



INSTITUT NATIONAL DE LA TRANSFUSION SANGUINE

Comment expliquer les discordances de résultats entre le phénotypage et le génotypage de groupes sanguins

Thierry Peyrard

Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins
Institut National de la Transfusion Sanguine – Paris
UMR_S1134 Inserm/Université Paris Diderot
Laboratoire d'Excellence GR-Ex



Pourquoi est-il possible de réaliser un génotypage ?

- **ISBT Copenhague 2017: 354 antigènes officiellement reconnus, 40 gènes et 2 gènes associés (*GATA1* et *KLF1*)**
- **La base moléculaire de la plupart des antigènes et phénotypes est connue => possible de prédire un phénotype à partir de l'ADN génomique**
- **Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le polymorphisme de groupes sanguins**

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES

- (Single Nucleotide Polymorphism) => changement d'un seul acide aminé (mutation non-synonyme)

Fréquence > 1% dans la population générale

Antigène E c.676C>G exon 5 *RHCE*
p.Pro226Ala

Les SNPs représentent le mécanisme le plus fréquent

System	Gene	Polymorphism	SNP ^a	Amino acid change ^b
ABO	<i>ABO</i>	A/B	526C>G, 703G>A, 796C>A, 803G>C	R176G, G235S, L266M, G268A
MNS	<i>GYP A</i>	M/N	59C>T, 71G>A, 72T>G	S20L, G24E (S1L, G5E ^c)
		s/S	143C>T	T48M (T29M ^c)
RH	<i>RHCE</i>	c/c	48C>G, 178A>C, 203G>A, 307T>C	C16W, I60L, S68N, S103P
		e/E	676G>C	A226P
LU	<i>LU</i>	Lu ^b /Lu ^a	230G>A	R77H
		Au ^a /Au ^b	1615A>G	T539A
KEL	<i>KEL</i>	k/K	578C>T	T193M
		Kp ^b /Kp ^a	841C>T	R281W
		Js ^b /Js ^a	1790T>C	L597P
		Fy ^a /Fy ^b	125G>A	G42D
FY	<i>FY</i>	Fy ^b /Fy	-67T>C	Not coding
		JK ^a /JK ^b	838G>A	D280N
JK	<i>SLC14A1</i>	JK ^a /JK ^b	838G>A	D280N
DI	<i>SLC4A1</i>	Di ^b /Di ^a	2561C>T	P854E
YT	<i>ACHE</i>	Yt ^a /Yt ^b	1057C>A	M353N
SC	<i>ERMAP</i>	Sc1/Sc2	169G>A	G57R
DO	<i>DO</i>	Do ^b /Do ^a	793G>A	D265N
CO	<i>AQP1</i>	Co ^a /Co ^b	134C>T	A45V
LW	<i>ICAM4</i>	LW ^a /LW ^b	299A>G	Q100R (Q70R ^c)
CROM	<i>DAF</i>	Tc ^a /Tc ^b	155G>T	R52L (R18L ^c)
KN	<i>CRI</i>	Kn ^a /Kn ^b	4681G>A	V1561M
		McC ^a /McC ^b	4768A>G	K1590E
		SI ^a /Vil	4801A>G	R1601G
IN	<i>CD44</i>	In ^b /In ^a	137G>C	R46P

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES

- **Mutation faux sens**

Fréquence <1%

Antigène Vw c.140C>T exon 3 *GYPA*

p.Thr47**Met**

- **Mutation non sens => codon stop**

Phénotype Jr(a-) Allèle *ABCG2**01N.01 (Asie)

c.376C>T p.Gln126**Ter**

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES

• Délétion

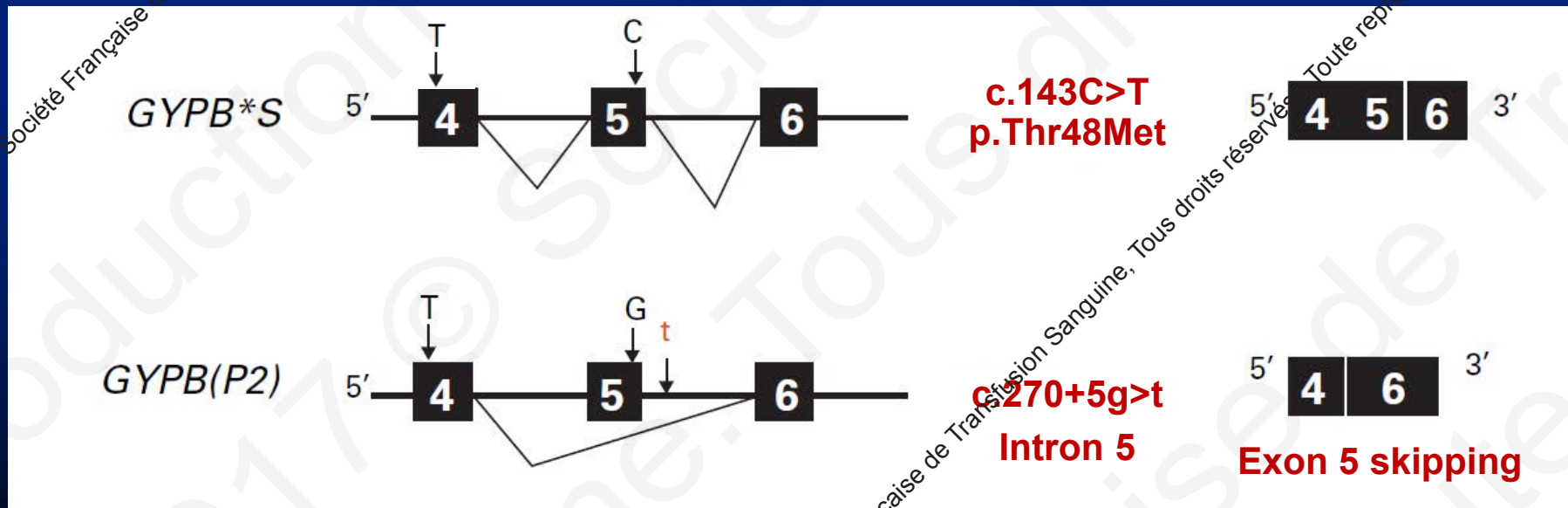
- Un seul nucléotide : phénotype O (allèle O^1)
c.261delG => frameshift (codon stop 118)
- Plusieurs nucléotides : Vel- (17 pb dans le gène *SMIM1*) => frameshift
- Exon : exon 2 *GYPC* chez groupe rare Ger-2,3 (Yus)
- Allèle : *RHD* (délétion homozygote chez les sujets européens D -)

