

## Utilisation d'une hématie de phénotype rare D-C-G+ (RH:-1,-2,12) dans la stratégie de recherche d'une immunisation anti-G (RH12) chez la femme enceinte.

Cécile TOLY-NDOUR<sup>1</sup>, Jérôme BABBIN<sup>2</sup>, Hélène DELABY<sup>1</sup>, Guy LAIGUILLON<sup>2</sup>, Stéphanie HUGUET-JACQUOT<sup>1</sup>, Alexandre RANERI<sup>2</sup>, Alamouta MACALOU<sup>1</sup>, Cédric VRIGNAUD<sup>2,3,4</sup>, Agnès MAILLOUX<sup>1\$</sup>, Thierry PEYRARD<sup>2,3,4\$</sup>

<sup>1</sup> Unité fonctionnelle biologique et d'expertise en immuno-hématologie périnatale, Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale, Hôpital Saint-Antoine, Paris

<sup>2</sup> Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins – Institut National de la Transfusion Sanguine – Paris. <sup>3</sup> UMR\_S1134 Inserm/Université Paris Diderot, Paris

<sup>4</sup> LABEX GR-Ex, Paris

\*contribution égale de ces auteurs au travail \$ contribution égale de ces auteurs au travail

L'antigène G (RH12) est exprimé aussi bien par la protéine RhD que les protéines RhCe ou RhCE. Une immunisation anti-G se présente ainsi comme une image d'anti-D+C (anti-RH1+RH2). Les femmes enceintes présentant une immunisation anti-G ou anti-G+C peuvent être ainsi faussement étiquetées comme ayant une immunisation anti-D+C. Elles ne bénéficient alors pas, à tort, du traitement par immunoprophylaxie anti-D et leurs grossesses peuvent être inutilement lourdement surveillées, les anti-G et anti-C n'étant en général pas responsables d'atteinte hémolytique anténatale.

La preuve de l'absence d'anti-D et de la présence d'anti-G se fait par fixations-élutions (FE) successives, afin d'isoler les anticorps anti-D, -C et -G. Cette méthode est chronophage et lourde à mettre en œuvre.

L'allèle rare *RHD\*01N.07* n'exprime aucun épitope de la protéine RhD, tout en conservant l'expression de l'antigène G. Lorsqu'il est associé à un allèle *RH\*cE*, il définit l'haplotype *r<sup>12</sup>G*. Les sujets porteurs de cet haplotype à l'état homozygote ou associé à un haplotype *dcE* ou *dce* sont donc de phénotype D-C-G+ (RH:-1,-2,12).

