1</i>	0.996	0.999	1	0.98	1			1				
<i>CO*2</i>	0.004	0.001	0	0.02	0			0				
<i>LU*1</i>	0.03	0.02	0	0.03	0.04	0.04	0.07	0.03				0.02
<i>LU*2</i>	0.97	0.98	0.98	0.98	0.96	0.96	0.93	0.97				0.98
<i>CROM*+1</i>	0.97	0.98	0.98	0.98	0.96							>0.9
<i>CROM*-1</i>	0.03	0.02	0.02	0.02	0.04							<0.1
<i>DO*1</i>	0.12	0.17	0.02	0.14	0.25			0.31	0.18			0.33
<i>DO*2</i>	0.79	0.70	0.69	0.72	0.58			0.69	0.71			0.67
<i>DO*-4</i>	0.08	0.07	0.06	0.07	0.04			0.04	0.07			<0.1
<i>DO*-5</i>	0.01	0.06	0.05	0.07	0.13			0.04	0.04			<0.1
<i>KN*3</i>	0.72	0.72	0.76	0.74	0.87					0.61	0.31	0.75
<i>KN*6</i>	0.28	0.28	0.24	0.26	0.13					0.39	0.69	0.25
<i>KN*4</i>	0.22	0.29	0.28	0.30	0.42					0.20	0.11	0.38
<i>KN*7</i>	0.78	0.71	0.72	0.70	0.58					0.80	0.89	0.62
Reference	This study					(Tills <i>et al</i> , 1982)	(Tills <i>et al</i> , 1982)	(Hashmi <i>et al</i> , 2007)	(Chapel-Fernandes <i>et al</i> , 2009)	(Zimmerman <i>et al</i> , 2003)	(Fitness <i>et al</i> , 2004)	(Daniels, Reid <i>et al</i> , 2012)

†Volunteer donors self-identifying their ethnicity. Differences in Dombrock and *KN*4/KN*7* alleles distribution between pygmy- and non-pygmy Africans are shown in bold. Difference in Dombrock alleles distribution between Mbuti ethnicity and pygmy-group is shown in italics (see Table II). Differences in *KN*4/KN*7* alleles distribution between Biaka ethnicity and pygmy-group and between Tswa ethnicity and pygmy-group are underlined (see Table II).

(Table II and III) because (i) the frequency of Dombrock alleles differed between Mbuti ethnicity and pygmy group ($P = 0.042$) and (ii) the frequency of KN^*4/KN^*7 alleles differed between the Tswa and Biaka ethnicities and the pygmy group ($P = 0.0001$ and 0.009 , respectively).

Discussion

Ethnic variations in RBC antigens can lead to alloimmunization, especially in migrant populations and patients with sickle cell anaemia. Most studies of blood groups in Blacks have been carried out in Afro-Americans who have Caucasian admixture (Solovieff *et al*, 2011). Large-scale genotyping data are lacking for African populations. This is the first report not only to describe frequencies of alleles encoding some of the high- and low-prevalence antigens in Sub-Saharan populations but also to assess variations in allele frequency in cohorts clearly identified in relation to their location and ethnic origin. In this study, a total of 481 samples were genotyped for 24 alleles belonging to nine blood group systems and included 112 samples from pygmies and 369 from non-pygmy ethnic groups living in West- ($n = 196$), Central- ($n = 161$) and East-Africa ($n = 12$).

The absence of DI^*1 , DI^*3 , SC^*2 , LW^*7 , and KN^*2 in populations from African descent is consistent with previous reports. The DI^*1 allele is known to be present only in populations of Mongolian descent, *i.e.*, Chinese, Japanese, and American Indian (Zelinski, 1998). The SC^*2 allele has been found in Caucasian and Hispanic Americans but has not yet been described in African populations (Hashmi *et al*, 2007). The LW^*7 allele is considered as a "Baltic marker" occurring in Northern European populations, *e.g.* about 5% of Finns (Hermand *et al*, 1995; Sistonen *et al*, 1999). The KN^*2 allele has not been detected in either West Africans or Malians (Moulds *et al*, 2000).

None of the Africans in our cohort was positive for YT^*2 allele. This finding was unexpected because the frequency of the YT^*2 allele in donor samples from self-identified Afro-Americans, *i.e.*, 2.2%, had predicted a total of 20 $YT^*1/2$ samples in our cohort of 481 individuals (Tossas *et al*, 2008). Given that YT^*2 frequency in Caucasians is 3.8% (Byrne & Byrne, 2004), this discrepancy between predicted and observed data could be explained by Caucasian admixture in Afro-Americans.

The low frequency of CO^*2 alleles was concordant with previously published data in Afro-Americans, Caucasians and Tanzanian Hadzas (Tills *et al*, 1982; Hashmi *et al*, 2007), suggesting that the immunization risk for the Colton blood group system is comparable in Black Africans, Afro-Americans and Caucasians. The frequency of LU^*1 allele, encoding Lu^a antigen, was generally comparable to that of Europeans (2%), but higher levels were noted in Biaka pygmies (8%) as previously reported in some ethnic sub-groups (Tills *et al*, 1982).

Investigation of the Cr^a antigen encoded by $CROM^*+1$ allele has been hindered by the lack of specific detection antibodies. Perusal of clinical data shows that all reports of anti- Cr^a have involved Black people except for one case that described detection in the serum of a Spanish-American woman (Smith *et al*, 1983). In a cohort of 8858 black donors from Detroit, two were $Cr(a-)$ for an allele frequency of 1.5% (Daniels, 2002). In our African cohort, $CROM^*-1$ allele frequency ranged from 0% to 4% in all ethnic groups except in Mbuti pygmies, in whom it was 13%. This unprecedentedly high rate suggests the possibility of a high-frequency $Cr(a-)$ phenotype ethnic group. The main implication of this finding is that some African people may be at high risk for immunization to the high-prevalence Cr^a antigen. Importantly in this regard, there is no firm evidence that anti- Cr^a has caused a HTR and, despite stimulation during pregnancy, there have been no cases of anti- Cr^a related HDFN. Transfusion with antigen-negative blood need only to be considered in patients showing a high antibody titre (Daniels *et al*, 2002). However, anti- Cr^a may mask the clinically relevant alloantibodies.

The high KN^*6 and KN^*7 allele frequencies observed in this study were consistent with those previously reported in West Africa (Moulds *et al*, 2000; Zimmerman *et al*, 2003). However, the KN^*4 and KN^*7 allele frequencies in Mali were significantly different ($P = 0.0287$) from those described by Moulds *et al* (2000). A possible explanation for this discrepancy is that our population included two of the more than 20 Malian ethnic groups whereas Moulds *et al* (2001) studied a cohort of 99 samples of unspecified ethnic origin. Knops alleles may have evolved under selective pressure in malaria-endemic areas of Africa. In support of this hypothesis, individuals with the $KN^*7/7$ genotype, which confers the $Sl(a-)$, Vil^+ phenotype, showed decreased susceptibility to cerebral malaria (Thathy *et al*, 2005). Similarly, Nounsi *et al* (2011) reported that individuals heterozygous for KN^*3 and KN^*6 alleles were more resistant to *M. tuberculosis* infection. These survival advantages could account for the high frequencies of KN^*7 and, to a lesser extent, of KN^*6 alleles in the endemic countries investigated. Knops system antibodies are rarely, if ever, clinically significant because no case of HTR and/or HDFN has been associated with Knops antigens. Nevertheless, detection of high KN^*6 and KN^*7 frequencies in Africans underlines the high risk for alloimmunization in people of African origin living in Caucasian countries.

Analysis of the Dombrock system demonstrated extensive polymorphism in Africans. In agreement with a previous report by Chapel-Fernandes *et al* (2009), we noted a highly uneven distribution of DO^*1 (range, 0–26%) and DO^*2 alleles (range, 56–97%) in all subgroups. In many ethnic groups, DO^*-4 and DO^*-5 alleles (encoding $Hy-$ and $Jo-$ antigens, respectively) showed frequencies of 10% or more, leading to a calculated frequency >1% for homozygous individuals. Given that Dombrock antigens have been implicated in both immediate and delayed transfusion reactions,

this finding highlights the necessity of screening in all African groups, regardless of geographic or ethnic origin. Some other Dombrock alleles, for which the frequency and clinical relevance are unknown, have not been investigated (Baleotti *et al*, 2006; Hashmi *et al*, 2007; Chapel-Fernandes *et al*, 2009; Costa *et al*, 2010; Mayer *et al*, 2010).

This study provides additional proof of the need to search for Holley and Joseph negative antigens, encoded by DO^*-4 and DO^*-5 alleles, respectively, in Black individuals. Our data on the Lutheran, Cromer and Knops blood groups indicate that some African groups are at high risk for developing antibodies against these antigens. Although these antibodies are not currently considered as clinically significant, they may mask relevant alloantibodies against RBCs. Altogether, the results of blood group genotyping clearly distinguish

African from Caucasian populations and illustrates the genetic heterogeneity of African ethnic populations in terms of allele frequency. A major implication of this is that ethnic origin is more pertinent than geographical origin in predicting which high-prevalence antigen is likely to be absent. This finding is important for transfusion management in Africa as well as in countries hosting migrant populations. It can also be useful for donor screening to identify antigen-negative blood needed for anti-Lu^b and -Co^b patients as well as in case of strong examples of anti-Hy, -Jo^a or anti-Cr^a.

Disclosure and conflicts of interest

All authors declare they have no conflict of interest in the subject matter of their article.

References

- Badjie, K.S., Tauscher, C.D., van Buskirk, C.M., Wong, C., Jenkins, S.M., Smith, C.Y. & Stubbs, J.R. (2011) Red blood cell phenotype matching for various ethnic groups. *Immunohematology*, **27**, 12–19.
- Baleotti, W., Rios, M., Reid, M.E., Hashmi, G., Fabron, A., Pellegrino, J. & Castilho, L. (2006) Dombrock gene analysis in Brazilian people reveals novel alleles. *Vox Sanguinis*, **91**, 81–87.
- Byrne, K.M. & Byrne, P.C. (2004) Other blood group system Diego, YT, Xg Scianna, Dombrock, Colton, Landsteiner-Wiener and Indian. *Immunohematology*, **20**, 50–58.
- Chapel-Fernandes, S., Callebaut, I., Halverson, G.R., Reid, M.E., Bailly, P. & Chiaroni, J. (2009) Dombrock genotyping in a native Congolese cohort reveals two novel alleles. *Transfusion*, **49**, 1661–1671.
- Costa, F.P., Hue-Roye, K., Sausais, L., Velliquette, R.W., Da Costa Ferreira, E., Lomas-Francis, C. & Reid, M.E. (2010) Absence of DOMR, a new antigen in the Dombrock blood group system that weakens expression of Do(b), Gy(a), Hy, Jo(a), and DOYA antigens. *Transfusion*, **50**, 2026–2031.
- Creary, L.E., Girdlestone, J., Zamora, J., Brown, J. & Navarrete, C.V. (2009) Molecular typing of HLA genes using whole genome amplified DNA. *Transfusion*, **49**, 57–63.
- Daniels, G. (ed.) (2002) *Human Blood Groups*. Blackwell Science, Oxford.
- Daniels, G., Poole, J., de Silva, M., Callaghan, T., MacLennan, S. & Smith, N. (2002) The clinical significance of blood group antibodies. *Transfusion Medicine (Oxford, England)*, **12**, 287–295.
- Fitness, J., Floyd, S., Warndorff, D.K., Sichali, L., Mwaungulu, L., Crampin, A.C., Fine, P.E. & Hill, A.V. (2004) Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **71**, 330–340.
- Hashmi, G., Shariff, T., Zhang, Y., Cristobal, J., Chau, C., Seul, M., Vissavajhala, P., Baldwin, C., Hue-Roye, K., Charles-Pierre, D., Lomas-Francis, C. & Reid, M.E. (2007) Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. *Transfusion*, **47**, 736–747.
- Hernand, P., Gane, P., Mattei, M.G., Sistonon, P., Cartron, J.P. & Bailly, P. (1995) Molecular basis and expression of the LWa/LWb blood group polymorphism. *Blood*, **86**, 1590–1594.
- Higgins, J.M. & Sloan, S.R. (2008) Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: evidence for a distinct population of immunologic responders. *Blood*, **112**, 2546–2553.
- Howes, R.E., Patil, A.P., Piel, F.B., Nyangiri, O.A., Kabaria, C.W., Gething, P.W., Zimmerman, P.A., Barnadas, C., Beall, C.M., Gebremedhin, A., Ménard, D., Williams, T.N., Weatherall, D.J. & Hay, S.I. (2011) The global distribution of the Duffy blood group. *Nature Communications*, **2**, 266.
- Lomas-Francis, C. & Reid, M.E. (2010) The Dombrock blood group system: a review. *Immunohematology*, **26**, 71–78.
- Mayer, B., Thornton, N., Yürek, S., Wylie, D., Hue-Roye, K., Poole, J., Bartolmäs, T., Salama, A., Lomas-Francis, C., Velliquette, R.W., Yazdanbakhsh, K. & Reid, M.E. (2010) New antigen in the Dombrock blood group system, DOYA, ablates expression of Do(a) and weakens expression of Hy, Jo(a), and Gy(a) antigens. *Transfusion*, **50**, 1295–1302.
- Moulds, J.M., Kassambara, L., Middleton, J.J., Baby, M., Sagara, I., Guindo, A., Coulibaly, S., Yalcouye, D., Diallo, D.A., Miller, L. & Doumbo, O. (2000) Identification of complement receptor one (CR1) polymorphisms in west Africa. *Genes and Immunity*, **1**, 325–329.
- Moulds, J.M., Zimmerman, P.A., Doumbo, O.K., Kassambara, L., Sagara, I., Diallo, D.A., Atkinson, J.P., Krych-Goldberg, M., Hauhart, R.E., Hourcade, D.E., McNamara, D.T., Birmingham, D.J., Rowe, J.A., Moulds, J.J. & Miller, L.H. (2001) Molecular identification of Knops blood group polymorphisms found in long homologous region D of complement receptor 1. *Blood*, **97**, 2879–2885.
- Noumsi, G.T., Tounkara, A., Diallo, H., Billingsley, K., Moulds, J.J. & Moulds, J.M. (2011) Knops blood group polymorphism and susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection. *Transfusion*, **51**, 2462–2469.
- Reid, M.E., Lomas-Francis, C. & Olsson, M.L. (2012) *The Blood Group Antigens. Fact Book*. Academic Press, Elsevier, San Diego, CA.
- Silvy, M., Di Cristofaro, J., Beley, S., Papa, K., Rits, M., Richard, P., Chiaroni, J. & Bailly, P. (2011) 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. *British Journal of Haematology*, **154**, 260–270.
- Singh, K.K. & Spector, S.A. (2007) Fidelity of whole-genome amplification of blood spot DNA for HLA typing and SNP analyses. *Clinical Genetics*, **72**, 156–159.
- Sistonon, P., Virtaranta-Knowles, K., Denisova, R., Kucinskis, V., Ambrasiene, D. & Beckman, L. (1999) The LWb blood group as a marker of prehistoric Baltic migrations and admixture. *Human Heredity*, **49**, 154–158.
- Smith, K.J., Coonce, L.S., South, S.F. & Troup, G.M. (1983) Anti-Cr^a: family study and survival of chromium-labeled incompatible red cells in a Spanish-American patient. *Transfusion*, **23**, 167–169.
- Solovieff, N., Hartley, S.W., Baldwin, C.T., Klings, E.S., Gladwin, M.T., Taylor, J.G., Kato, G.J., Farrer, L.A., Steinberg, M.H. & Sebastiani, P. (2011) Ancestry of African Americans with sickle cell disease. *Blood Cells, Molecules, & Diseases*, **47**, 41–45.
- Thathy, V., Moulds, J.M., Guyah, B., Otieno, W. & Stoute, J.A. (2005) Complement receptor 1 polymorphisms associated with resistance to severe malaria in Kenya. *Malaria Journal*, **4**, 54.
- Tills, D., Kopeć, A.C., Warlow, A., Barnicot, N.A., Mourant, A.E., Marin, A., Bennett, F.J. &

- Woodburn, J.C. (1982) Blood group, protein, and red cell enzyme polymorphisms of the Hadza of Tanzania. *Human Genetics*, **61**, 52–59.
- Tossas, E., Baxter, M., Reid, M.E., Charles-Pierre, D. & Lomas-Francis, C. (2008) Prevalence of Yt(a-) in Hispanic blood donors. *Immunohematology*, **24**, 27.
- Westhoff, C.M. (2008) The potential of blood group genotyping for transfusion medicine practice. *Immunohematology*, **24**, 190–195.
- Zelinski, T. (1998) Erythrocyte band 3 antigens and the Diego Blood Group System. *Transfusion Medicine Reviews*, **12**, 36–45.
- Zimmerman, P.A., Fitness, J., Moulds, J.M., McNamara, D.T., Kasehagen, L.J., Rowe, J.A. & Hill, A.V. (2003) CR1 Knops blood group alleles are not associated with severe malaria in the Gambia. *Genes and Immunity*, **4**, 368–373.

