



UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2

FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2015

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Mise au point du séquençage des gènes *FUT1* et *FUT2* et applications
au Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins :**
***Étude de 70 échantillons H-déficients ou "Bombay" référencés dans le
registre national des sujets présentant un phénotype érythrocytaire rare***

Présentée et soutenue publiquement le 12 octobre 2015 à 14 heures
Pôle Recherche

Par Guillaume Letizia

JURY

Président :

Madame le Professeur Sophie Susen

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Jacques Chiaroni

Madame le Docteur Julie Leclerc

Madame le Docteur Odile Fontaine

Directeur de Thèse :

Monsieur le Docteur Thierry Peyrard

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Liste des abréviations

AA	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BET	Bromure d'éthidium
BNSPR	Banque Nationale de Sang de Phénotype Rare
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CGR	Concentré de globules rouges
CNRGS	Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins
CNRHP	Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale
dNTP	Déoxynucléotide triphosphate
ddNTP	Didéoxynucléotide triphosphate
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
EDC	Épreuve de compatibilité
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
EFS	Établissement Français du Sang
Gal	Galactose
GalNAc	N-acétylgalactosamine
Glc	Glucose
GlcNAc	N-acétylglucosamine
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HGNC	<i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>
Ig	Immunoglobuline
INTS	Institut National de la Transfusion Sanguine
ISBT	<i>International Society of Blood Transfusion</i>
N/A	Non applicable
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>

Pb	Paire de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PSL	Produit sanguin labile
RAI	Recherche d'agglutinines irrégulières
SFTS	Société Française de Transfusion Sanguine
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TIA	Test indirect à l'antiglobuline
Tm	<i>Melting temperature</i> (température de fusion ou de dénaturation)
UTR	<i>Untranslated region</i> (région [transcrite] non traduite [d'un gène])
UV	Ultra-violet

Table des matières

Résumé	1
Introduction	2
I. Un bref aperçu des groupes sanguins	2
II. Nomenclatures et terminologie	4
A. Nomenclatures des groupes sanguins	4
B. Antigène de groupe sanguin	4
C. Système de groupe sanguin.....	5
III. Le système de groupe sanguin ABO (ISBT 001)	6
A. Antigènes et phénotypes du système ABO	6
B. Biochimie du système ABO	7
C. Base génétique du système ABO.....	11
IV. Le système de groupe sanguin H (ISBT 018)	12
A. L'antigène H1	12
B. Biochimie du système H.....	13
1. La protéine FUT1 (H)	13
2. La protéine FUT2 (SE)	14
C. Base génétique du système H.....	14
1. Le gène <i>FUT1</i>	14
2. Le gène <i>FUT2</i>	16
V. Le système de groupe sanguin LE (ISBT 007)	17
VI. Les phénotypes érythrocytaires H-déficients	19
A. Le phénotype « Bombay »	19
B. Le phénotype « Réunion »	20
C. Les phénotypes H-déficients sporadiques.....	22
VII. Objectifs de l'étude.....	25
Matériels et méthodes.....	26
I. Échantillons inclus	26
A. Origine des échantillons	26
B. Critère d'inclusion.....	26
C. Décongélation des échantillons.....	26
II. Analyses génomiques par PCR et séquençage selon Sanger	27
A. Conception des amorces de PCR et de séquençage.....	27
1. Sélection des séquences de référence pour <i>FUT1</i> et <i>FUT2</i>	27
2. <i>Design</i> et commande des amorces	28
a) Primer-BLAST	28
b) SNPCheck3.....	29
c) Fabrication des amorces	29
B. Extraction et quantification de l'ADN génomique.....	29
1. Extraction de l'ADN génomique	29
2. Évaluation quantitative et qualitative des ADNs extraits.....	30
C. Amplification par PCR des gènes <i>FUT1</i> et <i>FUT2</i>	30
1. Mix d'amplification	30
2. Protocole d'amplification	31
3. Analyse préalable des produits de PCR par électrophorèse	31