• Duplication

Phénotype Jr(a-) Allèle *ABCG2*01N.11* (Caraïbes)
c.875_878dupACTT => frameshift => p.Phe293Leufs*8

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES

- **Insertion:** phénotype Jr(a-) allèle *ABCG2*01N.08* (France) c.542_543insA p.Phe182Valfs*14
- **Mutation "splice site" :** U+^{var} type P2 => U faible et partiel, pas d'antigène S détectable



Adapté de Storry JR et al. *Transfusion* 2003;43:1738-47

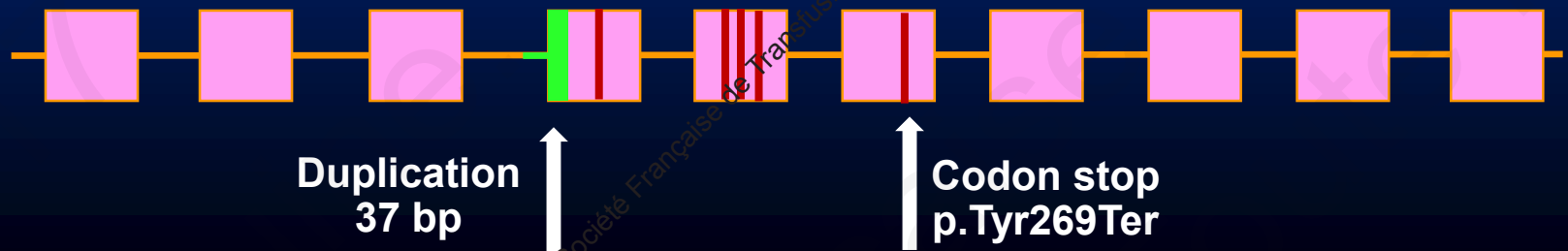
MÉCANISMES MOLÉCULAIRES

- **Mutation promoteur** : Fy(a-b-) chez les Africains, mutation c.-67t>c dans la boîte promotrice GATA (allèle *FY*02N.01*)

- **Mécanismes multiples**

Allèle silencieux *RHD ψ* : insertion de 37 pb à la fin de l'intron 3-début de l'exon 4 (frameshift avec codon stop 210), 4 mutations faux-sens (exons 4 et 5) et une mutation non-sens (exon 6). Très commun chez les Africains D-

*RHD*Psi*



MÉCANISMES MOLÉCULAIRES

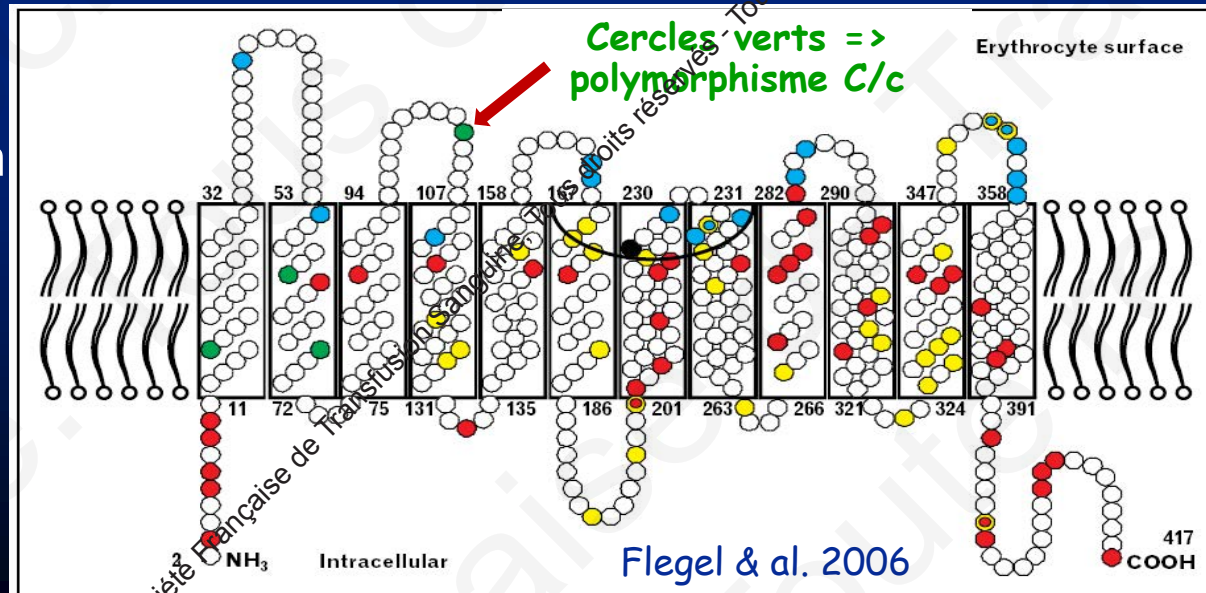
Autre exemple de mécanismes multiples

Polymorphisme C/c : 4 SNPs, 2 mutations silencieuses et une insertion intronique



c.307C>T
(p.Pro103Ser)
critique pour
expression de C

insertion
109 pb
intron 2



Polymorphism	Result
RhCE-P103S	BB
RhCE-109Ins	AB
RhCE-A226P	AA
RhCE-L245V	AA
RhCE-G336C	AA

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES

- Recombinaison entre gènes homologues (paralogues)** L'exemple typique est la "conversion génique", fréquemment rencontrée chez les variants RHD et RHCE

RHD haplotype R^N (Africains) *RHCE*



*RHD**D
D Normal

*RHCE**Ce-D(4)-Ce
C faible et partiel
e faible et partiel
Perte antigène public RH46
Gain de l'antigène privé RH32 (codé par la jonction exon 4D/5CE)

PHÉNOTYPAGE/GÉNOTYPAGE

- Le génotypage permet seulement de prédire un phénotype, car de nombreux motifs de discordances existent avec le phénotypage (faux positifs et faux négatifs)
- Mais le phénotypage peut aussi être sujet à des faux positifs et faux négatifs !