Notre cohorte de 147 individus volontaires comprenant 101 Dogons et 46 Peulhs a été analysée après extraction de l'ADN, à l'aide du kit Life-Codes RBC-Rare-9 développé par la société Gen-Probe basée à Nijlen en Belgique. Comme précédemment, ce kit est basé sur une réaction de PCR multiplexe allèle spécifique (PCR-RSSO) utilisant la technologie Luminex xMAP. Cet outil moléculaire a la caractéristique d'explorer simultanément 14 polymorphismes à la base des allèles suivants : *CO*01/*02*, *DO*01/*02/*-04/*-05*, *SC*01/*02*, *LU*01/*02*, *DI*01/*02/*03/*04*, *LW*05/*07*, *YT*01/*02*, *KN*01/*02/*03/*04/*06/*07* et *CROM*+1/*-1*. L'intérêt de ce kit est d'identifier des allèles codant des antigènes érythrocytaires de haute et basse fréquence pour lesquels ils n'existent pas de réactifs immunologiques actuellement disponibles.

Expression des antigènes de haute et basse fréquence chez les Dogons et les Peulhs

Il s'agit donc de la première évaluation des allèles constituant les systèmes Colton, Dombrock incluant les variants *DO*02.-04* et *DO*01.-05*, Scianna, Luthéran, Diego, Landsteiner-Wiener, Cartwright, Knops et Cromer au sein des groupes ethniques Dogons et Peulhs.

Nos résultats de génotypage des systèmes CO, DO, SC, LU, DI, LW KN et CROM révèlent que les allèles *CO*02*, *SC*02*, *DI*01*, *DI*03*, *LW*07*, *YT*02* et *KN*02* codant pour des antigènes de basse fréquence pour les personnes originaires d'Afrique, sont absents des Dogons et des Peulhs. L'ensemble des 2 groupes ethniques sont donc homozygotes pour les allèles *CO*01*, *SC*01*, *DI*02*, *DI*04*, *LW*05*, *YT*01* et *KN*01* codant respectivement les antigènes de haute fréquence Co(a+), Sc:1, Di(b+), Wr(b+), LW(a+), Yt(a+) et Kn(a+) (voir tableaux 23 et 24).

Pour le système Dombrock, on observe une forte proportion d'individus de phénotype déduit Do(b+) avec une fréquence allélique de 0,74 chez les Dogons et 0,66 chez les Peulhs. Ces fréquences sont en accord avec celles observées à la suite de l'étude des Tekes du Congo et des Afro-américains (Chapel-Fernandes et al., 2009; Daniels, 2013b). Cependant, les fréquences de l'allèle *DO*01* observées ici pour les Dogons (0,16) et les Peulhs (0,24) sont nettement supérieures à la fréquence de 0,073 observée dans la population des donneurs de Bamako soulignant l'importance de l'origine ethnique des individus. Les allèles *DO*02.-04* et *DO*01.-05* codant respectivement l'absence des antigènes de haute fréquence Holley et Joseph, sont identifiés dans les deux groupes à des niveaux de

fréquences attendus. Un seul individu Dogon est génotypé *DO*01.-05* homozygote ce qui prédit un phénotype rare Joseph-négatif.

Pour le système Luthéran, comme attendu, l'allèle *LU*01* est peu fréquent, il est seulement identifié à l'état hétérozygote chez un Dogon et un Peulh.

Bien que tous les Dogons et Peulhs soient homozygotes pour l'allèle *KN*01*, on observe l'ensemble des combinaisons d'expression des antigènes de haute fréquence McC^a/McC^b et Sl^a/Vil . Ainsi, en parallèle des génotypes homozygotes pour chacun des allèles, le génotype hétérozygote *KN*03/*06* est identifié chez 38 des 101 Dogons et 27 des 46 Peulhs, et le génotype hétérozygote *KN*04/*07* chez 44 Dogons et 22 Peulhs. Ceci illustre la grande diversité des phénotypes du système Knops au sein des populations originaires d'Afrique alors que seuls les antigènes McC^a et Sl^a sont prépondérants dans les populations européennes. Il est à noter que les fréquences des allèles *KN*04* et *KN*07* sont significativement différentes ($P=0.0287$) de celles rapportées en 2000 par l'équipe de Moulds. Cependant, l'absence de spécificité ethnique des 99 échantillons investigués par Moulds pourrait expliquer cette différence (Moulds et al., 2001). Enfin, l'ensemble des individus des deux groupes ethniques sont prédits positifs pour l'expression de l'antigène de haute fréquence Cr(a+) résultant tous d'un génotype homozygote pour l'allèle *CROM*+1* à l'exception de 4 Dogons et 2 Peulhs génotypés hétérozygote *CROM*+1/*-1*. A titre comparatif, le phénotype Cr(a+) est prépondérant en Europe.

Afin de conforter nos résultats et comme la plupart des études de groupes sanguins érythrocytaires ont été effectuées antérieurement à partir d'Afro-Américains (Solovieff et al., 2011), nous avons décidé d'étendre le génotypage à 9 autres groupes ethniques d'Afrique subsaharienne à savoir 6 groupes non-pygmoïdes les Mandekas du Sénégal, les Yoruba du Nigéria, les Akwas, les Kuyus, les Mbochis du Congo-Brazaville et les Bantus du Kenya, et 3 groupes pygmoïdes les Tswas du Congo-Brazaville, les Mbutis de la République Démocratique du Congo et les Biakas de la République Centre Africaine.

Cette approche doit nous permettre d'évaluer les variations de fréquence entre des cohortes clairement identifiées géographiquement et pour leur origine ethnique en Afrique subsaharienne.

Tableau 23 : Génotypes et phénotypes déduits observés chez les Dogons et les Peulhs.

Système	Génotype	Phénotype déduit	Groupe ethnique	
			Dogon n=101	Peulh n=46
Colton	<i>CO*01/*01</i>	Co(a+, b-)	101	46
Dombrock	<i>DO*01/*01</i>	Do(a+, b-)	1	3
	<i>DO*01/*02</i>	Do(a+, b+)	24	13
	<i>DO*01/*02.-04</i>	Do(a+, b+w)	6	3
	<i>DO*01/*01.-05</i>	Do(a+, b-)	1	.
	<i>DO*02/*02</i>	Do(a-, b+)	58	21
	<i>DO*02/*02.-04</i>	Do(a-, b+)	6	3
	<i>DO*02/*01.-05</i>	Do(a+w, b+)	4	3
	<i>DO*01.-5/*01.-5</i>	Do(a+w, b-, Jo-)	1	.
Scianna	<i>SC*01/SC*01</i>	Sc:1,-2	101	46
Luthéran	<i>LU*01/*02</i>	Lu(a+, b+)	1	1
	<i>LU*02/*02</i>	Lu(a-, b+)	100	45
Diego	<i>DI*02/*02</i>	Di(a-, b+)	101	46
	<i>DI*04/*04</i>	Wr(a-, b+)	101	46
Lansteiner-Wiener	<i>LW*05/*05</i>	LW(a+, b-)	101	46
Cartwright	<i>YT*01/*01</i>	Yt(a+, b-)	101	46
Knops	<i>KN*01/*01</i>	Kn(a+, b-)	101	46
	<i>KN*03/*03</i>	McC(a+, b-)	52	14
	<i>KN*03/*06</i>	McC(a+, b+)	38	27
	<i>KN*06/*06</i>	McC(a-, b+)	11	5
	<i>KN*04/*04</i>	Sla+, Vil-	8	5
	<i>KN*04/*07</i>	Sla+, Vil+	44	22
	<i>KN*07/*07</i>	Sla-, Vil+	49	19
Cromer	<i>CROM*+1/*+1</i>	Cr(a+)	97	44
	<i>CROM*+1/*-1</i>	Cr(a+)	4	2

w, faible

Tableau 24 : Fréquences alléliques chez les Dogons et les Peulhs

Allèle	Antigène	Groupe ethnique	
		Dogon n=101	Peulh n=46
<i>CO*01</i>	Co(a+)	1	1
<i>DO*01</i>	Do(a+)	0.16	0.24
<i>DO*02</i>	Do(b+)	0.74	0.66
<i>DO*02.-04</i>	Hy-	0.06	0.07
<i>DO*01.-05</i>	Jo(a-)	0.03	0.03
<i>SC*01</i>	Sc1	1	1
<i>LU*01</i>	Lu(a+)	0.01	0.01
<i>LU*02</i>	Lu(b+)	0.99	0.99
<i>DI*02</i>	Di(a+)	1	1
<i>DI*04</i>	Wr(b+)	1	1
<i>LW*05</i>	LW(a+)	1	1
<i>YT*01</i>	Yt(a+)	1	1
<i>KN*01</i>	Kn(a+)	1	1
<i>KN*03</i>	McC(a+)	0.70	0.60
<i>KN*06</i>	McC(b+)	0.30	0.40
<i>KN*04</i>	Sl(a+)	0.30	0.35
<i>KN*07</i>	Vil+	0.60	0.65
<i>CROM*+1</i>	Cr(a+)	0.98	0.98
<i>CROM*-1</i>	Cr(a-)	0.02	0.02

En bleu les allèles de basse fréquence. Les Allèles absents sont *CO*02*, *SC*02*, *DI*01*, *DI*03*, *LW*07*, *YT*02* et *KN*02*.

Diversité génétique de 11 groupes ethniques d'Afrique subsaharienne

L'interprétation des résultats de génotypage des 481 échantillons, a été réalisée à travers deux paramètres, premièrement, le caractère pygmoïde (n=112) et non-pygmoïde (n=369) de chaque groupe ethnique sachant que les pygmées sont distincts anthropologiquement, et, deuxièmement la répartition géographique en Afrique subsaharienne des populations vivants à l'Ouest (n=196), au Centre (n=161) et à l'Est (n=12). Les génotypes et phénotypes déduits dans les différents groupes ethniques sont présents dans le Tableau I de l'article. Les fréquences des différents allèles et leurs distributions à travers l'Afrique subsaharienne sont rapportées dans les Tableaux II et III de l'article.

Pour l'analyse des résultats, la méthodologie suivante est appliquée. Le test exact de Fisher est utilisé pour la comparaison de la distribution des fréquences de chaque antigène (<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/exact/exact.html>). Pour chaque système, les fréquences des différents allèles sont comparées entre le groupe pygmoïde (n=112) et le groupe non-pygmoïde (n=369). Les fréquences alléliques des zones Ouest, Centre et Est de l'Afrique subsaharienne sont comparées aux fréquences des Africains non-pygmoïdes. Les fréquences des allèles sont également comparées entre les groupes ethniques au sein des zones Ouest et Centre à l'exclusion de la zone Est qui inclut une seule ethnie. Enfin les fréquences alléliques des pygmoïdes Biakas, Tswas et Mbutis sont comparées aux fréquences du groupe pygmoïde pour évaluer l'hétérogénéité des pygmées. Les différences présentant une valeur *P* inférieure ou égale à 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives.

- Des allèles absents

Comme précédemment observé chez les Dogons et les Peulhs, aucun des nouveaux échantillons analysés (n=334) n'est porteur des allèles *SC*02*, *DI*01*, *DI*03*, *LW*07*, *YT*02* et *KN*02* (voir Tableau I de l'article). Les absences de ces allèles sont en accord avec les données de la littérature.

L'allèle *SC*02* allèle est rare chez les Européens et les Hispaniques d'Amérique et n'a jamais été observé en Afrique (Hashmi et al., 2007). L'allèle *DI*01* est uniquement présent dans les populations d'origine Mongole, à savoir, les populations chinoises, japonaises et les Indiens d'Amérique (Zelinski, 1998). L'allèle *LW*07* est un "marqueur Baltique" présent dans les populations d'Europe du Nord (Hermand et al., 1995; Sistonen et al., 1999). De façon

surprenante, aucun de nos échantillons n'est positif pour l'allèle $YT*02$ alors qu'il a été rapporté des fréquences de 0,02 pour les donneurs auto-identifiés Afro-américains et 0,038 pour les Européens (Byrne and Byrne, 2004). Cette différence peut s'interpréter *via* le métissage. Enfin, l'allèle $KN*02$ est décrit pour être absent de l'Africain de l'Ouest et du Mali (Moulds et al., 2000).

*Basses fréquences dans tous les groupes ethniques pour les allèles $CO*02$ et $LU*01$.*

- L'allèle $CO*02$ a été identifié uniquement à l'état hétérozygote chez deux individus : un pygmoïde Biaka et un Mbochi. Cette faible fréquence $CO*02$ est concordante avec les données publiées précédemment pour les Afro-Américains, les Caucasiens et les Hadzas de Tanzanie (Hashmi et al., 2007; Tills et al., 1982), ce qui suggère que le risque d'allo-immunisation est comparable pour les Africains, les Afro-Américains et les Européens.

- Pour l'allèle $LU*01$, un seul pygmoïde Biaka présente un génotype homozygote $LU*01/*01$ à la base du phénotype rare Lu(a+b-). Le génotype hétérozygote $LU*01/*02$ a été identifié au total chez 17 individus appartenant à la plupart des groupes ethniques étudiés (voir Tableau I de l'article). Les 25 Yorubas et les 61 pygmoïdes Tswas sont tous de génotype $LU*02/*02$. Globalement, la fréquence allélique $LU*01$ varie de 0 chez les Yorubas et les pygmoïdes Tswas, à 0,08 chez les pygmoïdes Biakas. Elle est du même ordre chez les Européens (0,02). Des fréquences plus élevées ont été observées dans les populations Hadzas de l'Est et de l'Ouest de la Tanzanie (Tills et al., 1982).

Grandes variations de fréquence pour les allèles des systèmes Cromer, Dombrock et Knops

- La fréquence de l'allèle $CROM*1$ est faible (<0,05) dans l'ensemble des groupes ethniques à l'exception des pygmoïdes Mbutis (0,13) dont un individu présente un génotype homozygote $CROM*-1/*-1$ à la base du phénotype déduit Cr(a-). Cette fréquence élevée sous entend une plus grande fréquence du phénotype Cr(a-) pour certains Africains avec un haut risque d'allo-immunisation vis-à-vis de l'antigène de haute fréquence Cr(a+). Les données cliniques montrent que les allo-anticorps anti-Cr^a sont tous identifiés chez des Africains à l'exception d'un cas survenu chez une femme hispano-américaine (Smith et al., 1983). Parallèlement, il n'y a pas d'élément solide pour affirmer que ces allo-anticorps sont à l'origine de réaction hémolytique transfusionnelle ou de la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né. Cependant, ils peuvent parfois masquer d'autres allo-anticorps

pertinents. Pour le patient présentant un titre élevé d'anti-Cr^a, la transfusion d'unités de phénotype Cr(a-) doit être envisagée.

- L'analyse du système Dombrock montre une plus grande diversité d'allèles chez les Africains que chez les Européens. En concordance avec des données précédentes du laboratoire (Chapel-Fernandes et al., 2009), nous observons une répartition des allèles *DO*01* et *DO*02* très inégale dans tous les groupes ethniques. La fréquence de l'allèle *DO*01* varie de zéro chez les pygmoïdes Mbutis à 0,26 chez les Yorubas et la fréquence de l'allèle *DO*02* varie de 0,56 à 0,97 chez les pygmoïdes Mbutis. Les allèles *DO*02.-04* et *DO*01.-05* codant respectivement pour le phénotype Holley-négatif et Joseph-négatif montrent soit des fréquences nulles (pygmoïdes Mbutis et Tswas), soit des fréquences supérieures à 0,10 (pygmoïdes Biaka et Kuyus, non-pygmoïdes Mandenkas) conduisant à une fréquence théorique supérieure à 1% d'individus homozygotes. Dans l'ensemble de notre cohorte, un seul Dogon présente un phénotype déduit Joseph-négatif alors que cinq génotypes hétérozygotes *DO*02.-4/DO*01.-5* sont identifiés. Sachant que les antigènes Dombrock sont impliqués dans des réactions transfusionnelles immédiates ou retardées, il serait nécessaire dans l'absolu de typer l'ensemble des Africains, indépendamment de leur origine géographique ou ethnique.