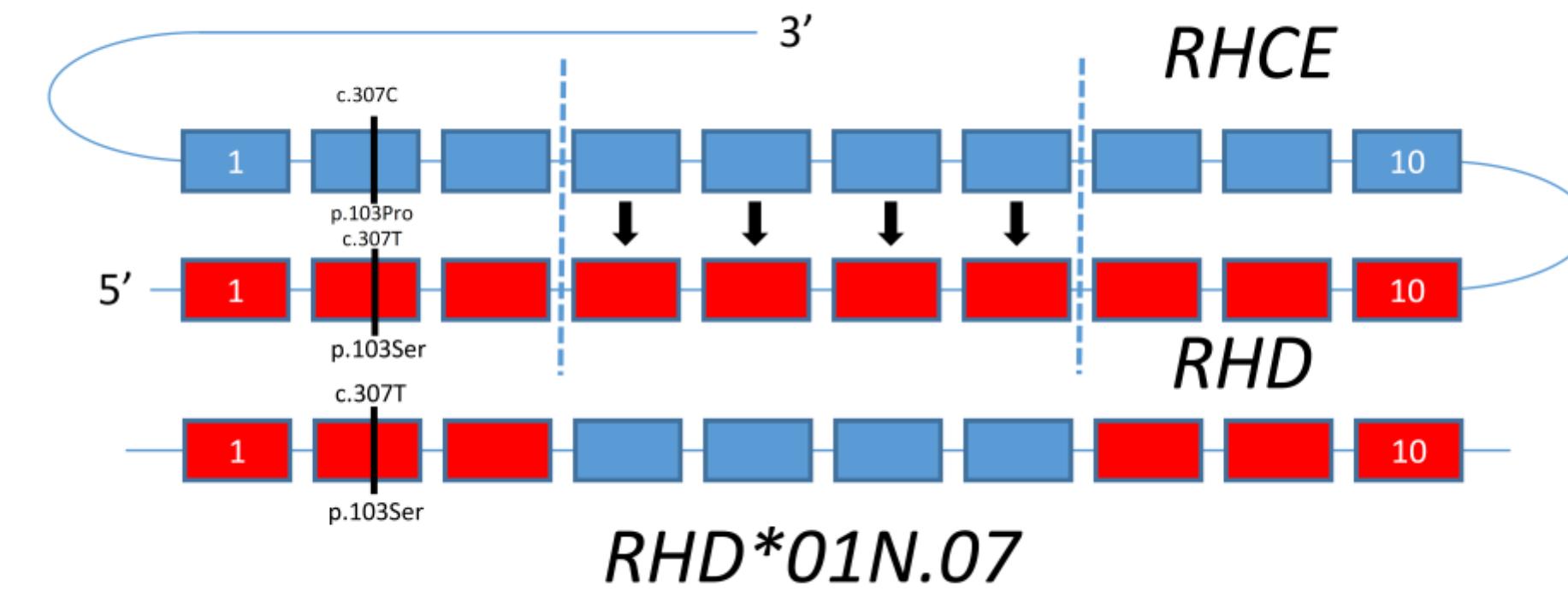
Les sérum de patientes pour lesquelles l'exploration d'une image d'anti-D+C avait été réalisée par FE successives ont été testés sur une hématie D-C-G+ traitée par papaïne. Par cette méthode, nous mettons effectivement en évidence la présence de l'anti-G dans 12 échantillons/12 connus positifs et son absence dans 2 cas/2 connus négatifs.

La recherche d'un anticorps anti-G peut ainsi être réalisée facilement et rapidement sur des hématies de phénotype rare D-C-G+. En cas de négativité, il n'est pas nécessaire de recourir aux méthodes par FE pour conclure à une immunisation anti-D.

**Figure 1. Expression des antigènes D (RH1), C (RH2) et G (RH12) sur hématies de différents phénotypes**

Haplotype	Antigène D (RH1)	Antigène C (RH2)	Antigène G (RH12)
<i>R<sup>0</sup></i>	<i>Dce</i>	+	-
<i>r'</i>	<i>dCe</i>	-	+
<i>r</i>	<i>dce</i>	-	-
<i>r''</i>	<i>dcE</i>	-	-
<i>r<sup>12</sup>G</i>	<b><i>RHD*01N.07 - RHCE*cE</i></b>	-	+

**Figure 2. Mécanismes moléculaires à l'origine de l'allèle rare *RHD\*01N.07***



La présence d'une sérine en position 103 est indispensable à l'expression de l'antigène G

**Figure 3. Technique de recherche d'anti-D (RH1) et mise en évidence indirecte d'anti-G (RH12) par fixations-élutions (FE) au CNRHP**