PHÉNOTYPAGE/GÉNOTYPAGE

En dehors de facteurs humains, qu'il ne faut pas négliger (erreur d'échantillonnage, absence de respect du protocole expérimental ou de traitement des résultats), **plusieurs raisons peuvent expliquer les discordances entre le phénotypage et le génotypage, avec 4 combinaisons possibles**

4 COMBINAISONS À L'ORIGINE DES DISCORDANCES

1. Phénotype faussement positif/génotype réellement négatif
2. Phénotype faussement négatif/génotype réellement positif
3. Phénotype réellement négatif/génotype faussement positif
4. Phénotype réellement positif/génotype faussement négatif

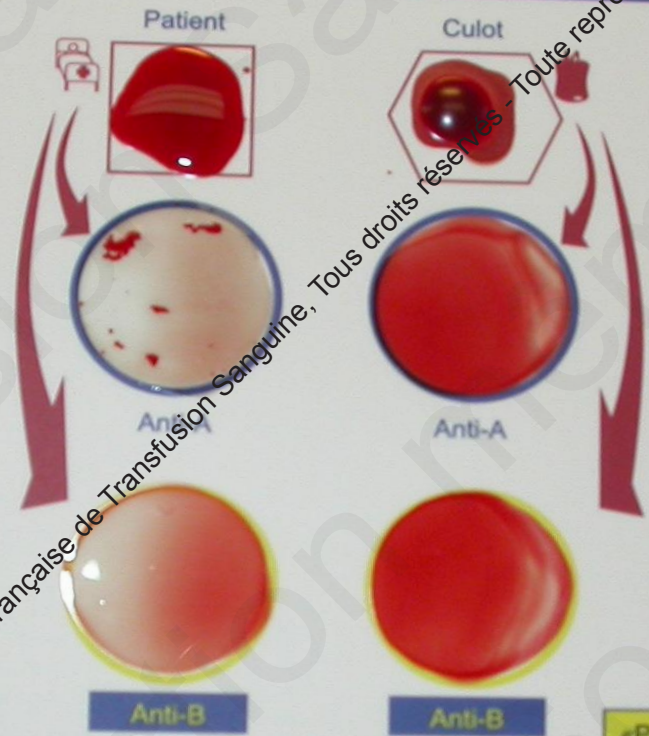
4 COMBINAISONS À L'ORIGINE DES DISCORDANCES

1. **Phénotype faussement positif/génotype réellement négatif**
2. **Phénotype faussement négatif/génotype réellement positif**
3. **Phénotype réellement négatif/génotype faussement positif**
4. **Phénotype réellement positif/génotype faussement négatif**

PHÉNOTYPE FAUSSEMENT POSITIF GÉNOTYPE RÉELLEMENT NÉGATIF

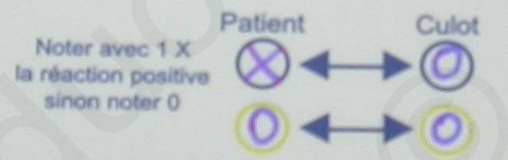
- TDA positif (IgG) quant le TIA est requis pour le phénotypage
- Patient dépourvu d'un antigène et récemment transfusé avec du sang contenant l'antigène correspondant
- Réactif polyclonal comportant un anticorps contaminant (anti-privé par ex.)
- Hématies polyagglutinables : exemple de l'activation des antigènes Tn cryptiques pouvant réagir avec certains clones d'Ac monoclonaux anti-A

Patient (Nom & Prénom)
Nom de jeune fille :
Date de naissance :



- 1 Déposer 1 de sang du patient dans et 1 de sang du culot dans .
- 2 Déposer 1 d'eau physiologique NaCl 0,9% dans les 4 alvéoles.
- 3 Prélever et déposer le sang en une seule fois dans chaque alvéole de la même colonne en changeant de spatule à chaque transfert puis mélanger en évitant toute contamination.
- 4 Lire les réactions après 1 minute, si une réaction est négative poursuivre obligatoirement la lecture à 3 minutes, puis interpréter.

«Pour un même réactif (même couleur), toute réaction positive avec le culot à transfuser et négative avec le patient **interdit la transfusion.**»



En cas de doute, contacter le médecin encadrant la transfusion.

Conclusion : transfuser OUI - NON

LOT /
311000
2014-11

Qu'en pensez-vous ?

Patient hospitalisé en onco-hématologie avec deux déterminations ABO récentes : groupe O !

Après avoir vérifié le "bedside test", l'infirmière contacte le laboratoire => demande de contrôle du groupe sanguin sur un nouveau prélèvement

Patient confirmé de groupe O !



Phénomène de polyagglutinabilité

“Polyagglutination is poorly understood by most students and even more poorly understood by most blood bank physicians.”

<http://www.bbguuy.org/education/polyagglutination.asp>

Révélation (activation) d'un antigène cryptique (caché) à la surface du globule rouge



=> agglutination des hématies « activées » par la plupart des plasmas humains ABO compatibles car présence des anticorps naturels réguliers correspondants chez l'Homme, de titre +/- élevé

Deux grands types de polyagglutinabilités acquises

<p>Polyagglutinabilités acquises (« activation ») suite à infections</p>	<p>Polyagglutinabilité acquise (« activation ») de type maligne</p>
<p>T (<i>Hübener-Thomsen- Friedenreich phenomenon</i>)</p> <p>Tk Th Tx</p> <p>B acquis</p>	<p>Tn</p>

**Anticorps anti-T, anti-Tn, etc. présents à l'état naturel
régulier dans la plupart des plasmas humains**

POLYAGGLUTINABILITÉ T_n

- **Acquise suite à processus malin**
- **Phénomène persistant**
- **Mutation somatique clonale**
- **Antigène T_n : sucre immunodominant identique à celui de l'antigène A :
N-acétyl-galactosamine => réactions croisées avec certains réactifs anti-A monoclonaux**

PHÉNOTYPE FAUSSEMENT POSITIF GÉNOTYPE RÉELLEMENT NÉGATIF

Réactifs monoclonaux montrant des réactions croisées avec certains antigènes : exemple de certains clones d'anti-M (2514E6 et M-11H2) montrant de fortes réactions croisées avec l'antigène He (Henshaw, MNS6)

PERFORMANCE DATA

A performance assessment of the reagents was conducted on a random samples panel of known common phenotypes including clinical and neonatal samples. The samples were drawn in the recommended anticoagulants (E.D.T.A., heparin, citrate). The expert assessment demonstrated 100 % specificity for each of the reagents with respect to the expected results.

ANTI-M (MNS1) can recognize unspecifically some HENSCHAW red blood cells (M -, He + is an extremely rare phenotype).