Il est à noter, qu'il existe d'autres allèles Dombrock pour lesquels la fréquence et la pertinence clinique sont aujourd'hui inconnus et qui n'ont pas été recherchés dans notre étude (Baleotti et al., 2006; Chapel-Fernandes et al., 2009; Costa et al., 2010; Hashmi et al., 2007; Mayer et al., 2010).

- Les fréquences élevées des allèles *KN*06* et *KN*07* observées dans notre étude sont en accord avec celles précédemment rapportées en Afrique de l'Ouest à l'exception du Mali (Moulds et al., 2000; Zimmerman et al., 2003). La fréquence de l'allèle *KN*06* est supérieure ou égale à 0,25 dans la moitié des groupes ethniques allant de 0,13 pour les pygmées Mbuti Bantu jusqu'à 0,40 pour les Peulhs. L'allèle *KN*07* montre également une large gamme de fréquences de 0,96 pour les pygmoïdes Tswas à 0,53 pour les pygmoïdes Biakas. Les génotypes hétérozygotes associés *KN*03/*06* et *KN*04/*07* sont observés au total chez 71 individus (14,76%) incluant 20 Dogons, 16 Peulhs, 11 Akwas, 5 Mbochis, 4 Kuyus, 4 Yorubas, 1 Bantou, 1 Mandenka et 9 pygmoïdes soit 5 Biakas, 2 Mbutis et 2 Tswas.

La grande diversité des phénotypes Knops en Afrique subsaharienne pourrait résulter d'une pression sélective *via* les régions impaludées d'où vivent les populations. À l'appui de cette hypothèse, les individus de génotype *KN*07/*07* qui confère le phénotype Sla⁻, Vil⁺, montrent une sensibilité réduite à la forme cérébrale du paludisme (Thathy et al., 2005). De même, les individus de génotypes hétérozygotes *KN*03/*06* sont plus résistants à l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* (BK, bacille de Koch) (Noumsi et al., 2011). Ces adaptations pourraient expliquer en partie la forte prévalence de l'allèle *KN*07*, et dans une moindre mesure, de l'allèle *KN*06* dans ces régions endémiques. Parallèlement, les anticorps du système Knops sont rares et non pertinents en l'absence de cas clinique rapporté. Cependant, les fréquences élevées des allèles *KN*06* et *KN*07* chez les individus d'Afrique subsaharienne soulignent le risque élevé d'allo-immunisation des Africains vivant en Europe.

Analyse statistique globale

L'analyse statistique a révélé que seules les fréquences moyennes des allèles Dombrock et *KN*04/KN*07* observées pour les pygmoïdes diffèrent de celles des non-pygmoïdes ($P=0,003$ et $P=0,042$, respectivement, Tableau III de l'article). Pour les non-pygmoïdes, une distribution homogène des allèles est mise en évidence lorsque l'on compare les fréquences de chaque allèle en Afrique sub-saharienne de l'Est, du Centre et de l'Ouest aux fréquences moyennes des non-pygmoïdes. À l'opposé, les trois groupes pygmoïdes affichent clairement une hétérogénéité (voir Tableaux II et III de l'article) : (i) les fréquences des allèles Dombrock diffèrent entre les pygmoïdes Mbutis et le groupe pygmoïde ($P=0,042$) et (ii) les fréquences des allèles *KN*04/*07* diffèrent entre les pygmoïdes Tswas et Biakas et le groupe pygmoïde ($P=0,0001$ et $0,009$, respectivement).

Conclusion

Il s'agit de la première évaluation des allèles constituant les systèmes Colton, Dombrock, Scianna, Luthéran, Diego, Landsteiner-Wiener, Cartwright, Knops et Cromer au sein de populations de l'Afrique subsaharienne incluant des populations pygmoïdes et non-pygmoïdes. Cette étude souligne une fois de plus la nécessité de rechercher les allèles *DO*02.-04* et *DO*01.-05* codant respectivement pour le phénotype Holley-négatif et Joseph-négatif chez les personnes originaire d'Afrique. Parallèlement, les résultats concernant les systèmes Luthéran, Cromer et Knops indiquent que certains groupes Africains sont plus à

risque pour développer des allo-anticorps. Bien que ces allo-anticorps ne semblent pas cliniquement relevant, ils peuvent néanmoins masquer d'autres allo-anticorps dangereux.

Globalement, les résultats de génotypage distinguent clairement les populations d'Afrique de celles d'Europe et illustrent l'hétérogénéité génétique des groupes ethniques de l'Afrique subsaharienne en termes de fréquence allélique. Une implication directe de ceci est que l'origine ethnique est plus pertinente que l'origine géographique pour prédire lequel des antigènes de haute fréquence est susceptible d'être absent.

Ce constat est important pour optimiser la transfusion en Afrique ainsi que dans les pays européens accueillant des populations migrantes en particulier originaires d'Afrique subsaharienne. Enfin, il peut être utile pour le dépistage de donneurs de phénotype négatif nécessaire à l'identification des spécificités des allo-anticorps sériques de patients comme par exemple des anti-Lu^b, -Co^b, -Hy, -Jo^a et -Cr^a.

Synthèse et perspectives

A/ Diversité génétique

1/ Chez les donneurs de Bamako, Mali

Les données de la cohorte de 300 donneurs volontaires et bénévoles de Bamako ont été analysées. La tranche d'âge de 18 à 35 ans est majoritaire (57%) et les donneurs masculins sont les plus nombreux (96,6%). La répartition des dons révèle que 90% des donneurs ont effectué plus de 5 dons ; cette fidélisation semble liée au profil socioéconomique des donneurs et 44,9% d'entre eux ont un niveau d'éducation qui leur permet d'assurer des professions telles qu'enseignant incluant les étudiants, commerçant et chauffeur.

Etant donné que près de 50% de la population malienne a moins de 15 ans avec un taux de scolarité primaire de 88%, cela révèle qu'il existe bien au Mali un réservoir de donneurs qu'il s'agira de sensibiliser au don anonyme et bénévole pour l'approvisionnement en produits sanguins.

La détermination du phénotype déduit à partir du génotypage des systèmes érythrocytaires RhCE, Kell, MNS, Kidd, Dombrock et plaquettaire HPA-1 montre que 59,3% des donneurs, soit 178 expriment un antigène de basse fréquence dont certains sont fortement immunogènes pour le receveur. On citera pour mémoire les antigènes K, Js(a), HPA(b) et RH54. Parallèlement, 47 donneurs, soit 15,6% de la cohorte étudiée, n'expriment pas un antigène de haute fréquence. A titre d'exemple, nous avons identifié un individu de génotype rare homozygote pour l'haplotype *(C)ces type 1* associé à l'absence des antigènes de haute fréquence RH31(hr^B) et RH34(Hr^B) et l'expression des antigènes de basse fréquence RH20(VS) et RH42 ainsi que l'expression partielle des antigènes C, c et e.

Cette étude confirme l'efficacité de la stratégie du génotypage multiplex incluant des polymorphismes d'appel pour l'identification des donneurs rares, qui permet d'accéder aux phénotypes déduits des prélèvements. Une corrélation de 99,3% a été observée entre le phénotype étendu (RhCcEe, K, S/s, Jka/b et Fya/b) déduit du génotype et l'analyse phénotypique qui utilise la technique d'agglutination en gel, ce qui démontre une bonne maîtrise technique de réalisation et d'interprétation des résultats par les techniciens du CNTS de Bamako.

2/ Chez les Dogons et les Peulhs de la région de Mopti

Dans un second volet, l'exploration du système RH qui est l'un des plus polymorphes et des plus immunogènes, a été réalisée à partir de deux groupes ethniques les Dogons et les Peulhs qui sont groupés principalement dans la région de Mopti. Les Dogons, ou Hambés occupent la région nommée "Pays Dogon" qui va de la falaise de Bandiagara au sud-ouest de la boucle du Niger. Les Peulhs ou Foulbés sont surtout concentrés à l'intérieur de la boucle du Niger, dans les cercles de Mopti.

Nos résultats mettent clairement en évidence que la diversité génétique à travers la diversité allélique et les fréquences de certains allèles *RH* sont fonction de l'ethnicité selon : (i) une faible fréquence de l'allèle *RHD*DAU0* chez les Peulhs (0,076) comparée à la fréquence observée chez les Dogons (0,217-0,247) et les autres cohortes d'individus originaire de l'Afrique subsaharienne déjà étudiées (0,164-0,261) (Granier et al., 2013), (ii) l'absence de l'allèle hybride *RHCE*Ce-(D4)-Ce* chez les Dogons alors que la fréquence reste élevée chez les Peulhs (0,195), et (iii) le caractère antigénique Rh partiel toutes spécificités confondues (D,C,c,E,e), est plus élevé chez les Peulhs que chez les Dogons (32,6% *versus* 13,8%). Ceci est en relation directe avec une plus grande diversité allélique chez les Peulhs que chez les Dogons.

3/ En Afrique subsaharienne d'Est en Ouest

Dans un troisième volet, l'exploration des allèles codant pour les antigènes de haute et basse fréquence des systèmes Colton, Dombrock, Scianna, Luthéran, Diégo, Landsteiner-Wiener, Knops et Cromer, a été réalisée pour la première fois à partir de 11 groupes ethniques (8 groupes non-pygmoïdes et 3 groupes pygmoïdes) répartis d'Est en Ouest de l'Afrique subsaharienne.

L'analyse statistique des résultats a révélé que seules les fréquences moyennes des allèles Dombrock et *KN*04/KN*07* observées chez les pygmoïdes diffèrent significativement de celles des non-pygmoïdes ($P=0,003$ et $P=0,042$, respectivement). Pour les 8 groupes non-pygmoïdes, une distribution homogène des allèles est mise en évidence lorsque l'on compare les fréquences de chaque allèle en Afrique sub-saharienne de l'Est, du Centre et de l'Ouest par rapport aux fréquences moyennes des non-pygmoïdes. A l'opposé, les 3 groupes pygmoïdes affichent clairement une hétérogénéité : (i) les fréquences des allèles Dombrock diffèrent entre les pygmoïdes Mbutis et le groupe pygmoïde ($P=0,042$) et (ii) les fréquences

des allèles *KN*04/*07* diffèrent entre les pygmoïdes Tswas et Biakas et le groupe pygmoïde ($P=0,0001$ et $0,009$, respectivement).

Parallèlement, nos résultats concernant les systèmes Dombrock, Luthéran, Cromer et Knops mettent en évidence que certains groupes Africains sont plus à risque pour développer des allo-anticorps.

Globalement, l'ensemble des résultats est un autre exemple d'étude qui distingue clairement les populations d'Afrique subsaharienne de celles d'Europe par des différences de fréquences des allèles définissant la diversité génétique d'une population par rapport à une autre.

Une conséquence directe de cette recherche est que la connaissance de l'origine ethnique est plus pertinente que l'origine géographique pour optimiser la transfusion en Afrique et dans les pays européens accueillant des populations d'Afrique subsaharienne. L'exemple le plus flagrant est l'allèle hybride *RHCE*Ce-(D4)-Ce* à la base d'un phénotype rare RH:32, -46 qui prédomine chez les Peulhs alors qu'il est absent chez les Dogons.

B/ L'Afrique subsaharienne

Selon les organisations de coopération de développement et financières (banques), la situation économique de l'Afrique subsaharienne reste stagnante. Ceci résulte le plus souvent de la défaillance du système financier, conduisant à un retrait de l'État de ses fonctions régaliennes. Parallèlement, l'ethnicité composante problématique phare du continent Africain est aujourd'hui source de crise à l'échelle nationale étatique et internationale. Beaucoup de pays africains s'efforcent à résoudre les questions relatives à l'identité ethnique et à la nationalité afin d'assurer un développement égal de toutes les communautés. Il est cependant difficile de combler le retard économique, social, démocratique et culturel sans dépasser la problématique de l'identité ethnique qui a été exacerbée dans le passé par le régime colonial. Ainsi, ces dix dernières années, le nombre de mal nourris a augmenté et on enregistre le plus fort taux de mortalité infantile dû à la malnutrition et aux maladies. Les personnes pauvres n'ont pas les moyens de se sortir de leur statut de pauvreté. Or pour améliorer leur bien-être, il suffit d'accroître leur productivité en investissant dans leur éducation et leur état de santé. Ainsi, bon nombre de pays d'Afrique ont opté pour l'accès à l'eau potable, l'assainissement, les soins primaires de

santé *via* des campagnes de vaccination et des initiatives pour une maternité sans risque sans oublier l'éducation de leur jeunesse.

Le développement africain est également confronté aux turbulences technologiques (technique, média-image, financier) et idéologiques (idéologie, mobilités transfrontières) mondiales qui transgressent les territoires, les frontières et les continents. Si ces turbulences mondiales ne conduisent pas nécessairement à la disparition des distinctions ethniques qui peuvent se maintenir au-delà des frontières et des échanges interethniques, elles peuvent par contre concourir à aggraver les déséquilibres existants, entraver le développement et augmenter le niveau de pauvreté. Ce qui est malheureusement le cas en Afrique subsaharienne entraînant une marginalisation des populations.

À ces constats, il faut y associer certaines avancées indéniables dans la gestion de sa démographie qui augmente de façon exponentielle, et des progrès quoique encore fragiles, vers la démocratisation. Cependant, l'Afrique subsaharienne se trouve confrontée à d'énormes défis internes liés aux fluctuations de l'économie mondiale. Ainsi, la baisse des budgets sociaux qui étaient la conséquence des programmes d'ajustement structurels imposés par la Banque Mondiale, a contribué à la paupérisation du budget alloué aux services de santé de base, par conséquent l'absence de développement des services de santé de proximité en particulier vers les populations rurales. Une question pourrait être de savoir si les Africains parviendront à amorcer le développement sans oublier leur culture et si les jeunes générations feront le choix délibéré de rester au pays et œuvrer pour l'intérêt général. Quelques pays de l'Afrique subsaharienne comme le Sénégal, le Burkina Faso, la Namibie et le Ghana sont sur une voie ascendante.

Quant au Mali, il est un pays en voie de développement avec un faible niveau de revenu et un taux élevé de pauvreté et même parfois d'extrême pauvreté. Les indicateurs de santé restent préoccupants au regard d'importantes disparités existant entre le milieu urbain et rural, les régions et les groupes socioéconomiques. La surmortalité des populations rurales et des groupes les plus pauvres reste avant tout due à des affections évitables par une prévention efficace de santé qui n'est toujours pas mise en place. Un exemple emblématique est la transfusion sanguine qui peine à se développer en l'absence de réelle politique de développement et d'un faible engagement de l'Etat pour en faire une priorité nationale.

C/ La transfusion sanguine en Afrique subsaharienne et au Mali

En Afrique subsaharienne beaucoup reste à faire pour la transfusion sanguine dans un contexte de ressources limitées notamment pour l'adoption d'une politique transfusionnelle claire et rationnelle avec un maillage territorial en équation avec les structures hospitalières, l'approvisionnement correct en produits sanguins, l'assurance de la sécurité infectieuse, la compatibilité immunohématologique et l'hémovigilance.

La transfusion sanguine des pays d'Afrique subsaharienne fait aujourd'hui face à des défis majeurs et multiples.

Le premier d'entre eux est le contexte épidémiologique qui est marqué par une plus grande prévalence des pathologies héréditaires du globule rouge comme la drépanocytose, la β -thalassémie et le déficit en G6PG, les malnutritions, les anémies, les maladies infectieuses (paludisme, VIH, VHB, VHC, tuberculose, maladie de Chagas, leishmaniose, dengue, syphilisetc) et les accidents obstétricaux. Ainsi, le paludisme est une des causes principales de la mortalité infantile en Afrique, et représente une des infections majeures de transmissibilité transfusionnelle. Cependant, l'approvisionnement insuffisant en produit sanguin sur le continent rend problématique l'identification et l'exclusion des donneurs parasitémiques. Pour les infections VIH, VHB et VHC, si de nets progrès ont été réalisés pour sécuriser les produits sanguins, la situation n'en reste pas moins préoccupante avec près d'un adulte sur 20 infecté par le VIH et un adulte sur 10 infecté par le VHC. Parallèlement, la proportion de la population adulte chroniquement infectée par le VHB est comprise entre 10 et 20%. La tuberculose représente de nos jours un problème majeur de santé publique en Afrique subsaharienne qui a été aggravé par une longue négligence des autorités sanitaires mais aussi par l'accroissement de la pauvreté qui est en forte progression dans cette partie du monde. L'incidence estimée de la tuberculose contagieuse en Afrique subsaharienne est de 149 cas pour 100 000 habitants soit 2,5 l'incidence mondiale. Inéluctablement, le nombre des infections va augmenter dans les prochaines décennies. En effet, l'immunodépression induite par le VIH est un facteur aggravant de co-infections dans un contexte épidémiologique multiple, une paupérisation des services de santé et une démographie galopante et une pauvreté croissante.