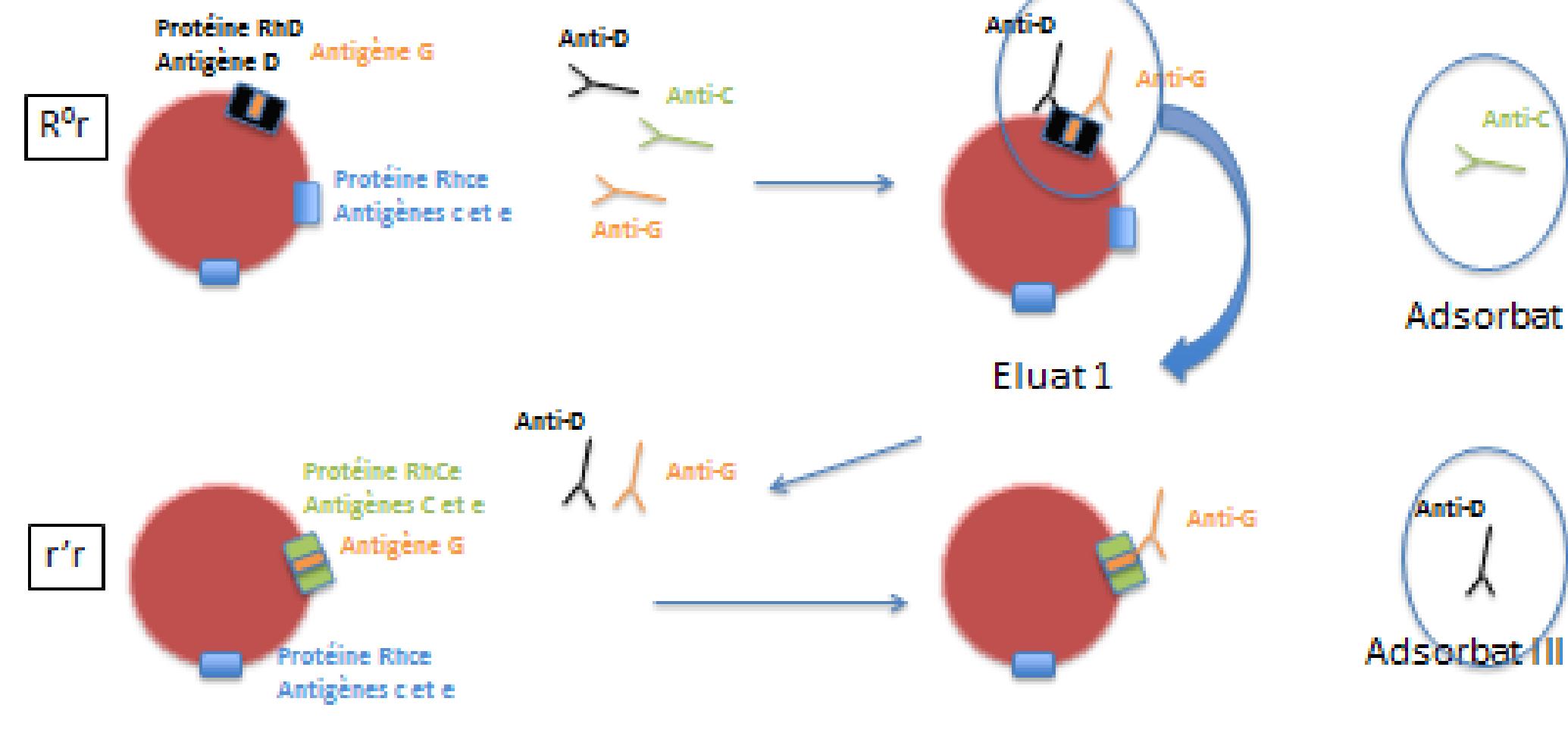
### Circonstances de recherche:

Image d'anti-D+C à l'identification des anticorps et titrages différentiels anti-D seul et anti-C seul présentant des valeurs proches (écart ≤ 2 dilutions) → suspicion de la présence d'un anti-G. Importance alors de déterminer si une immunisation anti-D est ou non présente, et, le cas échéant, d'évaluer la proportion des différents anticorps (anti-D, anti-C et anti-G) dans l'échantillon.