~7%-10 des sujets d'Afrique sub-saharienne sont
He+

PHÉNOTYPE FAUSSEMENT POSITIF GÉNOTYPE RÉELLEMENT NÉGATIF

- Gènes hybrides

haplotype (C)ce^S type 1

RHD

RHCE



*RHD**DIIIa-ce(4-7)-D

Pas de D

**C faible avec clone
MS24. C partiel**

*RHCE**ce^S or *RHCE**ce48C,733G,**1006T**

c partiel

e partiel (hr^{B-})

Perte de l'antigène public Hr^B (RH34)

Pas de C au niveau génétique !

PHÉNOTYPE FAUSSEMENT POSITIF GÉNOTYPE RÉELLEMENT NÉGATIF

- Expression d'épitopes par un allèle variant homologue

RHCE*ceTI* encodes partial c and partial e and is often in cis to *RHD*DIVa

TRANSFUSION 2013;53:741-746.

Connie M. Westhoff, Sunitha Vege, Christine Halter Hipsky, Kim Hue-Roye, Tamar Copeland, Randall W. Velliquette, Trina Horn, Christine Lomas-Francis, and Marietta E. Reid

CONCLUSIONS: *RHD*DIVa* and *RHCE*ceTI* almost always, but not invariably, travel together. This haplotype is found in people of African ancestry and the RBCs can demonstrate aberrant reactivity with anti-C. *RHCE*ceTI* encodes partial c and e antigens. We confirm that *RHD* zygosity assays are unreliable in samples with *RHD*DIVa*.

Pas de C au niveau génétique, mais possible faible réactivité C due à l'allèle *RHD*DIVa*

4 COMBINAISONS À L'ORIGINE DES DISCORDANCES

1. Phénotype faussement positif/génotype réellement négatif
2. Phénotype faussement négatif/génotype réellement positif
3. Phénotype réellement négatif/génotype faussement positif
4. Phénotype réellement positif/génotype faussement négatif

PHÉNOTYPE FAUSSEMENT NÉGATIF GÉNOTYPE RÉELLEMENT POSITIF

- Patient possédant un antigène et récemment transfusé de manière massive avec du sang dépourvu de l'antigène correspondant
- Phénotype partiel, non réactif avec certains clones (ex. D partiel DVI ne réagissant pas avec certains clones d'anti-D)
- Antigènes très faiblement exprimés, en dessous du seuil de détection de la technique : D et DEL, Fy^b et Fy^x, Lu^b et In(Lu), etc.

PHÉNOTYPE FAUSSEMENT NÉGATIF GÉNOTYPE RÉELLEMENT POSITIF

Exemple typique du phénotype rare $ln(Lu)$, apparaissant la plupart du temps $Lu(a-b-)$ alors qu'il s'agit d'un phénotype $Lu(a-b+^w)$

Mutation dans le gène *KLF1* (mécanisme dominant), codant pour le facteur de transcription EKLF qui active le gène *LU/BCAM*

PHÉNOTYPE FAUSSEMENT NÉGATIF GÉNOTYPE RÉELLEMENT POSITIF

RESEARCH ARTICLE

Human Mutation

OFFICIAL JOURNAL



HUMAN GENOME
VARIATION SOCIETY

www.hgvs.org

Molecular Analysis of the Rare In(Lu) Blood Type: Toward Decoding the Phenotypic Outcome of Haploinsufficiency for the Transcription Factor KLF1

Virginie Helias,^{1†} Carole Saison,^{1†} Thierry Peyrard,^{1,2} Eliane Vera,^{1,2} Claude Prehu,³ Jean-Pierre Cartron,¹ and Lionel Arnaud^{1*}

¹National Institute of Blood Transfusion (INTS), Paris, France; ²National Reference Center for Blood Groups (CNRGS), Paris, France; ³Laboratoire de Biochimie et Génétique, CHU Hôpital Henri Mondor, Créteil, France

Communicated by Sergio Ottolenghi

Received 2 June 2012; accepted revised manuscript 30 August 2012.

Published online 3 October 2012 in Wiley Online Library (www.wiley.com/humanmutation). DOI: 10.1002/humu.22218

PHÉNOTYPE FAUSSEMENT NÉGATIF GÉNOTYPE RÉELLEMENT POSITIF

Supp. Table S3B: *KLF1* haplotypes found in the 10 unrelated In(Lu) subjects analyzed in this study

In(Lu) subject	Mutation causing the In(Lu) blood type	Haplotype [€]
2751 WEC	p.Ala104GlyfsTer249	p.[Ser102Pro; =; Phe182Leu]+[=; Ala104GlyfsTer249; =]
11218 KAI	p.Gly174ArgfsTer179	p.[=]+[Gly174ArgfsTer179]
11595 MAC	p.Gly176ArgfsTer179	p.[Ser102Pro; =]+[=; Gly176ArgfsTer179]
3269 JAM	p.Pro190LeufsTer47	p.[=; =]+[Ser102Pro; Pro190LeufsTer47]
1487 ASS	p.Tyr197Ter	p.[=; =]+[Ser102Pro; Tyr197Ter]
2236 SAI	p.Leu222SerfsTer15	p.[=; Ala104Val; =]+[Ser102Pro; =; Leu222SerfsTer15]
22665 FOU	p.Lys288Glu	p.[=]+[Lys288Glu]
15293 CRA	p.Arg319GlufsTer34	p.[=]+[Arg319GlufsTer34]
11908 PAR	p.Leu326Arg	p.[Ser102Pro; =]+[=; Leu326Arg]
22990 DEM	p.His357Gln	p.[Ser102Pro; Phe182Leu; =]+[Ser102Pro; =; His357Gln]

PHÉNOTYPE FAUSSEMENT NÉGATIF GÉNOTYPE RÉELLEMENT POSITIF

- Réactifs peu performants : exemple des réactifs anti-U du commerce, ne pouvant pas détecter les sujets S-s-U+^{var} (considérés à tort comme U-)
- Altération des hématies avec destruction de certains antigènes (bactéries), contamination par une enzyme (papaine)
- « Blocking phenomenon ». Exemple typique d'un anti-D maternel de haut titre pouvant bloquer tous les sites antigéniques D des hématies d'un nouveau-né D+, apparaissant alors à tort D-

4 COMBINAISONS À L'ORIGINE DES DISCORDANCES

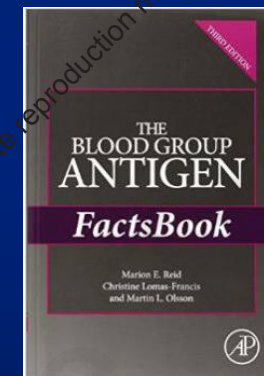
1. Phénotype faussement positif/génotype réellement négatif
2. Phénotype faussement négatif/génotype réellement positif
3. Phénotype réellement négatif/génotype faussement positif
4. Phénotype réellement positif/génotype faussement négatif

PHÉNOTYPE RÉELLEMENT NÉGATIF GÉNOTYPE FAUSSEMENT POSITIF

- **Allèle silencieux** : allèle présent mais non exprimé (*null*).