Sur un autre plan, le risque de mortalité est de 1 sur 30 pour les femmes enceintes en Afrique subsaharienne et plus d'un million d'enfants perdent leur mère chaque année en raison de manque de soins pendant la grossesse et à l'accouchement. Chaque année de

nombreuses femmes meurent pendant leur grossesse, de l'accouchement ou des suites de couches. Cette mortalité est en partie liée à la relation entre le mauvais comportement du personnel de santé et les femmes enceintes, l'incompétence du personnel, la gestion inadéquate des ressources, la pauvreté, et très souvent, le manque de disponibilité de produits sanguins en cas de transfusion en urgence. Parallèlement, les anémies hémolytiques néo-natales sont d'observation courante dans les services de maternité, de néonatalogie et de pédiatrie. L'incompatibilité foeto-maternelle (IFM) constitue l'une des causes majeures *via* deux étiologies dominantes : (i) l'immunisation de la mère de phénotype RhD-négatif contre le foetus de phénotype RhD-positif en l'absence de prophylaxie systématique réservée aux pays développés, et (ii) les grossesses incompatibles dans le système ABO. Il faut également souligner que la transfusion des populations de l'Afrique subsaharienne est complexifiée par une plus grande diversité allélique comparée à celle des pays d'Europe : entre autre à l'absence d'expression d'antigènes de haute fréquence dits "antigènes publics", l'expression d'antigènes de basse fréquence dits "antigènes privés" et l'expression d'antigènes partiels en particulier pour le système RH.

Le second défi est institutionnel *via* l'État pour un recentrage sur le développement sanitaire et social à travers un maillage territorial de la transfusion s'appuyant sur le "Centre National de la Transfusion Sanguine" (CNTS) associé à des centres périphériques de collectes. Si aujourd'hui un certain nombre d'États ont mis en place une structure type CNTS comme au Mali, principalement implanté dans leur capitale, l'implantation des centres périphériques est quasiment inexistante tout comme les collectes mobiles. Les CNTS existants fonctionnent en grande partie avec du personnel sous qualifié, montrant systématiquement des carences dans la gestion administrative, la gestion des ressources humaines et financières, la maintenance des équipements, et la formation du personnel de laboratoire. L'absence de procédure écrite et d'hémovigilance à la base de la sécurité transfusionnelle est monnaie courante. Se rajoute la rareté de ressources avec des affectations finales parfois inadaptées au regard de la situation sur le terrain.

Le troisième défi concerne l'approvisionnement correct en produits sanguins et l'assurance de la sécurisation immunologique et virologique. Aujourd'hui, l'analyse et la compréhension des particularités du donneur de sang de l'Afrique subsaharienne (donneur

de compensation ou familial) sont absentes alors qu'elles sont essentielles à une planification et une organisation optimales de l'approvisionnement en sang, à la gestion des stocks de produits sanguins, aux stratégies de leur préparation et de leur qualification biologique. Parallèlement, les leviers de sensibilisation et d'éducation des donneurs de sang ne sont pas actionnés en amont au niveau de l'éducation de sa jeunesse pour tendre vers une autosuffisance en produits sanguins. Enfin, le dialogue entre le CNTS, le producteur des produits sanguins, et les hôpitaux utilisateurs, est rarement effectif.

En résumé, le triptyque défini par le contexte du facies épidémiologique de l'Afrique subsaharienne, les caractéristiques socio-culturelles des donneurs pour l'approvisionnement en produits sanguins et l'engagement politique et financier des États lié au contexte démographique et de pauvreté croissante, impose d'identifier au plus vite des stratégies fortes afin de développer rapidement la transfusion. C'est un élément de la couverture sanitaire qui est un levier puissant du bien-être des populations, du dynamisme interne d'un pays et par surcroît de son développement interne et international.

D/ Perspectives stratégiques pour la transfusion sanguine au Mali

La mise en place de toute stratégie de développement d'une activité passe d'abord obligatoirement par un état des lieux de la situation sur le terrain *via* des auditeurs indépendants et compétents dans le domaine afin de fixer des objectifs et des options stratégiques réalisables en fonction du contexte local et des acteurs. Dans le cadre de la présente situation, le développement de la transfusion au Mali passera nécessairement par des partenariats internationaux (le cas du Burkina Faso et la Belgique). Pour le cas du Mali, le CNTS de Bamako a un grand besoin d'appuis de partenaires extérieurs pour assurer sa phase de développement ; il suffit de faire le bilan des 10 dernières années pour s'en rendre compte. La satisfaction de ce besoin obligera l'État malien à planifier une demande sous forme d'un programme de collaboration partenariale. Cette demande permettra d'atteindre les objectifs prioritaires définis. Et, pour ce faire l'Etat doit devenir l'acteur principal d'une "dynamique transfusionnelle du dedans pour la santé de tous". Cela implique aujourd'hui, une évolution forte de l'Etat malien et des structures sociales vers certainement des changements structurels internes, afin de cadrer le rôle, l'engagement et la responsabilité de tous les acteurs au sein d'une synergie commune de résultat. En l'absence de telles

dispositions, toute tentative isolée ou en partenariat pourra difficilement aboutir à travers des logiques accumulatives diverses.

Dès à présent, des orientations stratégiques tenant compte du contexte local peuvent être identifiées.

- Mener des actions spécifiques en termes de sensibilisation et mobilisation pour recruter et fidéliser un maximum de donateurs bénévoles, soutenues par des politiques de mise à disposition d'un budget spécifique autonome. Les premières cibles pourraient être l'armée, les universités et les grands bassins industriels du pays.
- Mener des actions de mise en place d'une sensibilisation sur le don du sang dans les établissements scolaires à tous les niveaux (primaires, secondaires et universitaires) afin d'inculquer la culture du don de sang au sein de la population. Ainsi, en une ou deux générations, l'approvisionnement en sang à travers des donateurs bénévoles et volontaires devrait être fortement augmenté.

Parallèlement, développer par étape le maillage territorial de la transfusion à travers l'implantation de structures périphériques légères voire mobiles sachant qu'au Mali, on note l'un des plus faibles taux de collectes mobile (13%) (Tagny et al., 2009). En première action, on peut aussi positionner le bus de prélèvement fourni par l'association de la *Fraternité Malienne* en PACA au sein des universités ou des principales casernes pour sensibiliser et solliciter leurs populations. À terme, le développement de centres polyvalents de soins et de prélèvements serait un objectif ambitieux et très bénéfique à la fois pour les populations de proximité mais aussi à l'approvisionnement en produit sanguin.

Au sein du CNTS de Bamako, comme dans de nombreux CNTS de l'Afrique subsaharienne, un manque criant de formation du personnel fait jour à tous les niveaux administratif, logistique et opérationnel. Pour renverser cette tendance, il est urgent de mettre en place un projet de coopération avec un tuteur international (type Croix Rouge Belge, Établissement Français du Sang ou transfrontalière) pour réaliser un réel plan de formation du personnel à tous les niveaux pour améliorer le dispositif transfusionnel actuel. Par exemple, une action de coopération transfrontalière avec la Côte d'Ivoire pourra également être envisagée afin de bénéficier de leurs programmes de formation en transfusion à moindre coût. Pour cet objectif de formation prioritaire, le budget de la

recherche pourrait être mobilisé pour son financement, sachant qu'au regard de la situation actuelle, la recherche n'est pas une priorité en soit dans le contexte sanitaire du pays.

Une fois cette étape franchie, il faudra mettre en place le système d'hémovigilance (HV) qui est le levier par excellence pour améliorer les trois axes clefs de la sécurité transfusionnelle qui sont le receveur, le donneur et les processus le long de la chaîne transfusionnelle. Une première étape se concrétisera par la mise en place d'une fiche post-transfusionnelle d'HV qui a pour but non seulement d'améliorer la sécurité transfusionnelle mais aussi de créer un canal d'échange entre le CNTS et les unités de soins (hôpitaux, CSRef, cliniques...etc) principaux utilisateurs des produits sanguins. Ce canal d'échange fait cruellement défaut à ce jour. Parallèlement, la fiche post-transfusionnelle d'HV sera accompagnée d'un programme de formation du personnel médical pour son utilisation couplé avec une formation en matière de transfusion. En effet, en 2012 près de 71 % du personnel soignant toute catégorie confondue n'avait pas reçu de formation en transfusion sanguine. Un tel dispositif devrait permettre une meilleure gestion des ressources en unités de sang, une diminution des risques encourus par les patients et éliminer certaines pratiques non conventionnelles au sein des établissements hospitaliers. De surcroît, le lien entre cliniciens hospitaliers et biologistes de la transfusion devrait permettre d'assurer de façon concertée une surveillance spécifique des grossesses compliquées d'allo-immunisations à risque de retentissement foetal.

Dans le cadre des infections transmissibles par transfusion (ITT), toutes les unités de sang du CNTS de Bamako sont testées depuis 2004, pour le VIH, les virus des hépatites B et C, et la syphilis (Diarra et al., 2009). À ce niveau, des efforts n'en doivent pas moins être poursuivis sur l'évolution des techniques de dépistages (sensibilité et spécificité), hors dépistage génomique viral (DGV), tout en demeurant financièrement accessibles au budget de la transfusion. Néanmoins, des contrôles de qualité doivent être mis en place pour mesurer l'efficacité de ces tests et leur bonne mise en pratique par le personnel technique. Sur un autre volet biologique, l'absence de dépistage de l'anémie qui est fréquente chez l'Africain, expose souvent à un risque hémodynamique chez le donneur et à une transfusion peu efficace chez le receveur. Sur la même ligne, le trait drépanocytaire, le déficit en G6PD et le paludisme ne sont pas détectés soit pour des raisons budgétaires comme pour les 2 premiers soit pour une prévalence très élevée qui exclurait la quasi totalité des poches. Actuellement, la transmission du paludisme par la transfusion peut être diminuée en partie

par un traitement préventif du receveur avec des antipaludiques. Dans l'avenir, on peut imaginer une destruction *in situ* dans la poche de prélèvement *via* un additif actif contre le parasite. Parallèlement, il ne faut pas négliger le volet préventif dans la lutte contre le paludisme à savoir l'élimination des facteurs environnementaux favorables au développement des anophèles femelles, vectrices de la maladie et renforcer la construction du savoir populaire pour lutter contre le paludisme.

Au CNTS de Bamako, comme dans les autres CNTS, la collecte de sang est presque exclusivement du sang total destiné à être transfusé tel quel. Ceci montre clairement que la production de PSL appelée à remplacer la transfusion de sang total souffre encore d'un défaut d'équipement et de savoir faire technique qui renvoient une fois de plus aux limites financières et à la formation du personnel.

Ces différents points n'en restent pas moins des objectifs clefs pour le futur de la transfusion malienne dans un contexte complexe difficile avec un environnement épidémiologique particulier, aux limites financières et aux contraintes culturelles importante.

En collaboration avec l'EFSAM et l'unité des virus émergents (UMR190) à Marseille, la poursuite des études sur la séroprévalence des arbovirus (virus en pleine expansion dans le monde) chez les donneurs de sang de Bamako (en cours) et l'épidémiologie moléculaire des virus majeurs permettront par la suite d'évaluer les risques et d'envisager des mesures de sélection des donneurs, des aspects de prévention et thérapeutique pour les virus majeurs.

Enfin, la sécurité immunologique au Mali peut être mieux améliorée à court terme par la mise en place du phénotypage Rh-K chez les donneurs de sang, et à long terme par le phénotypage étendu pour la recherche des antigènes des autres systèmes d'intérêt transfusionnel en particulier pour les patients drépanocytaires.

Références bibliographiques

- Akane, A., H. Mizukami, and H. Shiono, 2000, Classification of standard alleles of the MN blood group system: *Vox Sang*, v. 79, p. 183-7.
- Al Riyami, A. Z., M. Al Salmani, S. Al Hashami, S. Al Mahrooqi, S. Al Hinai, H. Al Balushi, N. Al Riyami, V. Gowri, T. Al Dughaihi, S. Al Hosni, M. Al-Khabori, K. Al-Farsi, M. Al Huneini, and S. Alkindi, 2014, Successful management of severe hemolytic disease of the fetus due to anti-Jsb using intrauterine transfusions with serial maternal blood donations: a case report and a review of the literature: *Transfusion*, v. 54, p. 238-43.
- Allen FH, D. L., Niedzela B., 1951, A new blood group antigen, *Nature*, p. 482.
- Arnoni, C. P., J. G. Muniz, T. A. de Paula, R. D. Person, D. Gazito, W. Baleotti, J. A. Barreto, L. Castilho, and F. R. Latini, 2013, An easy and efficient strategy for KEL genotyping in a multiethnic population: *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 35, p. 99-102.
- Atlas Jeune Afrique, I. M., Main ethnic groups / Groupes ethniques.
- Ba, A., S. Beley, J. Chiaroni, P. Bailly, and M. Silvy, in press, RH diversity in Mali: characterization of a new haplotype RHD*DIVa/RHCE*ceTI(D2): *Transfusion*.
- Badjie, K. S., C. D. Tauscher, C. M. van Buskirk, C. Wong, S. M. Jenkins, C. Y. Smith, and J. R. Stubbs, 2011, Red blood cell phenotype matching for various ethnic groups: *Immunohematology*, v. 27, p. 12-9.
- Bakanay, S. M., A. Ozturk, T. Ileri, E. Ince, S. Yavasoglu, N. Akar, Z. Uysal, and O. Arslan, 2013, Blood group genotyping in multi-transfused patients: *Transfus Apher Sci*, v. 48, p. 257-61.
- Baleotti, W., M. Rios, M. E. Reid, G. Hashmi, A. Fabron, J. Pellegrino, and L. Castilho, 2006, Dombrock gene analysis in Brazilian people reveals novel alleles: *Vox Sang*, v. 91, p. 81-7.
- Baleotti, W., R. B. Suzuki, M. Polotto, M. O. Ruiz, A. Fabron, and L. Castilho, 2011, A PCR-based strategy for Dombrock screening in Brazilian blood donors reveals a novel allele: the DO* A-WL: *J Clin Lab Anal*, v. 25, p. 79-82.
- Bansal, I., H. R. Jeon, S. R. Hui, B. W. Calhoun, D. W. Manning, T. J. Kelly, S. Lee, and B. W. Baron, 2008, Transfusion support for a patient with McLeod phenotype without chronic granulomatous disease and with antibodies to Kx and Km: *Vox Sang*, v. 94, p. 216-20.
- Beattie, K. M., and S. Castillo, 1975, A case report of a hemolytic transfusion reaction caused by anti-Holley: *Transfusion*, v. 15, p. 476-80.
- Blumenfeld, O. O., and A. M. Adamany, 1978, Structural polymorphism within the amino-terminal region of MM, NN, and MN glycoproteins (glycophorins) of the human erythrocyte membrane: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 75, p. 2727-31.
- Blumenfeld, O. O., A. J. Smith, and J. J. Moulds, 1987, Membrane glycoproteins of Dantu blood group erythrocytes: *J Biol Chem*, v. 262, p. 11864-70.
- Buchanan, D. I., M. Sinclair, R. Sanger, J. Gavin, and P. Teesdale, 1976, An Alberta Cree Indian with a rare Duffy antibody, anti-Fy 3: *Vox Sang*, v. 30, p. 114-21.
- Byrne, K. M., and P. C. Byrne, 2004, Review: other blood group systems--Diego, Yt, Xg, Scianna, Dombrock, Colton, Landsteiner-Wiener, and Indian: *Immunohematology*, v. 20, p. 50-8.
- Byrne, P. C., and J. H. Howard, 1994, The incidence of V (Rh10) and Jsa (K6) in the contemporary African American blood donor: *Immunohematology*, v. 10, p. 136-7.