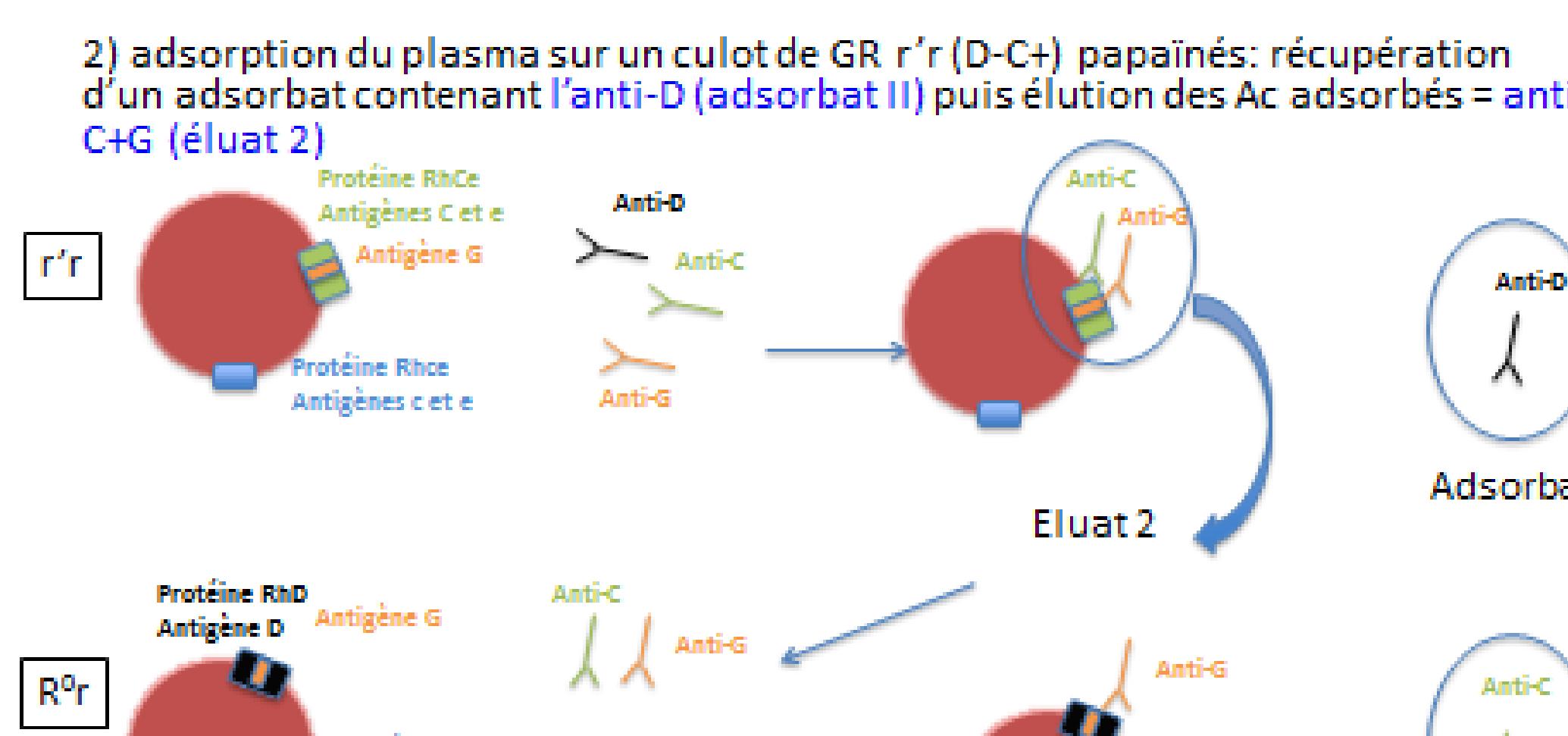
### Etapes du mode opératoire actuellement utilisé au CNRHP