D.	Séquençage des gènes <i>FUT1</i> et <i>FUT2</i>	31
1.	Purification ExoSAP-IT des produits de PCR.....	31
2.	Réactions de séquence.....	32
3.	Purification en colonne des produits de séquence.....	34
4.	Électrophorèse capillaire.....	34
E.	Interprétation des séquences.....	35
1.	Lecture des séquences.....	35
2.	Interprétation des mutations : bases de données et logiciels de prédiction.....	36
III.	Analyses sérologiques.....	37
A.	Données sérologiques rétrospectives.....	37
B.	Techniques sérologiques utilisées.....	37
C.	Réactifs anti-H1 utilisés dans l'étude.....	37
1.	Réactifs humains.....	37
a)	Titrages.....	37
b)	Fixations-élutions.....	38
2.	Réactifs monoclonaux.....	38
D.	Étude phénotypique de l'antigène H des échantillons.....	38
E.	Étude phénotypique des antigènes A et B des échantillons.....	39
	Résultats.....	40
I.	Échantillons inclus.....	40
A.	Diagramme de flux.....	40
B.	Caractéristiques initiales des échantillons inclus.....	40
II.	Analyses génomiques par PCR et séquençage selon Sanger.....	42
A.	Amplification par PCR des gènes <i>FUT1</i> et <i>FUT2</i>	42
B.	Résultats du séquençage des gènes <i>FUT1</i> et <i>FUT2</i>	43
1.	Données globales.....	43
2.	Interprétation des données de séquence.....	46
a)	Les mutations de <i>FUT1</i> non répertoriées par l'ISBT.....	46
b)	Les mutations de <i>FUT1</i> atypiques répertoriées par l'ISBT.....	48
i.	<i>Mutations entraînant une protéine FUT1 inactive</i>	48
ii.	<i>Mutations entraînant une protéine FUT1 partiellement active</i>	52
c)	Les mutations de <i>FUT1</i> entraînant les phénotypes « Bombay » et « Réunion ».....	54
i.	<i>Haplotype « Bombay »</i>	54
ii.	<i>Haplotype « Réunion »</i>	54
III.	Analyses sérologiques.....	55
A.	Données sérologiques rétrospectives.....	55
1.	Phénotypes ABO.....	55
2.	Recherche d'agglutinines irrégulières.....	55
B.	Caractéristiques des réactifs anti-H.....	58
1.	Titrages des anti-H issus de sujets H:-1 « Bombay ».....	58
2.	Fixations-élutions.....	58
3.	Réactifs anti-H1 monoclonaux.....	58
C.	Étude phénotypique de l'antigène H des échantillons.....	59
D.	Étude phénotypique des antigènes A et B des échantillons.....	61
IV.	Applications de l'étude.....	66
A.	Mise à jour du phénotype H des sujets étudiés dans le registre national..	66
B.	Mise à jour du phénotype des CGR H-déficients congelés à la Banque Nationale de Sang de Phénotype Rare.....	67
C.	Optimisation du diagnostic sérologique des sujets de phénotype H-déficient au CNRGS.....	68

1. Phénotypage	68
2. RAI	69
Discussion	70
I. Réflexions sur le système de groupe sanguin H.....	70
II. Résultats principaux de l'étude	70
A. Résultats généraux	70
B. Comparaison à la littérature	72
1. Généralités	72
2. Cas particuliers.....	74
III. Résultats secondaires	74
IV. Applications	76
V. Forces et limites de l'étude	77
VI. Perspectives	78
Conclusion.....	80
Références bibliographiques	81
Annexes	88
Annexe 1.1 : Séquence codante du gène <i>FUT1</i> (NM_000148)	88
Annexe 1.2 : Séquence codante du gène <i>FUT2</i> (NM_000511).....	89
Annexe 2 : Résultats SNPCheck pour <i>FUT1</i> et <i>FUT2</i>	90
Annexe 3.1 : Fiche d'analyse du séquençage de <i>FUT1</i>	91
Annexe 3.2 : Fiche d'analyse du séquençage de <i>FUT2</i>	92
Annexe 4 : Résultats du séquençage des gènes <i>FUT1</i> et <i>FUT2</i>	93
Annexe 5 : Poster ISBT Londres 2015 relatif à l'échantillon 983-SCT.....	96
Annexe 6 : Phénotype ABO des sujets séquencés pour <i>FUT1</i>	97
Annexe 7 : Antécédents de RAI des sujets séquencés pour <i>FUT1</i>	98
Annexe 8 : Résultats de l'étude de l'expression d'antigène H.....	100
Annexe 9 : Photographies des cassettes de microfiltration ABO.....	102
Annexe 10 : Récapitulatif final pour les échantillons séquencés	104

RESUME

Contexte. La transfusion des sujets de phénotype érythrocytaire « Bombay » ou « H-déficient » est rendue difficile par leur rareté et par la présence d'un anticorps naturel régulier anti-H1. Le Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins (CNRGS) a pour mission de participer à la prise en charge des cas de phénotypes sanguins rares qui représentent par leur nombre cumulé un enjeu de santé publique. L'objectif de ce travail était d'étudier génétiquement une cohorte de sujets de phénotype H-déficient référencés dans le registre national pour améliorer leur prise en charge et celle des futurs patients référés au CNRGS.