- Camara-Clayette, V., D. Thomas, C. Rahuel, R. Barbey, J. P. Cartron, and O. Bertrand, 1999, The repressor which binds the -75 GATA motif of the GPB promoter contains Ku70 as the DNA binding subunit: *Nucleic Acids Res*, v. 27, p. 1656-63.
- Carritt, B., T. J. Kemp, and M. Poulter, 1997, Evolution of the human RH (rhesus) blood group genes: a 50 year old prediction (partially) fulfilled: *Hum Mol Genet*, v. 6, p. 843-50.
- Castilho, L., W. Baleotti, E. Tossas, K. Hue-Roye, K. R. Ribeiro, C. Lomas-Francis, D. Charles-Pierre, and M. E. Reid, 2008, Molecular studies of DO alleles reveal that JO is more prevalent than HY in Brazil, whereas HY is more prevalent in New York: *Immunohematology*, v. 24, p. 135-7.
- Castro, O., S. G. Sandler, P. Houston-Yu, and S. Rana, 2002, Predicting the effect of transfusing only phenotype-matched RBCs to patients with sickle cell disease: theoretical and practical implications: *Transfusion*, v. 42, p. 684-90.
- Chapel-Fernandes, S., I. Callebaut, G. R. Halverson, M. E. Reid, P. Bailly, and J. Chiaroni, 2009, Dombrock genotyping in a native Congolese cohort reveals two novel alleles: *Transfusion*, v. 49, p. 1661-71.
- Chaudhuri, A., S. Nielsen, M. L. Elkjaer, V. Zbrzezna, F. Fang, and A. O. Pogo, 1997, Detection of Duffy antigen in the plasma membranes and caveolae of vascular endothelial and epithelial cells of nonerythroid organs: *Blood*, v. 89, p. 701-12.
- Chaudhuri, A., J. Polyakova, V. Zbrzezna, and A. O. Pogo, 1995, The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals: *Blood*, v. 85, p. 615-21.
- Chiaroni J, F. V., Dettori I, Roubinet F., 2005, Groupes sanguins érythrocytaires. , *EMC*.
- Chou, S. T., T. Jackson, S. Vege, K. Smith-Whitley, D. F. Friedman, and C. M. Westhoff, 2013a, High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors: *Blood*, v. 122, p. 1062-71.
- Chou, S. T., T. Jackson, S. Vege, K. Smith-Whitley, D. F. Friedman, and C. M. Westhoff, 2013b, High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors: *Blood*.
- Chown, B., M. Lewis, and H. Kaita, 1965, The Kidd blood group system in caucasians: *Transfusion*, v. 5, p. 506-7.
- Clapéron, A., C. Rose, P. Gane, E. Collec, O. Bertrand, and T. Ouimet, 2005, The Kell protein of the common K2 phenotype is a catalytically active metalloprotease, whereas the rare Kell K1 antigen is inactive. Identification of novel substrates for the Kell protein: *J Biol Chem*, v. 280, p. 21272-83.
- Colin, Y., B. Chérif-Zahar, C. Le Van Kim, V. Raynal, V. Van Huffel, and J. P. Cartron, 1991, Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis: *Blood*, v. 78, p. 2747-52.
- Contreras, M., C. Green, J. Humphreys, P. Tippett, G. Daniels, P. Teesdale, S. Armitage, and A. Lubenko, 1984, Serology and genetics of an MNSs-associated antigen Dantu: *Vox Sang*, v. 46, p. 377-86.
- Costa, F. P., K. Hue-Roye, L. Sausais, R. W. Velliquette, E. Da Costa Ferreira, C. Lomas-Francis, and M. E. Reid, 2010, Absence of DOMR, a new antigen in the Dombrock blood group system that weakens expression of Do(b) , Gy(a) , Hy, Jo(a) , and DOYA antigens: *Transfusion*, v. 50, p. 2026-31.

- Costamagna, L., M. Barbarini, G. L. Viarengo, A. Pagani, D. Isernia, and L. Salvaneschi, 1997, A case of hemolytic disease of the newborn due to anti-Kpa: *Immunohematology*, v. 13, p. 61-2.
- Dahr, W., K. Beyreuther, H. Steinbach, W. Gielen, and J. Krüger, 1980, Structure of the Ss blood group antigens, II: a methionine/threonine polymorphism within the N-terminal sequence of the Ss glycoprotein: *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, v. 361, p. 895-906.
- Dahr W , M. J., Unger P , Blanchard D , Cartron JP, 1986, Serological and biochemical investigations on the N.E. variety of the Dantu red cell phenotype . In: Brinkmann B , Henningsen K , eds. , p. 3-7.
- Daniels, G., ed., 2013a, Human blood groups.
- Daniels, G., 2013b, Human Blood Groups., Oxfor: Blackwell Science Ltd.
- Daniels, G., A. Hadley, and C. A. Green, 2003, Causes of fetal anemia in hemolytic disease due to anti-K: *Transfusion*, v. 43, p. 115-6.
- DAY, D., H. A. PERKINS, and B. SAMS, 1965, THE MINUS-MINUS PHENOTYPE IN THE KIDD SYSTEM: *Transfusion*, v. 5, p. 315-9.
- de Coulgeans, C. D., M. Silvy, G. Halverson, J. Chiaroni, P. Bailly, and S. Chapel-Fernandes, 2014, Synonymous nucleotide polymorphisms influence Dombrock blood group protein expression in K562 cells: *Br J Haematol*, v. 164, p. 131-41.
- DEGNAN, T. J., and R. E. ROSENFELD, 1965, HEMOLYTIC TRANSFUSION REACTION ASSOCIATED WITH POORLY DETECTABLE ANTI-JKA: *Transfusion*, v. 5, p. 245-7.
- Di Cristofaro, J., M. Silvy, J. Chiaroni, and P. Bailly, 2010, Single PCR multiplex SNaPshot reaction for detection of eleven blood group nucleotide polymorphisms: optimization, validation, and one year of routine clinical use: *J Mol Diagn*, v. 12, p. 453-60.
- Diakit , M., S. I. Diawara, N. T. Tchogang, D. B. Fofana, S. A. Diakit , S. Doumbia, K. Traor , D. S. Konat , M. Doumbouya, A. S. Keita, A. Famanta, M. Baby, S. F. Traor , and A. Tounkara, 2012, [Knowledge and attitudes of medical personnel in blood transfusion in Bamako, Mali]: *Transfus Clin Biol*, v. 19, p. 74-7.
- Diarra, A., B. Kouriba, M. Baby, E. Murphy, and J. J. Lefrere, 2009, HIV, HCV, HBV and syphilis rate of positive donations among blood donations in Mali: lower rates among volunteer blood donors: *Transfus Clin Biol*, v. 16, p. 444-7.
- DNS., 2008., Politique nationale de transfusion sanguine au Mali., Bamako: minist re de la Sant  ;
- Donovan, L. M., K. L. Tripp, J. E. Zuckerman, and A. A. Konugres, 1973, Hemolytic disease of the newborn due to anti-Js a: *Transfusion*, v. 13, p. 153.
- Durousseau de Coulgeans, C., J. Chiaroni, P. Bailly, and S. Chapel-Fernandes, 2015, Sequencing of the art4 gene in sub-Saharan cohorts reveals ethnic differences and two new DO alleles: DO*B-Ile5Thr and DO*B-Trp266Arg: *Transfusion*.
- Ellisor, S. S., M. E. Reid, T. O'Day, J. Swanson, L. Papenfus, and D. R. Avoy, 1983, Autoantibodies mimicking anti-Jkb plus anti-Jk3 associated with autoimmune hemolytic anemia in a primipara who delivered an unaffected infant: *Vox Sang*, v. 45, p. 53-9.
- Estalote, A. C., R. Proto-Siqueira, W. A. Silva, M. A. Zago, and M. Palatnik, 2005, The mutation G298A-->Ala100Thr on the coding sequence of the Duffy antigen/chemokine receptor gene in non-caucasian Brazilians: *Genet Mol Res*, v. 4, p. 166-73.

- Faas, B. H., E. A. Beckers, P. Wildoer, P. C. Ligthart, M. A. Overbeeke, H. A. Zondervan, A. E. von dem Borne, and C. E. van der Schoot, 1997, Molecular background of VS and weak C expression in blacks: *Transfusion*, v. 37, p. 38-44.
- Faria, M. A., M. L. Martins, L. C. Schmidt, and M. C. Malta, 2012, Molecular analysis of the GYPB gene to infer S, s, and U phenotypes in an admixed population of Minas Gerais, Brazil: *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 34, p. 212-6.
- Fichou, Y., C. Le Maréchal, L. Bryckaert, C. Guerry, C. Bénech, I. Dupont, D. Jamet, C. Férec, and J. M. Chen, 2012, Variant screening of the RHD gene in a large cohort of subjects with D phenotype ambiguity: report of 17 novel rare alleles: *Transfusion*, v. 52, p. 759-64.
- Field, S. P., E. Hempelmann, B. V. Mendelow, and A. F. Fleming, 1994, Glycophorin variants and *Plasmodium falciparum*: protective effect of the Dantu phenotype in vitro: *Hum Genet*, v. 93, p. 148-50.
- Flegel, W. A., 2006, How I manage donors and patients with a weak D phenotype: *Curr Opin Hematol*, v. 13, p. 476-83.
- Flegel, W. A., I. von Zabern, A. Doescher, F. F. Wagner, K. P. Strathmann, C. Geisen, M. Palfi, M. Písacka, J. Poole, H. Polin, C. Gabriel, and N. D. Avent, 2009, D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian D clusters: *Transfusion*, v. 49, p. 1059-69.
- Flegel, W. A., and F. F. Wagner, 2014, Two molecular polymorphisms to detect the (C)ce(s) type 1 haplotype: *Blood Transfus*, v. 12, p. 136-7.
- Flickinger, C., 2006, In search of red blood cells for alloimmunized patients with sickle cell disease: *Immunohematology*, v. 22, p. 136-42.
- Flôres, M. A., J. E. Visentainer, G. A. Guelsin, A. e. S. Fracasso, F. C. de Melo, M. N. Hashimoto, and A. M. Sell, 2014, Rh, Kell, Duffy, Kidd and Diego blood group system polymorphism in Brazilian Japanese descendants: *Transfus Apher Sci*, v. 50, p. 123-8.
- Fukuda, M., 1993, Molecular genetics of the glycophorin A gene cluster: *Semin Hematol*, v. 30, p. 138-51.
- Furthmayr, H., 1978, Structural comparison of glycophorins and immunochemical analysis of genetic variants: *Nature*, v. 271, p. 519-24.
- Gammon, R. R., and N. D. Velasquez, 2002, An algorithm to locate hrB- donors for individuals with sickle cell disease: *Immunohematology*, v. 18, p. 82-4.
- Gassner, C., R. L. Kraus, T. Dovic, S. Kilga-Nogler, I. Utz, T. H. Mueller, F. Schunter, and D. Schoenitzer, 2000, Fyx is associated with two missense point mutations in its gene and can be detected by PCR-SSP: *Immunohematology*, v. 16, p. 61-7.
- GECZY, A., and M. ESLIE, 1961, Second example of hemolytic disease of the newborn caused by anti-Jk-b: *Transfusion*, v. 1, p. 125-7.
- Granier, T., S. Beley, J. Chiaroni, P. Bailly, and M. Silvy, 2013, A comprehensive survey of both RHD and RHCE allele frequencies in sub-Saharan Africa: *Transfusion*, v. 53, p. 3009-17.
- Grant, S. R., M. D. Kilby, L. Meer, J. B. Weaver, G. S. Gabra, and M. J. Whittle, 2000, The outcome of pregnancy in Kell alloimmunisation: *BJOG*, v. 107, p. 481-5.
- Greenwalt TJ, S. T., Sneath J., 1956, Haemolytic disease of the newborn caused by anti-Jka., *Vox Sang*, p. 157-60.
- Grootkerk-Tax, M. G., J. D. van Wintershoven, P. C. Ligthart, D. J. van Rhenen, C. E. van der Schoot, and P. A. Maaskant-van Wijk, 2006, RHD(T201R, F223V) cluster analysis in five different ethnic groups and serologic characterization of a new Ethiopian variant DARE, the DIII type 6, and the RHD(F223V): *Transfusion*, v. 46, p. 606-15.

- Gubin, A. N., J. M. Njoroge, U. Wojda, S. D. Pack, M. Rios, M. E. Reid, and J. L. Miller, 2000, Identification of the dombrock blood group glycoprotein as a polymorphic member of the ADP-ribosyltransferase gene family: *Blood*, v. 96, p. 2621-7.
- Guo, Z., C. Wang, K. Yan, J. Xie, W. Shen, Q. Li, J. Zhang, L. Ye, and Z. Zhu, 2013, The mutation spectrum of the JK-null phenotype in the Chinese population: *Transfusion*, v. 53, p. 545-53.
- Habibi, B., J. Avril, M. T. Fouillade, M. Lopez, R. Vaucelle, and C. Salmon, 1976, Jk(a-b-) phenotype in a French family. Quantitative evidence for the inheritance of a silent allele (Jk): *Haematologia (Budap)*, v. 10, p. 403-10.
- Habibi, B., M. T. Fouillade, I. Levanra, D. Beige, M. Federspiel, and C. Salmon, 1977, [Antigen Fyx: quantitative study of subjects FybFyx, FyaFyx and FyxFyx from two new families]: *Rev Fr Transfus Immunohematol*, v. 20, p. 427-38.
- Habibi, B., P. Perrier, and C. Salmon, 1980, HD50 assay evaluation of the antigen Fy3 depression in Fyx individuals: *J Immunogenet*, v. 7, p. 191-3.
- Hadley, T. J., and S. C. Peiper, 1997, From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen: *Blood*, v. 89, p. 3077-91.
- Halle, L., A. Bigot, G. Mullen-Imandy, K. M'Bayo, G. Jaeger, L. Anani, C. Martageix, F. Bianchi, E. Julien, and C. Kaplan, 2005, HPA polymorphism in sub-Saharan African populations: Beninese, Cameroonians, Congolese, and Pygmies: *Tissue Antigens*, v. 65, p. 295-8.
- Halverson, G., E. Shanahan, I. Santiago, R. Mabile, T. Thurrell, A. M. Strupp, C. F. Wolf, P. Spruell, and M. K. Moulds, 1994, The first reported case of anti-Dob causing an acute hemolytic transfusion reaction: *Vox Sang*, v. 66, p. 206-9.
- Hamblin, M. T., and A. Di Rienzo, 2000, Detection of the signature of natural selection in humans: evidence from the Duffy blood group locus: *Am J Hum Genet*, v. 66, p. 1669-79.
- Harrison, K. L., and E. I. Popper, 1981, Maternal Jka sensitization following amniocentesis and intrauterine transfusion: *Transfusion*, v. 21, p. 90-1.
- Hashmi, G., T. Shariff, M. Seul, P. Vissavajhala, K. Hue-Roye, D. Charles-Pierre, C. Lomas-Francis, A. Chaudhuri, and M. E. Reid, 2005, A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing: *Transfusion*, v. 45, p. 680-8.
- Hashmi, G., T. Shariff, Y. Zhang, J. Cristobal, C. Chau, M. Seul, P. Vissavajhala, C. Baldwin, K. Hue-Roye, D. Charles-Pierre, C. Lomas-Francis, and M. E. Reid, 2007, Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis: *Transfusion*, v. 47, p. 736-47.
- Hemker, M. B., P. C. Ligthart, L. Berger, D. J. van Rhenen, C. E. van der Schoot, and P. A. Wijk, 1999, DAR, a new RhD variant involving exons 4, 5, and 7, often in linkage with ceAR, a new Rhce variant frequently found in African blacks: *Blood*, v. 94, p. 4337-42.
- Hermand, P., P. Gane, M. G. Mattei, P. Sistonen, J. P. Cartron, and P. Bailly, 1995, Molecular basis and expression of the LWa/LWb blood group polymorphism: *Blood*, v. 86, p. 1590-4.
- Higgins, J. M., and S. R. Sloan, 2008, Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: evidence for a distinct population of immunologic responders: *Blood*, v. 112, p. 2546-53.
- Hipsky, C. H., C. Lomas-Francis, A. Fuchisawa, M. E. Reid, M. Moulds, J. Christensen, P. Nickle, S. Vege, and C. Westhoff, 2011, RHCE*ceCF encodes partial c and partial e but not CELO, an antigen antithetical to Crawford: *Transfusion*, v. 51, p. 25-31.