si présence des 3 Ac dans le sérum de la patiente

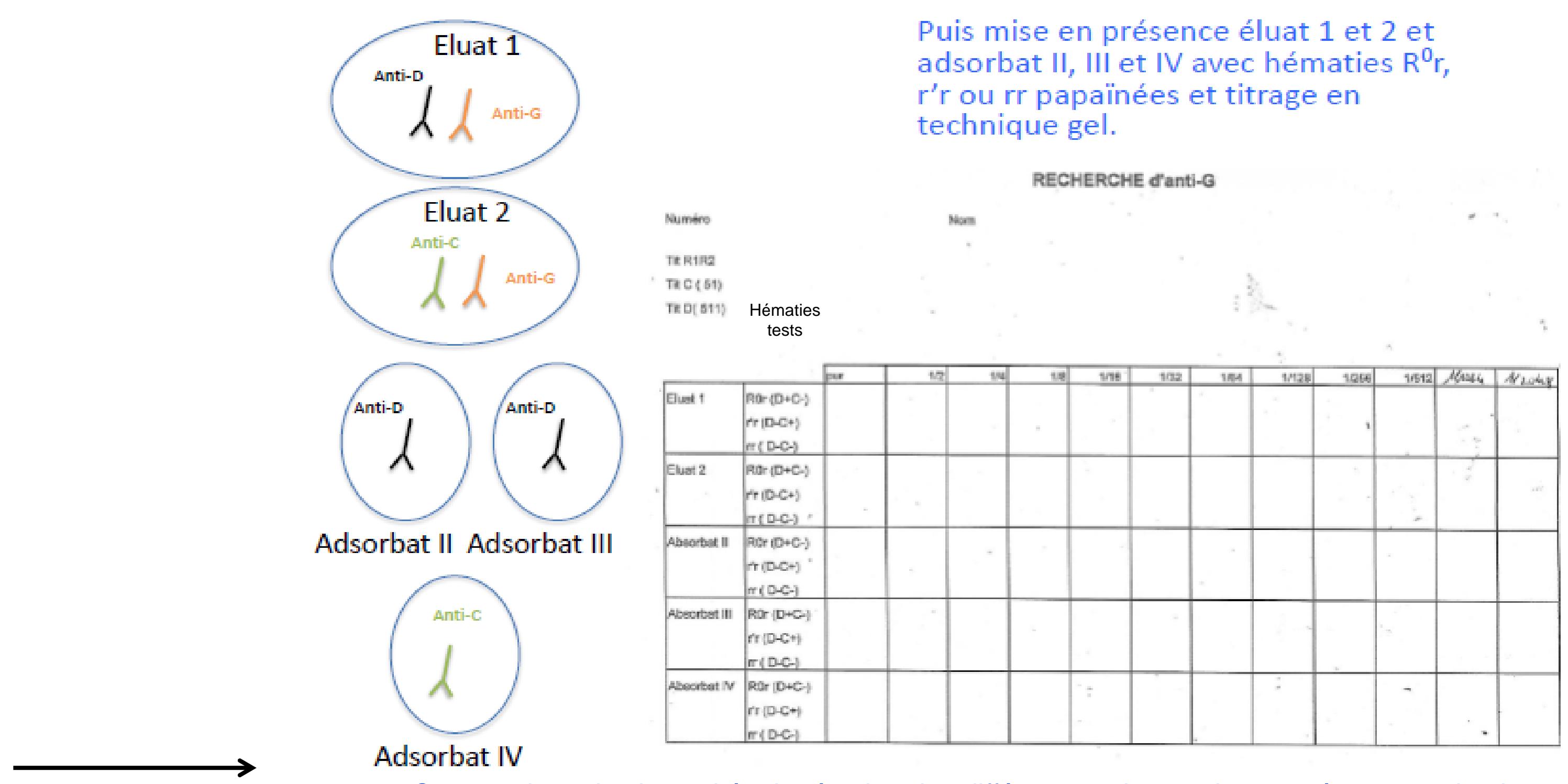
1) adsorption du plasma sur un culot de GR R<sup>0</sup>r (D+C) papaïnés: récupération d'un adsorbat contenant l'anti-C (adsorbat I) puis élution des Ac adsorbés = anti-D+G (éluat 1)