Mutation dans la séquence codante du gène

JK*02N.01	Intron 5	IVS5-1 g>a	Exon 6 skipped; in frame	Polynesian, Chinese (Several)
JK*02N.02	Intron 5	IVS5-1 g>c	Exon 6 skipped; in frame	Chinese (Rare)
JK*02N.03	5	222C>A, 499A>G	Asn74Lys, Met167Val	Taiwanese (Rare)
JK*02N.04	Intron 7	IVS7+1 g>t	Exon 7 skipped; frameshift→ Leu223Stop	French (Rare)
JK*02N.05	8	723delA	Frameshift→ Ile262Stop	Hispanic American (Rare)
JK*02N.06	9	871T>C	Ser291Pro	Finns (Several)



Mutation "Finn" assez fréquente en Finlande, incluse dans certains systèmes de génotypage afin d'éviter le risque d'un faux positif pour Jk^b

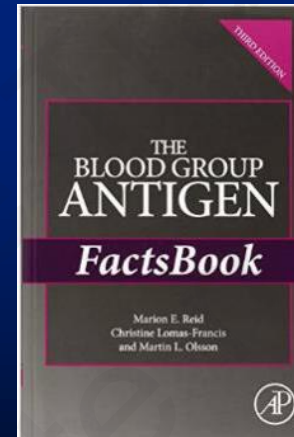
PHÉNOTYPE RÉELLEMENT NÉGATIF GÉNOTYPE FAUSSEMENT POSITIF

- Allèle silencieux** : allèle présent mais non exprimé (null)
Mutation dans la séquence du promoteur du gène

Allele name	Exon	Nucleotide	Amino acid	Ethnicity (prevalence)
FY*01N.05	2	327delC	fs, Stop ²	(Rare)
FY*02N.01	Promoter	-67t>c [^]	Protein absent from RBCs	Blacks (Common);Arabs, Jews, Romany (Several);Caucasians (Rare)

Cette mutation est si fréquente en Afrique subsaharienne (70 - 100%) qu'elle doit impérativement être incluse dans les dispositifs de génotypage

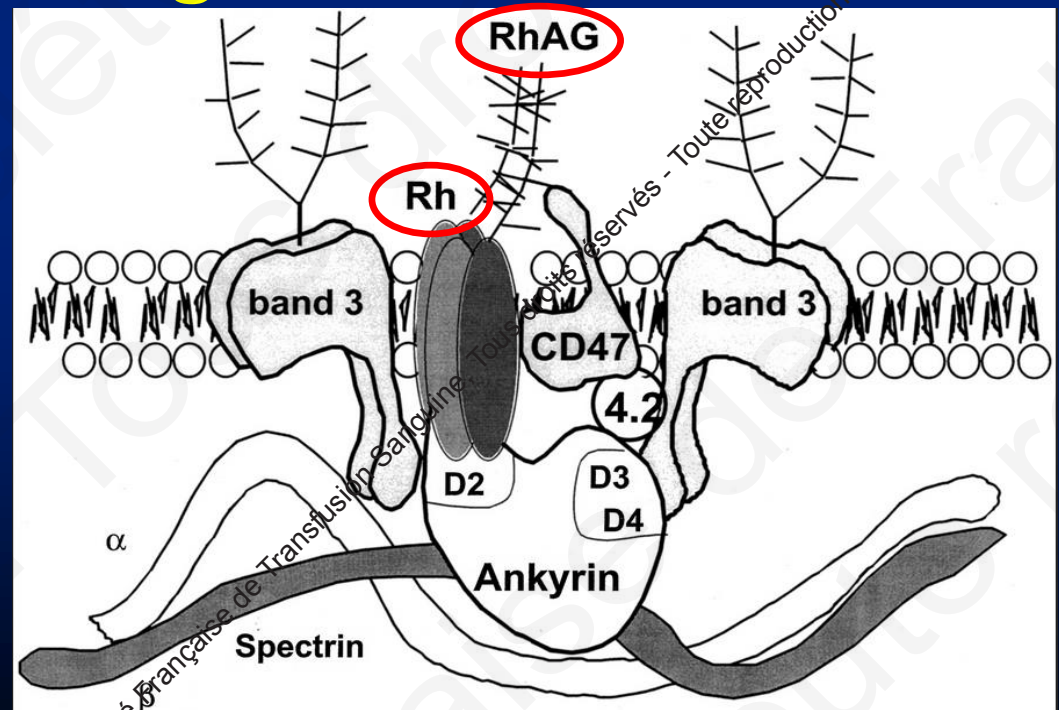
[^]=This GATA-1 nucleotide change has been reported previously at -33 and -46. The gene is silenced only in erythroid cells.



PHÉNOTYPE RÉELLEMENT NÉGATIF GÉNOTYPE FAUSSEMENT POSITIF

- Interaction protéine-protéine à la surface du globule rouge => lien fonctionnel entre des systèmes de groupes sanguins

Le complexe Rh

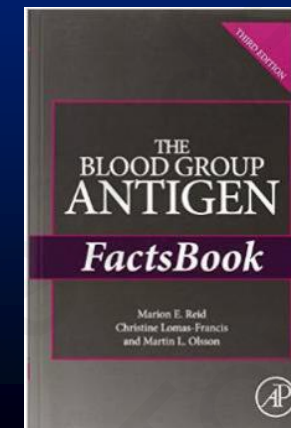


PHÉNOTYPE RÉELLEMENT NÉGATIF GÉNOTYPE FAUSSEMENT POSITIF

Allele name	Exon (intron)	Nucleotide
RHAG*01N.01	2	154-157CCTC>GA
RHAG*01N.02	8	1086delA
RHAG*01N.03	Intron 1	IVS1+1g>a
RHAG*01N.04	Intron 6	IVS6+1g>a
RHAG*01N.05	Intron 6	IVS6-1g>a
RHAG*01N.06	Intron 6	IVS6-1g>t
RHAG*01N.07	Intron 7	IVS7+1g>a
RHAG*01N.08	6	808G>A [^] 838G>A
RHAG*01N.09	6	836G>A
RHAG*01N.10	8	1094T>G
RHAG*01N.11	9	1139G>T
RHAG*01N.12	5	762C>A