- Howes, R. E., A. P. Patil, F. B. Piel, O. A. Nyangiri, C. W. Kabaria, P. W. Gething, P. A. Zimmerman, C. Barnadas, C. M. Beall, A. Gebremedhin, D. Ménard, T. N. Williams, D. J. Weatherall, and S. I. Hay, 2011, The global distribution of the Duffy blood group: *Nat Commun*, v. 2, p. 266.
- Huang, C. H., and O. O. Blumenfeld, 1988, Characterization of a genomic hybrid specifying the human erythrocyte antigen Dantu: Dantu gene is duplicated and linked to a delta glycoporphin gene deletion: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 85, p. 9640-4.
- Huang, C. H., O. O. Blumenfeld, M. E. Reid, Y. Chen, G. L. Daniels, and E. Smart, 1997, Alternative splicing of a novel glycoporphin allele GPhE(GL) generates two protein isoforms in the human erythrocyte membrane: *Blood*, v. 90, p. 391-7.
- Huang, C. H., K. Johe, J. J. Moulds, P. D. Siebert, M. Fukuda, and O. O. Blumenfeld, 1987, Delta glycoporphin (glycoporphin B) gene deletion in two individuals homozygous for the S--s--U-- blood group phenotype: *Blood*, v. 70, p. 1830-5.
- Innan, H., 2003, A two-locus gene conversion model with selection and its application to the human RHCE and RHD genes: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, p. 8793-8.
- Issitt, P. D., G. Obarski, P. L. Hartnett, M. R. Wren, and P. L. Prewitt, 1990, Temporary suppression of Kidd system antigen expression accompanied by transient production of anti-Jk3: *Transfusion*, v. 30, p. 46-50.
- Iwamoto, S., J. Li, T. Omi, S. Ikemoto, and E. Kajii, 1996, Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium: *Blood*, v. 87, p. 378-85.
- Jeremiah, Z. A., and F. I. Buseri, 2003, Rh antigen and phenotype frequencies and probable genotypes for the four main ethnic groups in Port Harcourt, Nigeria: *Immunohematology*, v. 19, p. 86-8.
- Jeremiah, Z. A., and C. Odumody, 2005, Rh antigens and phenotype frequencies of the Ibibio, Efik, and Ibo ethnic nationalities in Calabar, Nigeria: *Immunohematology*, v. 21, p. 21-4.
- Judd, W. J., and E. A. Steiner, 1991, Multiple hemolytic transfusion reactions caused by anti-Doa: *Transfusion*, v. 31, p. 477-8.
- Jungbauer, C., 2011, Routine use of DNA testing for red cell antigens in blood centres: *Transfus Apher Sci*, v. 45, p. 61-8.
- Kappler-Gratias, S., C. Auxerre, I. Dubeaux, M. Beolet, M. Ripaux, P. Y. Le Pennec, and B. N. Pham, 2014, Systematic RH genotyping and variant identification in French donors of African origin: *Blood Transfus*, v. 12 Suppl 1, p. s264-72.
- Karamatic Crew V, P. J., Marais I, Needs M, Wiles D, Daniels G., 2011, DOLG, a novel high incidence antigen in the Dombrock blood group system., *Vox Sang*, p. 263.
- Karamatic Crew V, T. N., Bullock T, *et al.*, 2013a, Serological and molecular characterisation of DOLC, a novel high incidence antigen in the Dombrock blood group system., *Vox Sang*, p. 30.
- Karamatic Crew V, T. N., Mathlouthi R, Macek Kvanka M, Urbajs M, Daniels G., 2013b, A family study and a novel molecular background of a Gy(a-) individual with anti-Gya., *Transfus Med*, p. PO89.
- Kitano, T., and N. Saitou, 1999, Evolution of Rh blood group genes have experienced gene conversions and positive selection: *J Mol Evol*, v. 49, p. 615-26.
- Koch-Nolte, F., and F. Haag, 1997, Mono(ADP-ribosyl)transferases and related enzymes in animal tissues. Emerging gene families: *Adv Exp Med Biol*, v. 419, p. 1-13.

- Koch-Nolte, F., F. Haag, R. Braren, M. Kühl, J. Hoovers, S. Balasubramanian, F. Bazan, and H. G. Thiele, 1997, Two novel human members of an emerging mammalian gene family related to mono-ADP-ribosylating bacterial toxins: *Genomics*, v. 39, p. 370-6.
- KORNSTAD, L., and K. HALVORSEN, 1958, Haemolytic disease of the newborn caused by anti-Jk b: *Vox Sang*, v. 3, p. 94-9.
- Koshy, R., B. Patel, and J. S. Harrison, 2009, Anti-Kpa-induced severe delayed hemolytic transfusion reaction: *Immunohematology*, v. 25, p. 44-7.
- Kudo, S., and M. Fukuda, 1989, Structural organization of glycophorin A and B genes: glycophorin B gene evolved by homologous recombination at Alu repeat sequences: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 86, p. 4619-23.
- Kudo, S., and M. Fukuda, 1990, Identification of a novel human glycophorin, glycophorin E, by isolation of genomic clones and complementary DNA clones utilizing polymerase chain reaction: *J Biol Chem*, v. 265, p. 1102-10.
- Körmöczi, G. F., E. A. Scharberg, and C. Gassner, 2009, A novel KEL*1,3 allele with weak Kell antigen expression confirming the cis-modifier effect of KEL3: *Transfusion*, v. 49, p. 733-9.
- Körmöczi, G. F., T. Wagner, C. Jungbauer, M. Vadon, N. Ahrens, W. Moll, A. Mühlbacher, S. Özgül-Gülce, T. Kleinrath, S. Kilga-Nogler, D. Schönitzer, and C. Gassner, 2007, Genetic diversity of KELnull and KELeI: a nationwide Austrian survey: *Transfusion*, v. 47, p. 703-14.
- Latini, F. R., D. Gazito, C. P. Arnoni, J. G. Muniz, R. de Medeiros Person, F. O. Carvalho, W. Baleotti, L. Castilho, and J. A. Barreto, 2014, A new strategy to identify rare blood donors: single polymerase chain reaction multiplex SNaPshot reaction for detection of 16 blood group alleles: *Blood Transfus*, v. 12 Suppl 1, p. s256-63.
- Le Goff, G. C., J. C. Brès, D. Rigal, L. J. Blum, and C. A. Marquette, 2010, Robust, high-throughput solution for blood group genotyping: *Anal Chem*, v. 82, p. 6185-92.
- Le Pennec, P. Y., P. Rouger, M. T. Klein, M. Kornprobst, Y. Brossard, B. Boizard, and C. Salmon, 1989, A serologic study of red cells and sera from 18 Rh:32,-46 (RN/RN) persons: *Transfusion*, v. 29, p. 798-802.
- Le Pennec, P. Y., P. Rouger, M. T. Klein, N. Robert, and C. Salmon, 1987, Study of anti-Fya in five black Fy(a-b-) patients: *Vox Sang*, v. 52, p. 246-9.
- Lee, S., 1997, Molecular basis of Kell blood group phenotypes: *Vox Sang*, v. 73, p. 1-11.
- Lee, S., 2007, The value of DNA analysis for antigens of the Kell and Kx blood group systems: *Transfusion*, v. 47, p. 32S-9S.
- Lee, S., D. C. Russo, M. E. Reid, and C. M. Redman, 2003, Mutations that diminish expression of Kell surface protein and lead to the Kmod RBC phenotype: *Transfusion*, v. 43, p. 1121-5.
- Lee, S., D. C. Russo, A. P. Reiner, J. H. Lee, M. Y. Sy, M. J. Telen, W. J. Judd, P. Simon, M. J. Rodrigues, T. Chabert, J. Poole, S. Jovanovic-Srzentic, C. Levene, V. Yahalom, and C. M. Redman, 2001, Molecular defects underlying the Kell null phenotype: *J Biol Chem*, v. 276, p. 27281-9.
- Lee, S., X. Wu, M. Reid, and C. Redman, 1995a, Molecular basis of the K:6,-7 [Js(a+b-)] phenotype in the Kell blood group system: *Transfusion*, v. 35, p. 822-5.
- Lee, S., X. Wu, M. Reid, T. Zelinski, and C. Redman, 1995b, Molecular basis of the Kell (K1) phenotype: *Blood*, v. 85, p. 912-6.

- Lee, S., X. Wu, S. Son, D. Naime, M. Reid, Y. Okubo, P. Sistonen, and C. Redman, 1996, Point mutations characterize KEL10, the KEL3, KEL4, and KEL21 alleles, and the KEL17 and KEL11 alleles: *Transfusion*, v. 36, p. 490-4.
- Lee, S., E. Zambas, E. D. Green, and C. Redman, 1995c, Organization of the gene encoding the human Kell blood group protein: *Blood*, v. 85, p. 1364-70.
- Lee-Stroka, H., S. L. Slezak, S. Adams, J. Martin, F. M. Robbins, L. Caruccio, K. M. Byrne, and D. F. Stroncek, 2008, Another example of a KEL1 variant red cell phenotype due to a threonine to serine change at position 193 of Kell glycoprotein: *Transfusion*, v. 48, p. 925-9.
- Lerut, E., B. Van Damme, F. Noizat-Pirenne, M. P. Emonds, P. Rouger, Y. Vanrenterghem, J. Pirenne, and H. Ansart-Pirenne, 2007, Duffy and Kidd blood group antigens: minor histocompatibility antigens involved in renal allograft rejection?: *Transfusion*, v. 47, p. 28-40.
- Levene, C., Y. Rudolphson, and Y. Shechter, 1980, A second case of hemolytic disease of the newborn due to anti-Jsa: *Transfusion*, v. 20, p. 714-5.
- Li, Q., L. Y. Ye, Z. H. Guo, Y. X. Zhang, L. L. Wang, and Z. Y. Zhu, 2008, Molecular basis of D variants between Uigur and Han blood donors in Xinjiang: *Transfus Med*, v. 18, p. 199-203.
- Lomas-Francis, C., D. Alcantara, C. Westhoff, J. Uehlinger, M. Valvasori, L. Castilho, and M. E. Reid, 2009, JAL (RH48) blood group antigen: serologic observations: *Transfusion*, v. 49, p. 719-24.
- Lomas-Francis, C., and M. E. Reid, 2010, The Dombrock blood group system: a review: *Immunohematology*, v. 26, p. 71-8.
- Lopez M, K. P., Morakot E, Puente F, Ochoa-Garay G and Tejedor D., 2015, Additional cases of the FY*01W.01 allele, p. 1-379.
- Lucien, N., J. L. Celton, P. Y. Le Pennec, J. P. Cartron, and P. Bailly, 2002, Short deletion within the blood group Dombrock locus causing a Do(null) phenotype: *Blood*, v. 100, p. 1063-4.
- Lucien, N., F. Sidoux-Walter, B. Olivès, J. Moulds, P. Y. Le Pennec, J. P. Cartron, and P. Bailly, 1998, Characterization of the gene encoding the human Kidd blood group/urea transporter protein. Evidence for splice site mutations in Jknull individuals: *J Biol Chem*, v. 273, p. 12973-80.
- Lynen, R., M. Rothe, and E. Gallasch, 1983, Characterization of formaldehyde-related antibodies encountered in hemodialysis patients at different stages of immunization: *Vox Sang*, v. 44, p. 81-9.
- Mali., A. J. A. L., Main ethnic groups / Groupes ethniques.
- Mallinson, G., K. S. Soo, T. J. Schall, M. Pisacka, and D. J. Anstee, 1995, Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype: *Br J Haematol*, v. 90, p. 823-9.
- Manfroi, S., and P. Pagliaro, 2014, Genotyping patients' and donors' blood groups for efficient blood therapy: *Blood Transfus*, v. 12 Suppl 1, p. s305-7.
- Matteocci, A., T. Mancuso, A. Moschetti, A. Collaretti, K. Castagna, C. Spaccino, T. Hutchinson, P. Grammatico, and L. Pierelli, 2014, Three missense mutations found in the KEL gene lead to K(mod) or K0 red blood cell phenotypes: *Transfusion*, v. 54, p. 3216-21.
- Mayer, B., N. Thornton, S. Yürek, D. Wylie, K. Hue-Roye, J. Poole, T. Bartolmäs, A. Salama, C. Lomas-Francis, R. W. Velliquette, K. Yazdanbakhsh, and M. E. Reid, 2010, New

- antigen in the Dombrock blood group system, DOYA, ablates expression of Do(a) and weakens expression of Hy, Jo(a), and Gy(a) antigens: *Transfusion*, v. 50, p. 1295-302.
- Meny, G. M., C. Flickinger, and C. Marcucci, 2013, The American Rare Donor Program: *J Crit Care*, v. 28, p. 110.e9-110.e18.
- Merry, A. H., C. Hodson, E. Thomson, G. Mallinson, and D. J. Anstee, 1986, The use of monoclonal antibodies to quantify the levels of sialoglycoproteins alpha and delta and variant sialoglycoproteins in human erythrocyte membranes: *Biochem J*, v. 233, p. 93-8.
- Meyer, S., C. Vollmert, N. Trost, C. Brönnimann, J. Gottschalk, A. Buser, B. M. Frey, and C. Gassner, 2014a, High-throughput Kell, Kidd, and Duffy matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry-based blood group genotyping of 4000 donors shows close to full concordance with serotyping and detects new alleles: *Transfusion*, v. 54, p. 3198-207.
- Meyer, S., C. Vollmert, N. Trost, C. Brönnimann, J. Gottschalk, A. Buser, B. M. Frey, and C. Gassner, 2014b, High-throughput Kell, Kidd, and Duffy matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry-based blood group genotyping of 4000 donors shows close to full concordance with serotyping and detects new alleles: *Transfusion*.
- Montpetit, A., M. S. Phillips, I. Mongrain, R. Lemieux, and M. St-Louis, 2006, High-throughput molecular profiling of blood donors for minor red blood cell and platelet antigens: *Transfusion*, v. 46, p. 841-8.
- Moore, P., 1994, Rh18 and hrS blood groups and antibodies: *Vox Sang*, v. 66, p. 225-30.
- Moore, P., and E. Smart, 1991, Serology and genetics of the red blood cell factor Rh34: *Vox Sang*, v. 61, p. 122-9.
- Morgan, P., C. B. Wheeler, and E. L. Bossom, 1967, Delayed transfusion reaction attributed to anti-Jkb: *Transfusion*, v. 7, p. 307-8.
- Moulds, J., 1995, "The kidd blood group and urea transport". in *Blood cell Biochemistry, Vol6: Molecular basis of major blood group antigens* edited by Cartron JP and Rouger Ph., Plenum Press, New-York., p. 267-79.
- Moulds, J. M., K. L. Billingsley, G. T. Noumsi, and P. Gowland, 2013, Investigation of RHCE*ceJAL in a Southern US Black Population: *Transfusion*, v. 53, p. 169A-169A.
- Moulds, J. M., L. Kassambara, J. J. Middleton, M. Baby, I. Sagara, A. Guindo, S. Coulibaly, D. Yalcouye, D. A. Diallo, L. Miller, and O. Doumbo, 2000, Identification of complement receptor one (CR1) polymorphisms in west Africa: *Genes Immun*, v. 1, p. 325-9.
- Moulds, J. M., P. A. Zimmerman, O. K. Doumbo, L. Kassambara, I. Sagara, D. A. Diallo, J. P. Atkinson, M. Krych-Goldberg, R. E. Hauhart, D. E. Hourcade, D. T. McNamara, D. J. Birmingham, J. A. Rowe, J. J. Moulds, and L. H. Miller, 2001, Molecular identification of Knops blood group polymorphisms found in long homologous region D of complement receptor 1: *Blood*, v. 97, p. 2879-85.
- Mourant AE, K. A., Domaniewska-Sobczak K., 1976, The distribution of the human blood groups and other polymorphisms, 2nd ed., London: Oxford University Press.
- Mouro-Chanteloup, I., J. Delaunay, P. Gane, V. Nicolas, M. Johansen, E. J. Brown, L. L. Peters, C. L. Van Kim, J. P. Cartron, and Y. Colin, 2003, Evidence that the red cell skeleton protein 4.2 interacts with the Rh membrane complex member CD47: *Blood*, v. 101, p. 338-44.
- Nataf, J., 2013, The rare Dantu phenotype: Serological aspects and new screening approach through red blood cell genotyping., *Transfusion*, p. 48A.