Méthodes. Mise au point du séquençage des gènes *FUT1* et *FUT2* pour recherche des mutations causant le phénotype H-déficient dans la cohorte. Étude secondaire sérologique chez les sujets de génotype considéré d'intérêt par utilisation de réactifs humains anti-H et de cartes gel-microfiltration ABO, sur hématies natives et traitées par les enzymes. Reclassement du phénotype H des sujets référencés et des concentrés de globules rouges (CGR) congelés à la Banque Nationale de Sang de Phénotype Rare (BNSPR).

Résultats. Soixante-dix échantillons H-déficients ont été séquencés pour *FUT1* parmi les 85 inclus. Des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites expliquant le phénotype ont été retrouvées chez 65 d'entre eux. Neuf de ces mutations n'étaient pas référencées par la Société Internationale de Transfusion Sanguine (ISBT). Ces données ont entraîné le reclassement de phénotypes initialement H:-1 en H:W1 pour 32 sujets du registre national. Parmi eux se trouvaient 15 donneurs actifs totalisant 61 CGR à la BNSPR, diminuant le stock d'unités congelées considérées H:-1 de 88 à 27 tout en augmentant d'un autre côté la sécurité transfusionnelle pour les receveurs H-déficients.

Conclusion. Le CNRGS assure la sécurité transfusionnelle des sujets présentant un phénotype érythrocytaire rare. Grâce à cette étude, la prise en charge diagnostique et transfusionnelle des sujets de phénotype exceptionnel H-déficient a été améliorée. De nouvelles bases moléculaires pour ce phénotype ont également été mises en évidence.

INTRODUCTION

I. Un bref aperçu des groupes sanguins

Dès les premiers essais de William Harvey du 17^{ème} siècle jusqu'au début du 20^{ème} siècle, la transfusion fut considérée comme une pratique incertaine et dangereuse : un bon nombre des tentatives étaient des échecs, notamment à cause de l'incompatibilité entre les phénotypes du système ABO qui était alors inconnu. L'énigme de ces échecs ne fut en partie résolue qu'à partir de 1901 avec la découverte cruciale effectuée et publiée par un médecin autrichien, Karl Landsteiner : « *Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes* »⁽¹⁾ (*À propos du phénomène d'agglutination du sang humain normal*). Ce travail décrivait pour la première fois de façon systématique l'incompatibilité entre le sérum et les hématies de plusieurs individus sains. Jusque-là, cette incompatibilité d'apparence aléatoire entre les différents individus était considérée comme résultant de pathologies chez ces sujets. Cette première publication répartissait la population générale en trois groupes : A, B et C. Le groupe AB, moins fréquent, ne fut mis en évidence que l'année suivante. Enfin vers 1910, le groupe C fut renommé O (pour *Ohne* en allemand, « sans » antigènes A et B), donnant au système ABO ses quatre phénotypes principaux actuels.

Les implications en transfusion de cette découverte n'ont pas été reconnues avant deux décennies. Le fait de la barrière de la langue de la publication originale, mais aussi parce qu'à cette époque l'autre principal écueil de la transfusion était celui de la coagulation du sang qui ne pouvait pas encore être conservé, en l'absence d'anticoagulant. Les transfusions étaient ainsi au début du siècle réalisées de bras à bras, par la confection d'une anastomose entre l'artère du donneur et la veine du receveur. L'utilisation en 1915 du citrate permit la conservation du sang et un don sans risque pour le donneur. Les travaux de Karl Landsteiner sur le système ABO furent enfin consacrés du Prix Nobel de Médecine en 1930⁽²⁾.

À la suite de cette découverte majeure, d'autres antigènes de groupe sanguin furent bientôt découverts. Les suivants à être identifiés étaient ceux contre lesquels des anticorps naturels sont fréquemment retrouvés. En effet, les anticorps naturels

sont généralement des IgM (structure pentamérique) agglutinant spontanément les hématies.

Le test indirect à l'antiglobuline inventé par Sir Robin R. Coombs, en 1945, permettait *in vitro* l'hémagglutination avec un sérum contenant des anticorps de type IgG par l'ajout d'une immunoglobuline anti-IgG humaine⁽³⁾. Ce test fut le déclencheur de l'identification de la majorité des antigènes de groupe sanguin dans la deuxième moitié du 20^{ème} siècle (figure 1).