Exemples d'allèles **RHAG**
silencieux

Les sujets mutés
homozygotes ou
hétérozygotes composites
sont Rh_{null} (D-C-E-c-e-),
quel que soit leur statut
RHD/RHCE



4 COMBINAISONS À L'ORIGINE DES DISCORDANCES

1. Phénotype faussement positif/génotype réellement négatif
2. Phénotype faussement négatif/génotype réellement positif
3. Phénotype réellement négatif/génotype faussement positif
4. Phénotype réellement positif/génotype faussement négatif

PHÉNOTYPE RÉELLEMENT POSITIF GÉNOTYPE FAUSSEMENT NÉGATIF

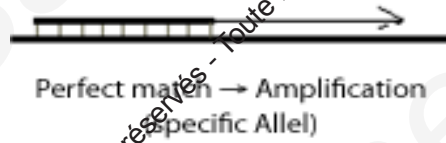
Allele drop-out ("allelic dropout")

Principal mécanisme : absence d'amplification d'un allèle due à la présence d'un polymorphisme ($F > 1\%$) ou d'une mutation ($F < 1\%$) au niveau du primer d'amplification PCR

=> Toujours avoir ceci à l'esprit, d'autant plus lorsque l'on met au point une technique maison (de nombreux logiciels permettent de limiter ce problème)

PCR ALLELE SPECIFIQUE (ASP/SSP)

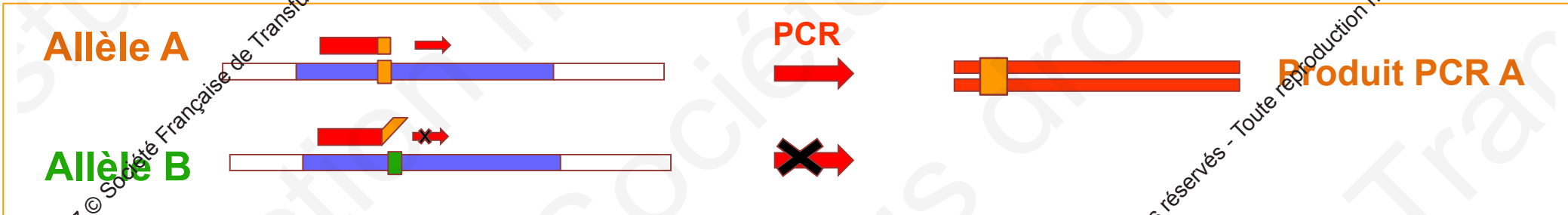
Principle of Sequence-Specific-Primer-(SSP) PCR



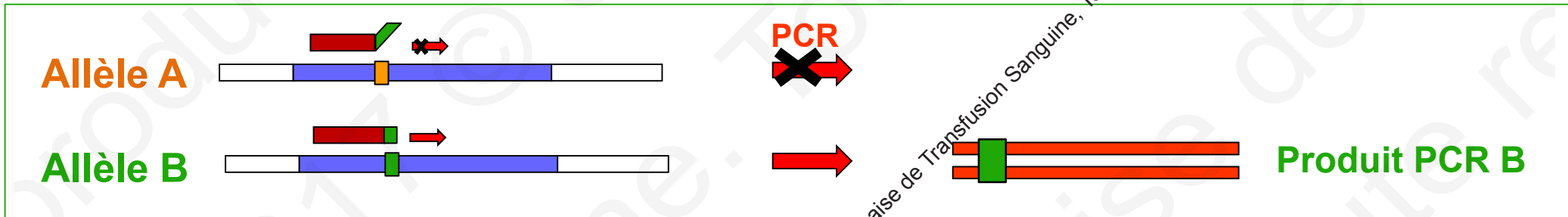
Primers spécifiques => amplification d'un allèle par réaction PCR (2 tubes réactionnels)

Exemple d'un hétérozygote A/B (A sauvage, B mutant)

PCR 1A (tube 1)



PCR 2B (tube 2)



PCR ALLELE SPECIFIQUE (ASP/SSP)

Présence d'un polymorphisme ou mutation à l'intérieur de la séquence reconnue par le primer spécifique de l'allèle A

PCR 1A (tube 1)

Allèle A



PCR



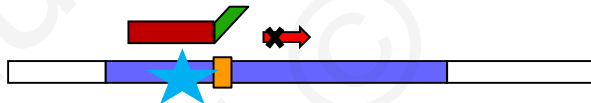
Pas de produit de PCR A

Allèle B



PCR 2B (tube 2)

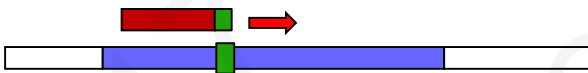
Allèle A



PCR



Allèle B



Produit de PCR B

=> Conclusion à tort d'un génotype **B/B** (mutant homozygote), alors que le sujet est hétérozygote **A/B** !

PHÉNOTYPE RÉELLEMENT POSITIF GÉNOTYPE FAUSSEMENT NÉGATIF

Example of
allele drop-out

V+ (RH:10)
phenotype but
predicted to be
V- by some
genotyping
platform

4D-526-04

ALLELE DROP-OUT AS A POSSIBLE CAUSE FOR DISCREPANT V GENOTYPING

Moulds M¹, Billingsley L², Noumsi T¹ and Ochoa J¹

¹Grifols, San Marcos, TX, United States of America; ²LifeShare Blood Centers, Shreveport, LA, United States of America

Background: The V antigen is common in persons of African descent and its expression is linked to VS. Because of the relatively high frequency of these antigens in the Black population, sickle cell disease (SCD) patients have an increased exposure rate when transfused with incompletely matched blood and V negative patients often make anti-V. Most *RHCE* alleles coding for V have a guanine nucleotide (G) at *RHCE* positions c.733 and c.1006; thus, these two positions can be used to genotype for V. Genotyping to select V negative units for SCD patients may be more feasible since anti-V sera are not readily available.

Aims: During validation of the IDCORE-XT (Progenika) genotyping platform, we noted several discrepancies for the V antigen when compared to HEA (Immucor). The aim of the study was to perform a root cause analysis to determine which assay was producing incorrect results.