- Neote, K., J. Y. Mak, L. F. Kolakowski, and T. J. Schall, 1994, Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor: *Blood*, v. 84, p. 44-52.
- Nicolas, V., C. Le Van Kim, P. Gane, C. Birkenmeier, J. P. Cartron, Y. Colin, and I. Mouro-Chanteloup, 2003, Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation: *J Biol Chem*, v. 278, p. 25526-33.
- Nicolas, V., I. Mouro-Chanteloup, C. Lopez, P. Gane, A. Gimm, N. Mohandas, J. P. Cartron, C. Le Van Kim, and Y. Colin, 2006, Functional interaction between Rh proteins and the spectrin-based skeleton in erythroid and epithelial cells: *Transfus Clin Biol*, v. 13, p. 23-8.
- Nikolis, N. M., F. Boctor, W. A. Heaton, and J. Martone, 2011, Should we be screening for anti-Js(a)?: *Immunohematology*, v. 27, p. 104-6.
- Noizat-Pirenne, F., K. Lee, P. Y. Le Pennec, P. Simon, P. Kazup, D. Bachir, A. M. Rouzaud, M. Roussel, G. Juszcak, C. Menanteau, P. Rouger, R. Kotb, J. P. Cartron, and H. Ansart-Pirenne, 2002a, Rare RHCE phenotypes in black individuals of Afro-Caribbean origin: identification and transfusion safety: *Blood*, v. 100, p. 4223-4231.
- Noizat-Pirenne, F., K. Lee, P. Y. Pennec, P. Simon, P. Kazup, D. Bachir, A. M. Rouzaud, M. Roussel, G. Juszcak, C. Ménanteau, P. Rouger, R. Kotb, J. P. Cartron, and H. Ansart-Pirenne, 2002b, Rare RHCE phenotypes in black individuals of Afro-Caribbean origin: identification and transfusion safety: *Blood*, v. 100, p. 4223-31.
- Noizat-Pirenne, F., I. Mouro, P. Le Pennec, P. Boulard, M. Roussel, and P. Rouger, 1999, Evidence that serine at position 103 is not sufficient for complete C antigen expression: *Transfusion*, v. 39, p. 103S-103S.
- Noumsi, G. T., A. Tounkara, H. Diallo, K. Billingsley, J. J. Moulds, and J. M. Moulds, 2011, Knops blood group polymorphism and susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection: *Transfusion*, v. 51, p. 2462-9.
- O'Day, T., 1987, A second example of autoanti-Jk3: *Transfusion*, v. 27, p. 442.
- Okazaki, I. J., and J. Moss, 1999, Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored, secreted, and intracellular vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases: *Annu Rev Nutr*, v. 19, p. 485-509.
- Okubo, Y., H. Yamaguchi, N. Nagao, T. Tomita, T. Seno, and M. Tanaka, 1986, Heterogeneity of the phenotype Jk(a-b-) found in Japanese: *Transfusion*, v. 26, p. 237-9.
- Okuda, H., H. Suganuma, T. Kamesaki, M. Kumada, N. Tsudo, T. Omi, S. Iwamoto, and E. Kajii, 2000, The analysis of nucleotide substitutions, gaps, and recombination events between RHD and RHCE genes through complete sequencing: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 274, p. 670-83.
- Olivès, B., M. Merriman, P. Bailly, S. Bain, A. Barnett, J. Todd, J. P. Cartron, and T. Merriman, 1997, The molecular basis of the Kidd blood group polymorphism and its lack of association with type 1 diabetes susceptibility: *Hum Mol Genet*, v. 6, p. 1017-20.
- Olsson, M. L., C. Hansson, N. D. Avent, I. E. Akesson, C. A. Green, and G. L. Daniels, 1998a, A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers: *Transfusion*, v. 38, p. 168-73.
- Olsson, M. L., J. S. Smythe, C. Hansson, J. Poole, G. Mallinson, J. Jones, N. D. Avent, and G. Daniels, 1998b, The Fy(x) phenotype is associated with a missense mutation in the

- Fy(b) allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein: *Br J Haematol*, v. 103, p. 1184-91.
- Omoto, R., M. E. Reid, and L. Castilho, 2008, Molecular analyses of GYPB in African Brazilians: *Immunohematology*, v. 24, p. 148-53.
- Padmore, R., P. Berardi, K. Erickson, D. Desjardins, A. Giulivi, M. Tokessy, D. Neurath, and E. Saidenberg, 2014, Acute extravascular hemolytic transfusion reaction due to anti-Kpa antibody missed by electronic crossmatch: *Transfus Apher Sci*, v. 51, p. 168-71.
- Pal, M., and B. Williams, 2015, Prevalence of maternal red cell alloimmunisation: a population study from Queensland, Australia: *Pathology*, v. 47, p. 151-5.
- Paris, S., D. Rigal, V. Barlet, M. Verdier, N. Coudurier, P. Bailly, and J. C. Brès, 2014, Flexible automated platform for blood group genotyping on DNA microarrays: *J Mol Diagn*, v. 16, p. 335-42.
- Patten, E., C. E. Beck, C. Scholl, R. A. Stroope, and C. Wukasch, 1977, Autoimmune hemolytic anemia with anti Jka specificity in a patient taking aldomet: *Transfusion*, v. 17, p. 517-20.
- Peiper, S. C., Z. X. Wang, K. Neote, A. W. Martin, H. J. Showell, M. J. Conklyn, K. Ogborne, T. J. Hadley, Z. H. Lu, J. Hesselgesser, and R. Horuk, 1995, The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor: *J Exp Med*, v. 181, p. 1311-7.
- Perry, G. H., Y. Xue, R. S. Smith, W. K. Meyer, M. Caliskan, O. Yanez-Cuna, A. S. Lee, M. Gutiérrez-Arcelus, C. Ober, E. J. Hollox, C. Tyler-Smith, and C. Lee, 2012, Evolutionary genetics of the human Rh blood group system: *Hum Genet*, v. 131, p. 1205-16.
- Peyrard, T., Y. Lam, C. Saison, L. Arnaud, J. Babinet, P. Rouger, P. Bierling, and D. Janvier, 2012, Anti-U-like as an alloantibody in S-s-U- and S-s-U+(var) black people: *Transfusion*, v. 52, p. 622-8.
- Pham, B.-N., T. Peyrard, G. Juszczak, I. Dubeaux, D. Gien, A. Blancher, J.-P. Cartron, P. Rouger, and P.-Y. Le Pennec, 2009a, Heterogeneous molecular background of the weak C, VS+, hr(B)-, Hr(B)- phenotype in black persons: *Transfusion*, v. 49, p. 495-504.
- Pham, B. N., T. Peyrard, G. Juszczak, C. Auxerre, S. Godin, P. Bonin, P. Rouger, and P. Y. Le Pennec, 2009b, Alloanti-c (RH4) revealing that the (C)ce s haplotype encodes a partial c antigen: *Transfusion*, v. 49, p. 1329-34.
- Pham, B. N., T. Peyrard, G. Juszczak, I. Dubeaux, D. Gien, A. Blancher, J. P. Cartron, P. Rouger, and P. Y. Le Pennec, 2009c, Heterogeneous molecular background of the weak C, VS+, hr B-, Hr B- phenotype in black persons: *Transfusion*, v. 49, p. 495-504.
- Pham, B. N., T. Peyrard, S. Turret, M. Beolet, H. Many, G. Juszczak, M. Roussel, S. Kappler-Gratias, P. Rouger, and P. Y. Le Pennec, 2009d, Anti-HrB and anti-hrb revisited: *Transfusion*, v. 49, p. 2400-5.
- Pham, B. N., M. Roussel, D. Gien, M. Ripaux, C. Carine, P. Y. Le Pennec, and C. Andre-Botte, 2013, Molecular analysis of patients with weak D and serologic analysis of those with anti-D (excluding type 1 and type 2): *Immunohematology*, v. 29, p. 55-62.
- Piassi, F. C., S. M. Santos, L. M. de Castilho, W. Baleotti Júnior, R. B. Suzuki, and D. M. da Cunha, 2013, Dombrock genotyping in Brazilian blood donors reveals different regional frequencies of the HY allele: *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 35, p. 400-3.
- Picard, C., C. Frassati, A. Basire, S. Buhler, V. Galicher, V. Ferrera, D. Reviron, J. P. Zappitelli, P. Bailly, and J. Chiaroni, 2009, Positive association of DRB1 04 and DRB1 15 alleles with Fya immunization in a Southern European population: *Transfusion*, v. 49, p. 2412-7.

- Pierce, S. R., J. T. Hardman, S. Steele, and M. L. Beck, 1980, Hemolytic disease of the newborn associated with anti-Jk3: *Transfusion*, v. 20, p. 189-91.
- PINKERTON, F. J., L. E. MERMOD, B. A. LILES, J. A. JACK, and J. NOADES, 1959, The phenotype Jk(a-b-) in the Kidd blood group system: *Vox Sang*, v. 4, p. 155-60.
- PLAUT, G., E. W. IKIN, A. E. MOURANT, R. SANGER, and R. R. RACE, 1953, A new blood-group antibody, anti Jkb: *Nature*, v. 171, p. 431.
- POLESKY, H. F., and J. R. BOVE, 1964, A FATAL HEMOLYTIC TRANSFUSION REACTION WITH ACUTE AUTOHEMOLYSIS: *Transfusion*, v. 4, p. 285-92.
- Polin, H., M. Danzer, A. Reiter, M. Brisner, W. Gaszner, J. Weinberger, and C. Gabriel, 2014a, MN typing discrepancies based on GYPA-B-A hybrid: *Vox Sang*, v. 107, p. 393-8.
- Polin, H., W. Gaszner, S. Suessner, M. Danzer, and C. Gabriel, 2014b, Identification of a novel Kmod -1 allele encoded by 977C>T (Pro326Leu): *Transfusion*, v. 54, p. 2130-1.
- Race RR, S. R., 1975, *Blood Groups in Man*, p. 178-260.
- Rafnar, T., S. H. Vermeulen, P. Sulem, G. Thorleifsson, K. K. Aben, J. A. Witjes, A. J. Grotenhuis, G. W. Verhaegh, C. A. Hulsbergen-van de Kaa, S. Besenbacher, D. Gudbjartsson, S. N. Stacey, J. Gudmundsson, H. Johannsdottir, H. Bjarnason, C. Zanon, H. Helgadottir, J. G. Jonasson, L. Tryggvadottir, E. Jonsson, G. Geirsson, S. Nikulasson, V. Petursdottir, D. T. Bishop, S. Chung-Sak, A. Choudhury, F. Elliott, J. H. Barrett, M. A. Knowles, P. J. de Verdier, C. Ryk, A. Lindblom, P. Rudnai, E. Gurzau, K. Koppova, P. Vineis, S. Polidoro, S. Guarrera, C. Sacerdote, A. Panadero, J. I. Sanz-Velez, M. Sanchez, G. Valdivia, M. D. Garcia-Prats, J. G. Hengstler, S. Selinski, H. Gerullis, D. Ovsianikov, A. Khezri, A. Aminsharifi, M. Malekzadeh, L. H. van den Berg, R. A. Ophoff, J. H. Veldink, M. P. Zeegers, E. Kellen, J. Fostinelli, D. Andreoli, C. Arici, S. Porru, F. Buntinx, A. Ghaderi, K. Golka, J. I. Mayordomo, G. Matullo, R. Kumar, G. Steineck, A. E. Kiltie, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, K. Stefansson, and L. A. Kiemeny, 2011, European genome-wide association study identifies SLC14A1 as a new urinary bladder cancer susceptibility gene: *Hum Mol Genet*, v. 20, p. 4268-81.
- Rahuel, C., J. London, A. Vignal, S. K. Ballas, and J. P. Cartron, 1991, Erythrocyte glycophorin B deficiency may occur by two distinct gene alterations: *Am J Hematol*, v. 37, p. 57-8.
- Reid M, L.-F. C., Olsson M., 2012, *The Blood Group Antigen*, Elsevier.
- Reid, M. E., C. Lomas-Francis, G. L. Daniels, V. Chen, J. Shen, Y. C. Ho, V. Hare, R. Batts, M. Yacob, and E. Smart, 1995, Expression of the erythrocyte antigen Henshaw (He; MNS6): serological and immunochemical studies: *Vox Sang*, v. 68, p. 183-6.
- Reid, M. E., J. R. Storry, H. Ralph, O. O. Blumenfeld, and C. H. Huang, 1996, Expression and quantitative variation of the low-incidence blood group antigen He on some S-s-red cells: *Transfusion*, v. 36, p. 719-24.
- Reid, M. E., J. R. Storry, L. Sausais, E. Tossas, M. Rios, K. Hue-Roye, E. S. Gloster, S. T. Miller, C. Wolf, and C. Lomas-Francis, 2003, DAK, a new low-incidence antigen in the Rh blood group system: *Transfusion*, v. 43, p. 1394-7.
- Renoud, K. J., K. Barracchini, K. M. Byrne, S. Adams, A. Pickett, L. Caruccio, and D. F. Stroncek, 2006, KEL6 and KEL7 genotyping with sequence-specific primers: *Transfusion*, v. 46, p. 1510-4.
- Ringressi, A., S. Biagioni, G. Mello, G. Graziani, and F. Mecacci, 2012, Anti-U alloimmunisation in a pregnant woman from Niger: *Blood Transfus*, v. 10, p. 221-4.
- Rios, M., A. Chaudhuri, G. Mallinson, L. Sausais, A. E. Gomensoro-Garcia, J. Hannon, S. Rosenberger, J. Poole, G. Burgess, O. Pogo, and M. Reid, 2000, New genotypes in

- Fy(a-b-) individuals: nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either FY A or FY B: *Br J Haematol*, v. 108, p. 448-54.
- Rios, M., K. Hue-Roye, A. H. Lee, J. T. Chiofalo, J. L. Miller, and M. E. Reid, 2001a, DNA analysis for the Dombrock polymorphism: *Transfusion*, v. 41, p. 1143-6.
- Rios, M., K. Hue-Roye, J. R. Storry, T. Lee, J. L. Miller, and M. E. Reid, 2001b, Molecular basis of the Dombrock null phenotype: *Transfusion*, v. 41, p. 1405-7.
- Rios, M., K. Hue-Roye, R. Øyen, J. Miller, and M. E. Reid, 2002a, Insights into the Holley- and Joseph- phenotypes: *Transfusion*, v. 42, p. 52-8.
- Rios, M., J. R. Storry, K. Hue-Roye, A. Chung, and M. E. Reid, 2002b, Two new molecular bases for the Dombrock null phenotype: *Br J Haematol*, v. 117, p. 765-7.
- Rodrigues, A., M. Rios, J. Pellegrino, F. F. Costa, and L. Castilho, 2002, Presence of the RHD pseudogene and the hybrid RHD-CE-D(s) gene in Brazilians with the D-negative phenotype: *Braz J Med Biol Res*, v. 35, p. 767-73.
- Rosse, W. F., D. Gallagher, T. R. Kinney, O. Castro, H. Dosik, J. Moohr, W. Wang, and P. S. Levy, 1990, Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease: *Blood*, v. 76, p. 1431-7.
- Rouillac, C., P. Gane, J. Cartron, P. Y. Le Pennec, J. P. Cartron, and Y. Colin, 1996, Molecular basis of the altered antigenic expression of RhD in weak D(Du) and RhC/e in RN phenotypes: *Blood*, v. 87, p. 4853-61.
- Rourk, A., and J. E. Squires, 2012, Implications of the Kidd blood group system in renal transplantation: *Immunohematology*, v. 28, p. 90-4.
- Roussel, M., S. Poupel, J. Nataf, G. Juszczak, G. Woimant, A. Mailloux, C. Menanteau, B. N. Pham, P. Rouger, P. Y. Le Pennec, and T. Peyrard, 2013, RHD*DOL1 and RHD*DOL2 encode a partial D antigen and are in cis with the rare RHCE*ceBI allele in people of African descent: *Transfusion*, v. 53, p. 363-72.
- Roxby, D. J., J. M. Paris, D. A. Stern, and S. G. Young, 1994, Pure anti-Doa stimulated by pregnancy: *Vox Sang*, v. 66, p. 49-50.
- Roy-Choudhury AK, N. M., 1988, Human polymorphic genes world distribution., *Oxford University Press : London*.
- Rumsey, D. H., S. J. Nance, M. Rubino, and S. G. Sandler, 1999, Naturally-occurring anti-Jka in infant twins: *Immunohematology*, v. 15, p. 159-62.
- Russo, D., C. Redman, and S. Lee, 1998, Association of XK and Kell blood group proteins: *J Biol Chem*, v. 273, p. 13950-6.
- Saison, C., S. Waldvogel, D. Gien, T. Peyrard, and L. Arnaud, 2014, Family study of a Swiss patient uncovered a novel genetic basis for the S-s-U+(var) phenotype: *Transfusion*, v. 54, p. 2941-5.
- Sander, R. P., N. M. Hardy, and S. A. Van Meter, 1987, Anti-Jka autoimmune hemolytic anemia in an infant: *Transfusion*, v. 27, p. 58-60.
- Schmid, P., K. R. Ravenell, S. L. Sheldon, and W. A. Flegel, 2012, DARC alleles and Duffy phenotypes in African Americans: *Transfusion*, v. 52, p. 1260-7.
- Schonewille, H., I. I. Doxiadis, W. H. Levering, D. L. Roelen, F. H. Claas, and A. Brand, 2014, HLA-DRB1 associations in individuals with single and multiple clinically relevant red blood cell antibodies: *Transfusion*, v. 54, p. 1971-80.
- Schonewille, H., L. M. van de Watering, D. S. Loomans, and A. Brand, 2006, Red blood cell alloantibodies after transfusion: factors influencing incidence and specificity: *Transfusion*, v. 46, p. 250-6.