2<sup>ème</sup> tour d'adsorption à partir de l'éluat 1 (contenant anti-D+G) sur GR r'r (D+C) papaïnés: récupération d'un adsorbat contenant l'anti-D isolé (adsorbat III)



2<sup>ème</sup> tour d'adsorption à partir de l'éluat 2 (contenant anti-C+G) sur GR R<sup>0</sup>r (D+C) papaïnés: récupération d'un adsorbat contenant l'anti-C (adsorbat IV)



### Exemple de résultats

Anticorps réagissant	Hématies tests	Comparaison des intensités de réaction des différents anticorps dans les éluats et adsorabats									
		Eluat 1	Eluat 2	Adsorbat II	Adsorbat III	Adsorbat IV	Eluat 1	Eluat 2	Adsorbat II	Adsorbat III	Adsorbat IV
Anti-D+G	R0r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Anti-G	r'r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T-	r'r (D+C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-C	R0r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Anti-G+C	r'r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T-	r'r (D+C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-D	R0r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T- ads	r'r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T-	r'r (D+C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-D	R0r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T- ads	r'r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T-	r'r (D+C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-C	R0r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T- ads	r'r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T-	r'r (D+C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-D	R0r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T- ads	r'r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T-	r'r (D+C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-D	R0r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T- ads	r'r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T-	r'r (D+C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-C	R0r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T- ads	r'r (D+C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T-	r'r (D+C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Présence d'un anti-G et d'un anti-C  
PAS D IMMUNISATION ANTI-D

**Figure 4. Test d'une nouvelle stratégie de recherche directe d'anti-G (RH12) à l'aide d'hématies D-C-G+ (porteuse de l'haplotype *r<sup>12</sup>G*)**

Réalisation d'un test indirect à l'antiglobuline en carte gel LISS/Coombs (Bio-Rad) en mettant le plasma/sérum de la patiente en contact avec l'hématie D-C-G+ papaïnée (réalisation en parallèle de 2 témoins positifs (hématies r'r et R0r) et d'1 témoin négatif (hématie rr)):

Incubation 15 min à 37° C et centrifugation

Observation de la présence ou non d'une réaction d'hémagglutination

Résultat recherche anti-D,-C et -G par FE		N=	Résultat recherche anti-G avec hématies D-C-G+
Sérum contenant un anti-D de titre élevé (32) (témoin)	1		1 Négatif / 1
Sérum contenant un anti-C seul de titre modéré (2) (témoin)	1		1 Négatif / 1
Sérum contenant un anti-D + un anti-C	2		2 Négatifs / 2
Sérum contenant un anti-C + un anti-G	5		5 Positifs / 5
Sérum contenant un anti-D + un anti-G	4		4 Positifs / 4
Sérum contenant un anti-D + un anti-D + un anti-G	3		3 Positifs / 3

Nouvelle stratégie :

Valeur prédictive négative : 100 %

Valeur prédictive positive: 100 %

Conclusion: Validation de cette nouvelle stratégie → Utilisation en routine au CNRHP depuis septembre 2018 du protocole suivant :

Si recherche négative avec hématie *r<sup>12</sup>G* : absence d'anti-G, présence d'une immunisation anti-D + anti-C nécessitant un suivi obstétrical rapproché en fonction des taux d'anticorps

Si recherche positive avec hématie *r<sup>12</sup>G* : présence d'anti-G → effectuer la technique par fixation-élution pour voir si immunisation anti-D +/- anti-C associée.

Si immunisation anti-D présente : nécessite d'un suivi obstétrical rapproché.

En l'absence d'immunisation anti-D: suivi pouvant être allégé, à adapter en fonction des taux d'anticorps (risque essentiellement postnatal). Prévoir une immunoprophylaxie par injection d'immunoglobulines anti-D chez la patiente