Methods: A comparison of 139 VS+V+ or VS+V- Black blood donors was made between the two genotyping platforms; HEA uses an elongation method while IDCORE-XT uses probe-hybridization for allele detection. When indicated, confirmation of red cell phenotype was done using several anti-V sera. Genomic sequencing of *RHCE* exon 7 was performed to resolve discordant results. Later, sequencing was done on an additional 45 samples genotyped as *RHCE**ce733G,1006G by HEA in order to determine the prevalence of the SNP responsible for the discrepancy.

Results: Using HEA, 10 of the 139 samples (7.2%) genotyped as homozygous for *RHCE**ce733G,1006T with a predicted phenotype of VS+V-. These same samples typed heterozygous (*RHCE**ce733G,1006T; *RHCE**ce733G,1006G) by IDCORE-XT with a predicted phenotype VS+V+. Genomic sequencing revealed the presence of a polymorphism c.941T>C near the 5' end of exon 7 in all 10 samples. An additional 45 samples (90 alleles) that were genotyped as homozygous *RHCE**ce733G,1006G by

Vox Sang
2015;109
(Suppl1):60

PHÉNOTYPE RÉELLEMENT POSITIF GÉNOTYPE FAUSSEMENT NÉGATIF

Allele drop-out

Possible autres origines qu'un polymorphisme ou une mutation au niveau d'un primer d'amplification de PCR => peut apparaître de manière aléatoire en raison de multiples raisons techniques et environnementales

PHÉNOTYPE RÉELLEMENT POSITIF GÉNOTYPE FAUSSEMENT NÉGATIF

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 17, No. 5, September 2015



the Journal of
Molecular
Diagnostics

jmd.amjpathol.org

Risk of Misdiagnosis Due to Allele Dropout and False-Positive PCR Artifacts in Molecular Diagnostics

Analysis of 30,769 Genotypes

Jonatan Blais,^{*†‡} Sébastien B. Lavoie,^{*} Sylvie Giroux,[†] Johanne Bussi eres,[†] Carmen Lindsay,[†] Jacqueline Dionne,^{*} M elissa Laroche,^{*} Yves Gigu ere,^{*†§} and Fran ois Rousseau^{*†‡§}

From the Service of Medical Biochemistry,^{*} Department of Medical Biology, and the Human and Molecular Genetics Research Unit,[†] Research Center, CHU de Qu ebec, Quebec City; the Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry, and Pathology,[‡] Faculty of Medicine, Universit e Laval, Quebec City; and the APOGEE-Net/CanG eneTest Research and Knowledge Network on Genetic Health Services and Policy,[§] Quebec City, Quebec, Canada



PHÉNOTYPE RÉELLEMENT POSITIF GÉNOTYPE FAUSSEMENT NÉGATIF

dropout event. In the latter case, however, amplification failures of specific alleles occur nonrandomly (a phenomenon sometimes referred to as null alleles¹¹). This may happen when one of the primers used cannot stably hybridize to its specific complementary sequence binding site, as is the case whenever the binding sequence on one allele of the sample is different from the consensus sequence used to design the primers, due to sequence variants or indels hitchhiking with the target.^{10,12,13}

Alternatively, similar nonrandom amplification failures can also result from polymerase-hindering secondary structures induced by polymorphisms, GC content, or other allele-specific features of the target sequence itself,¹⁴ possibly via a delaying effect on amplification of the affected allele in early reaction cycles that result in the competitive preferential amplification of the alternate allele.^{12,15} In fact, these phenomena are sometimes purposely exploited, for example, in the use of GC clamps or the deliberate insertion of mismatches to enhance specificity or to selectively amplify and detect certain targets over closely related alleles or paralog/ortholog loci.^{16,17}

Even though PCR is considered to be a robust technology that generally provides reliable results, erroneous genotypes do occur. One problem associated with PCR of diploid genomic DNA is the occasional amplification failure of one of the two alleles at a given locus, a phenomenon termed allele dropout. Allele dropout has long been recognized as a potentially important problem for PCR-based applications (see Schulze et al⁵ and Comey and Budowle⁶), and recent Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines recommend that assay development and quality control should include measures aimed at both detecting allele dropout and minimizing its occurrence.⁷ In a competitive reaction such as PCR, failure of amplification of one of two alleles at any single target locus may be due to either sequence independent factors or allele-specific sequence variations. In the former case, it might be caused by a variety of sampling and/or molecular events (eg, variations in DNA extraction quantity or quality, presence of PCR inhibitors, variations in pipetting volumes of reagents or templates, imprecisions in thermocycler temperatures, etc.) occurring unpredictably and independently of the patient's genotype and are expected to affect either of the two alleles of a genome with equal probability.⁸⁻¹⁰ Such cases are usually not reproducible, and reanalysis of the sample might often provide acceptable results with resolution of the allele dropout event. In the latter case, however, amplification

ÉTUDES DE CAS

2017 © Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle

© Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite

CAS N°1

- **Patiente avec un groupe rare K+k-**
- **Deux filles K-**
- **Qu'en pensez-vous ?**