- Shafi, H., I. Abumuhor, and E. Klapper, 2014, How we incorporate molecular typing of donors and patients into our hospital transfusion service: *Transfusion*, v. 54, p. 1212-9.
- Sidoux-Walter, F., N. Lucien, R. Nissinen, P. Sistonen, S. Henry, J. Moulds, J. P. Cartron, and P. Bailly, 2000, Molecular heterogeneity of the Jk(null) phenotype: expression analysis of the Jk(S291P) mutation found in Finns: *Blood*, v. 96, p. 1566-73.
- Silvy, M., S. Beley, T. Granier, A. Ba, J. Chiaroni, and P. Bailly, 2013a, Heterogeneity of alleles encoding high- and low-prevalence red blood cell antigens across Africa: useful data to facilitate transfusion in African patients: *Br J Haematol*, v. 163, p. 528-36.
- Silvy, M., J. Di Cristofaro, S. Beley, K. Papa, M. Rits, P. Richard, J. Chiaroni, and P. Bailly, 2011a, 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: *British Journal of Haematology*, v. 154, p. 260-270.
- Silvy, M., J. Di Cristofaro, S. Beley, K. Papa, M. Rits, P. Richard, J. Chiaroni, and P. Bailly, 2011b, 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*, v. 154, p. 260-70.
- Silvy, M., T. Granier, S. Beley, J. Chiaroni, and P. Bailly, 2013b, Identification of novel polymorphism restricted to the (C)ces type 1 haplotype avoids risk of transfusion deadlock in SCD patients: *Br J Haematol*, v. 160, p. 863-7.
- Silvy, M., C. Tournamille, J. Babinet, S. Pakdaman, S. Cohen, J. Chiaroni, F. Galactéros, P. Bierling, P. Bailly, and F. Noizat-Pirenne, 2014, 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*, v. 99, p. e115-7.
- Singleton, B. K., C. A. Green, N. D. Avent, P. G. Martin, E. Smart, A. Daka, E. G. Narter-Olaga, L. M. Hawthorne, and G. Daniels, 2000, 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*, v. 95, p. 12-8.
- Sippert, E., C. R. Fujita, D. Machado, G. Guelsin, A. C. Gaspardi, J. Pellegrino, S. Gilli, S. S. Saad, and L. Castilho, 2015, Variant RH alleles and Rh immunisation in patients with sickle cell disease: *Blood Transfus*, v. 13, p. 72-7.
- Sistonen, P., K. Virtaranta-Knowles, R. Denisova, V. Kucinskas, D. Ambrasiene, and L. Beckman, 1999, The LWb blood group as a marker of prehistoric Baltic migrations and admixture: *Hum Hered*, v. 49, p. 154-8.
- Smith, G., P. Knott, J. Rissik, J. de la Fuente, and N. Win, 1998, Anti-U and haemolytic disease of the fetus and newborn: *Br J Obstet Gynaecol*, v. 105, p. 1318-21.
- Smith, K. J., L. S. Coonce, S. F. South, and G. M. Troup, 1983, Anti-Cra: family study and survival of chromium-labeled incompatible red cells in a Spanish-American patient: *Transfusion*, v. 23, p. 167-9.
- Smythe, J. S., N. D. Avent, P. A. Judson, S. F. Parsons, P. G. Martin, and D. J. Anstee, 1996, Expression of RHD and RHCE gene products using retroviral transduction of K562 cells establishes the molecular basis of Rh blood group antigens: *Blood*, v. 87, p. 2968-73.
- Solovieff, N., S. W. Hartley, C. T. Baldwin, E. S. Klings, M. T. Gladwin, J. G. Taylor, G. J. Kato, L. A. Farrer, M. H. Steinberg, and P. Sebastiani, 2011, Ancestry of African Americans with sickle cell disease: *Blood Cells Mol Dis*, v. 47, p. 41-5.
- Spring, F. A., and M. E. Reid, 1991, Evidence that the human blood group antigens Gya and Hy are carried on a novel glycosylphosphatidylinositol-linked erythrocyte membrane glycoprotein: *Vox Sang*, v. 60, p. 53-9.

- Spring, F. A., M. E. Reid, and G. Nicholson, 1994, Evidence for expression of the Joa blood group antigen on the Gya/Hy-active glycoprotein: *Vox Sang*, v. 66, p. 72-7.
- Storry JR, K. J., Hallqvist C, Nordahl M, Olsson ML., 2009, Specific blocking of JK antigens in an apparently healthy potential blood donor who phenotyped as Jk(a-b-) reveals an autoanti-Jk3., *Vox Sang*, p. abstract : P-266.
- Storry, J. R., M. E. Reid, S. Fetics, and C. H. Huang, 2003, Mutations in GYPB exon 5 drive the S-s-U+(var) phenotype in persons of African descent: implications for transfusion: *Transfusion*, v. 43, p. 1738-47.
- Strupp, A., K. Cash, and J. Uehlinger, 1998, Difficulties in identifying antibodies in the Dombrock blood group system in multiply alloimmunized patients: *Transfusion*, v. 38, p. 1022-5.
- Taddie, S. J., C. Barrasso, and P. M. Ness, 1982, A delayed transfusion reaction caused by anti-K6: *Transfusion*, v. 22, p. 68-9.
- Tagny, C. T., A. Diarra, R. Yahaya, M. Hakizimana, A. Nguessan, G. Mbensa, Y. Nébié, H. Dahourou, J. B. Tapko, C. Shiboski, E. Murphy, and J. J. Lefrère, 2009, [The transfusion center, the blood donor and the given blood in francophone African countries]: *Transfus Clin Biol*, v. 16, p. 431-8.
- Tax, M. G., C. E. van der Schoot, R. van Doorn, L. Douglas-Berger, D. J. van Rhenen, and P. A. Maaskant-vanWijk, 2002, RHC and RHc genotyping in different ethnic groups: *Transfusion*, v. 42, p. 634-44.
- Telen, M. J., W. F. Rosse, C. J. Parker, M. K. Moulds, and J. J. Moulds, 1990, Evidence that several high-frequency human blood group antigens reside on phosphatidylinositol-linked erythrocyte membrane proteins: *Blood*, v. 75, p. 1404-7.
- Thathy, V., J. M. Moulds, B. Guyah, W. Otieno, and J. A. Stoute, 2005, Complement receptor 1 polymorphisms associated with resistance to severe malaria in Kenya: *Malar J*, v. 4, p. 54.
- Tills, D., A. C. Kopeć, A. Warlow, N. A. Barnicot, A. E. Mourant, A. Marin, F. J. Bennett, and J. C. Woodburn, 1982, Blood group, protein, and red cell enzyme polymorphisms of the Hadza of Tanzania: *Hum Genet*, v. 61, p. 52-9.
- Tippett, P., 1986, A speculative model for the Rh blood groups: *Ann Hum Genet*, v. 50, p. 241-7.
- Touinssi, M., S. Chapel-Fernandes, T. Granier, A. Bokilo, P. Bailly, and J. Chiaroni, 2009, Molecular analysis of inactive and active RHD alleles in native Congolese cohorts: *Transfusion*, v. 49, p. 1353-60.
- Tournamille, C., 2000, [Molecular basis and structure-activity relationships of the Duffy blood group antigens: chemokine and Plasmodium vivax receptors]: *Transfus Clin Biol*, v. 7, p. 497-509.
- Tournamille, C., Y. Colin, J. P. Cartron, and C. Le Van Kim, 1995a, Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals: *Nat Genet*, v. 10, p. 224-8.
- Tournamille, C., C. Le Van Kim, P. Gane, J. P. Cartron, and Y. Colin, 1995b, Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/fyb blood group polymorphism: *Hum Genet*, v. 95, p. 407-10.
- Tournamille, C., C. Le Van Kim, P. Gane, P. Y. Le Pennec, F. Roubinet, J. Babinet, J. P. Cartron, and Y. Colin, 1998, Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy(x) individuals: *Blood*, v. 92, p. 2147-56.

- Tournamille, C., N. Meunier-Costes, B. Costes, J. Martret, A. Barrault, P. Gauthier, F. Galacteros, R. Nzouekou, P. Bierling, and F. Noizat-Pirenne, 2010a, Partial C antigen in sickle cell disease patients: clinical relevance and prevention of alloimmunization: *Transfusion*, v. 50, p. 13-19.
- Tournamille, C., N. Meunier-Costes, B. Costes, J. Martret, A. Barrault, P. Gauthier, F. Galactéros, R. Nzouékou, P. Bierling, and F. Noizat-Pirenne, 2010b, Partial C antigen in sickle cell disease patients: clinical relevance and prevention of alloimmunization: *Transfusion*, v. 50, p. 13-9.
- Traore, M., A. Dumont, A. B. Kaya, S. O. Traore, O. M. Traore, and A. Dolo, 2011, [Blood supply and demand at the Fifth District Health Centre in Bamako (Mali)]: *Sante*, v. 21, p. 33-40.
- Tsuneyama H, 2000, A deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype., *in* S. K. Uchikawa M, et al., ed., *Transfusion*, p. 116S.
- Uchikawa, M., T. Onodera, K. Ogasawara, H. Tsuneyama, C. Toyoda, R. Yabe, T. Enomoto, M. Satake, and K. Nakajima, 2006, Molecular basis for a novel low-frequency antigen in the Kell blood group system, *KYO: Vox Sanguinis*, v. 91, p. 136-136.
- Unger, P., J. L. Procter, J. J. Moulds, M. Moulds, D. Blanchard, M. L. Guizzo, L. A. McCall, J. P. Cartron, and W. Dahr, 1987, The Dantu erythrocyte phenotype of the NE variety. II. Serology, immunochemistry, genetics, and frequency: *Blut*, v. 55, p. 33-43.
- Vege, S., N. C. Johnson, R. W. Velliquette, C. Lomas-Francis, and C. M. Westhoff, 2013, A Novel Allele with Nucleotide 307C > T (Pro103Ser) On RHCE*ceAG (254C > G) Encodes Robust C Antigen: *Transfusion*, v. 53, p. 30A-30A.
- Vege, S., P. A. Nickle, R. Shirey, and C. M. Westhoff, 2009, A Novel 254 G > C (Ala85 Gly) Change Associated with Partial Rhe and Alloanti-e: *Transfusion*, v. 49, p. 15A-15A.
- Vignal, A., J. London, C. Rahuel, and J. P. Cartron, 1990, Promoter sequence and chromosomal organization of the genes encoding glycoporphins A, B and E: *Gene*, v. 95, p. 289-93.
- Vignal, A., C. Rahuel, B. el Maliki, J. London, C. le van Kim, D. Blanchard, C. Andre, L. d'Auriol, F. Galibert, and M. A. Blajchman, 1989, Molecular analysis of glycoporphin A and B gene structure and expression in homozygous Miltenberger class V (Mi. V) human erythrocytes: *Eur J Biochem*, v. 184, p. 337-44.
- Wagner, F. F., and W. A. Flegel, 2000, RHD gene deletion occurred in the Rhesus box: *Blood*, v. 95, p. 3662-8.
- Wagner, F. F., A. Frohmajer, B. Ladewig, N. I. Eicher, C. B. Lonicer, T. H. Müller, M. H. Siegel, and W. A. Flegel, 2000, Weak D alleles express distinct phenotypes: *Blood*, v. 95, p. 2699-708.
- Wagner, F. F., B. Ladewig, K. S. Angert, G. A. Heymann, N. I. Eicher, and W. A. Flegel, 2002, The DAU allele cluster of the RHD gene: *Blood*, v. 100, p. 306-11.
- Wagner, F. F., J. M. Moulds, A. Tounkara, B. Kouriba, and W. A. Flegel, 2003, RHD allele distribution in Africans of Mali: *BMC Genet*, v. 4, p. 14.
- Wendel, S., R. Fontão-Wendel, J. E. Levi, M. G. Aravechia, R. F. Bordokan, D. Russo, and M. S. Haddad, 2004, A McLeod phenotype detected by random screening for K:-4 [Kp(b-)] blood donors in Brazil: *Transfusion*, v. 44, p. 1579-87.
- Wester, E. S., R. Steffensen, P. C. Ligthart, J. Vad, M. de Haas, J. R. Storry, and M. L. Olsson, 2010, KEL*02 alleles with alterations in and around exon 8 in individuals with apparent KEL:1,-2 phenotypes: *Vox Sang*, v. 99, p. 150-7.

- Westhoff, C., S. Vege, K. Yazdanbakhsh, D. Wylie, M. Razib, K. Hue-Roye, G. Halverson, S. Read, E. Whiteoak, P. Nickle, J. Maurer, D. Kavitsky, S. Nance, and M. E. Reid, 2007, A DOB allele encoding an amino acid substitution (Phe62Ser) resulting in a Dombrock null phenotype: *Transfusion*, v. 47, p. 1356-62.
- Westhoff, C. M., S. Vege, C. Halter Hipsky, K. Hue-Roye, T. Copeland, R. W. Velliquette, T. Horn, C. Lomas-Francis, and M. E. Reid, 2013a, RHCE*ceTI encodes partial c and partial e and is often in cis to RHD*DIVa: *Transfusion*, v. 53, p. 741-6.
- Westhoff, C. M., S. Vege, C. Halter-Hipsky, T. Whorley, K. Hue-Roye, C. Lomas-Francis, and M. E. Reid, 2010, DIIIa and DIII Type 5 are encoded by the same allele and are associated with altered RHCE*ce alleles: clinical implications: *Transfusion*, v. 50, p. 1303-11.
- Westhoff, C. M., S. Vege, T. Horn, K. Hue-Roye, C. Halter Hipsky, C. Lomas-Francis, and M. E. Reid, 2013b, RHCE*ceMO is frequently in cis to RHD*DAU0 and encodes a hr(S) -, hr(B) -, RH:-61 phenotype in black persons: clinical significance: *Transfusion*, v. 53, p. 2983-9.
- Wu, G. G., S. Z. Jin, Z. H. Deng, and T. M. Zhao, 2001, Polymerase chain reaction with sequence-specific primers-based genotyping of the human Dombrock blood group DO1 and DO2 alleles and the DO gene frequencies in Chinese blood donors: *Vox Sang*, v. 81, p. 49-51.
- Xu, Y., B. Olives, P. Bailly, E. Fischer, P. Ripoché, P. Ronco, J. P. Cartron, and E. Rondeau, 1997, Endothelial cells of the kidney vasa recta express the urea transporter HUT11: *Kidney Int*, v. 51, p. 138-46.
- Yan, L., Q. Fu, L. Jin, and L. Li, 2001, Duffy blood group phenotypes and genotypes in Chinese: *Transfusion*, v. 41, p. 970.
- Yang, B., L. Bankir, A. Gillespie, C. J. Epstein, and A. S. Verkman, 2002, Urea-selective concentrating defect in transgenic mice lacking urea transporter UT-B: *J Biol Chem*, v. 277, p. 10633-7.
- Yazdanbakhsh, K., S. Lee, Q. Yu, and M. E. Reid, 1999, Identification of a defect in the intracellular trafficking of a Kell blood group variant: *Blood*, v. 94, p. 310-8.
- Yazdanbakhsh, K., M. Rios, J. R. Storry, N. Kosower, N. Parasol, A. Chaudhuri, and M. E. Reid, 2000, Molecular mechanisms that lead to reduced expression of duffy antigens: *Transfusion*, v. 40, p. 310-20.
- Yu, L. C., Y. C. Twu, C. Y. Chang, and M. Lin, 2001, Molecular basis of the Kell-null phenotype: a mutation at the splice site of human KEL gene abolishes the expression of Kell blood group antigens: *J Biol Chem*, v. 276, p. 10247-52.
- Yuan, S., N. P. Ewing, D. Bailey, M. Salvador, and S. Wang, 2007, Transfusion of multiple units of Js(b+) red blood cells in the presence of anti-Jsb in a patient with sickle beta-thalassemia disease and a review of the literature: *Immunohematology*, v. 23, p. 75-80.
- Zelinski, T., 1998, Erythrocyte band 3 antigens and the Diego Blood Group System: *Transfus Med Rev*, v. 12, p. 36-45.
- Zimmerman, P. A., J. Fitness, J. M. Moulds, D. T. McNamara, L. J. Kasehagen, J. A. Rowe, and A. V. Hill, 2003, CR1 Knops blood group alleles are not associated with severe malaria in the Gambia: *Genes Immun*, v. 4, p. 368-73.