CAS N°1

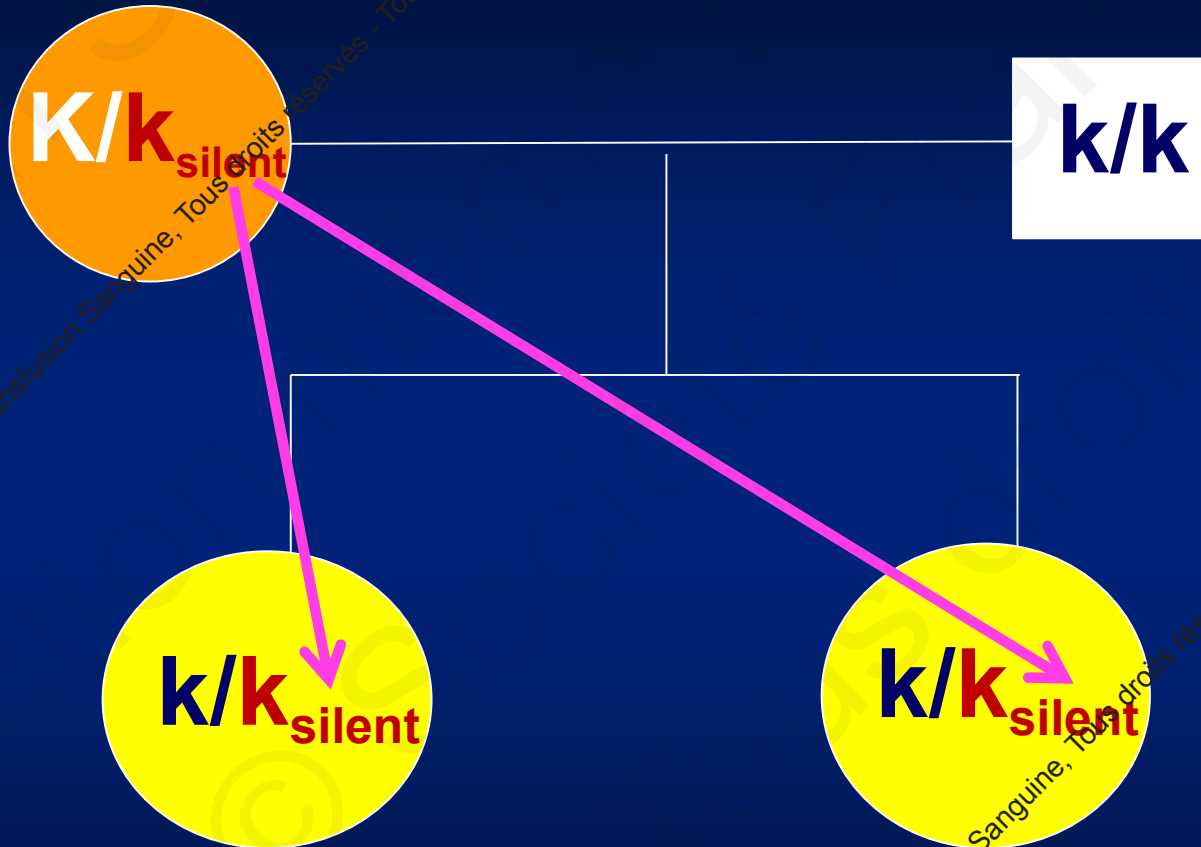
- Patiente K+k-
- Deux filles K-



CAS N°1

- Génotypage *KEL* : *KEL**01/*KEL**02 => phénotype **K+k+** attendu !
- Séquençage du gène *KEL* : mutation responsable d'un allèle *KEL**02 non fonctionnel => **allele k silencieux**

CAS N°1



**7.4 % des sujets K+k- portent un allèle *k* silencieux !
(*KEL*02N*) en France
(Martin-Blanc S. *Transfusion* 2013)**

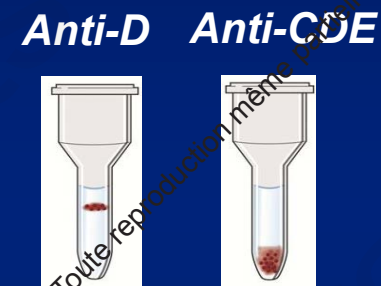
CAS N°2

2017 © Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle

© Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite

CAS N°2

- Patient de 37 ans d'origine européenne
 - D+C-E-c+e+ mais résultat atypique pour D
 - **4+ avec réactif monoclonal anti-D**
 - **1+ avec réactif anti-CDE**
 - **CNRGS**
 - 4+ avec réactif monoclonal anti-D
 - Négatif avec anti-D polyclonal
- ⇒ **Profil de réactivité inattendu !**



CAS N°2

Investigations moléculaires

Pas de gène *RHD* !

Comment alors expliquer la forte réactivité
D avec certains clones d'anti-D?

Quand on ne comprends pas ce qui se
passe du côté du gène *RHD*, on investigate
le gène *RHCE*...



CAS N°2

- **RHCE** : exon 5 **RHCE** remplacé par exon 5 **RHD** (conversion génique)

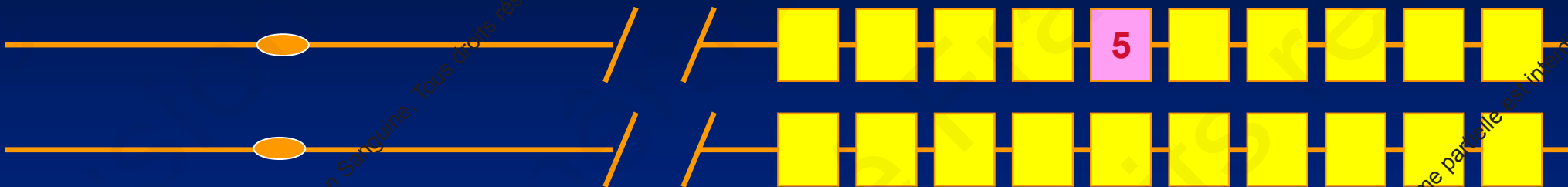


- ⇒ Allèle hybride **RHCE*ce-D(5)-ce**, également dénommé **RHCE*ceHAR**. Haplotype appelé R_o^{Har} et phénotype **DHAR**
- ⇒ Code pour quelques épitopes de D (D partiel) et pour un antigène privé (RH33, DHAR)
- ⇒ **Fortement positif avec certains clones anti-D (MS201, NaTH28-3C11)**

CAS N°2

RHD (délété)

RHCE



d/d

*RHCE*ceHAR/RHCE*ce*

Surtout retrouvé chez les Européens, avec une prévalence plus importante en Allemagne et Est de la France

Doit recevoir du sang D négatif !



D'autres allèles *RHCE* peuvent exprimer des épitopes D :
*RHCE*ceCF* (Crawford), *RHCE*ceSL*, *RHCE*ceRT*

CONCLUSION

2017 © Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle

© Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite

QUE FAIRE SI UNE DISCORDANCE EST MISE EN ÉVIDENCE OU SUSPECTÉE

- **Techniques spécialisées requises : séquençage d'ADN génomique et parfois étude de l'ADNc après extraction de l'ARNm**
- **Certains cas demeurent toutefois inexplicables, malgré toutes les investigations engagées !**

PRINCIPAUX MESSAGES

- Le phénotypage est censé être le « gold standard » mais il peut aussi être sujet à des faux positifs et faux négatifs !
- Le génotypage permet seulement de prédire le phénotype
- **Les allèles silencieux sont la principale source de faux positifs pour le génotypage ; l'allele dropout est la principale cause de faux négatifs pour le génotypage** => suivi +++ dans le temps des dispositifs de génotypage et dans différents types de populations. Important de rapporter toute anomalie au fabricant et si nécessaire initier une réactovigilance

**MERCI POUR VOTRE
ATTENTION**