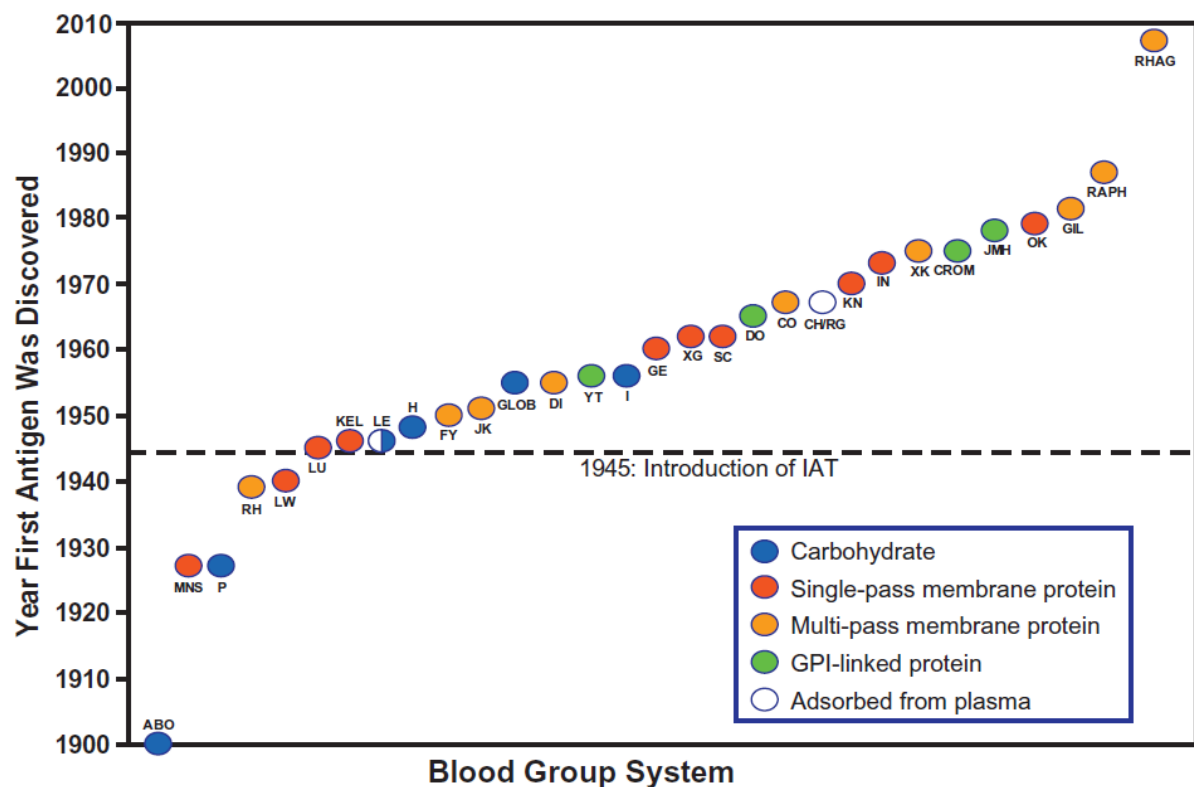


Figure 1 : Dates de découverte ou d'élucidation des systèmes de groupes sanguins de 1900 à 2010, adapté de Daniels & Reid⁽⁴⁾

Depuis l'essor de la biologie moléculaire, la base génétique des systèmes de groupes sanguins a été élucidée. Actuellement, 36 systèmes sont admis par la Société Internationale de Transfusion Sanguine (ISBT), comprenant 308 antigènes de groupe sanguin. Trente-huit autres antigènes de groupe sanguin sont répartis dans des séries et collections, leurs caractéristiques ou l'absence de base génétique décrite pour ces antigènes les empêchant d'intégrer un système.

II. Nomenclatures et terminologie

A. Nomenclatures des groupes sanguins

Une des complexités de l'immuno-hématologie réside dans ses multiples langages et nomenclatures, pouvant rebuter le sujet non averti. Depuis 1900 et la découverte du premier système de groupe sanguin, différents styles de notations ont été utilisés pour décrire les antigènes et systèmes de groupes sanguins⁽⁵⁾. Une nomenclature internationale alphanumérique de classification et de dénomination des antigènes érythrocytaires fut proposée en 1980 par le groupe de travail en immuno-hématologie de l'ISBT.

Cependant l'utilisation systématique de cette nomenclature internationale, pourtant plus simple que la nomenclature dite usuelle, n'est pas encore entrée dans la pratique systématique de tous les laboratoires. Des termes portant à confusion tels que « antigène Kell » ou phénotype « Gerbich négatif » sont encore quotidiennement utilisés. L'intérêt d'une classification alphanumérique était également de s'affranchir de dénominations ambiguës comme par exemple les antigènes hr^B et Hr^B en nomenclature usuelle, respectivement RH31 et RH34 en nomenclature internationale.

Dans ce travail, les phénotypes et antigènes érythrocytaires ont donc été indiqués en nomenclature internationale ISBT.

B. Antigène de groupe sanguin

Par définition, un antigène de groupe sanguin est une structure présentée par la membrane du globule rouge et ayant la capacité, *in vivo* chez l'Homme, d'entraîner la production d'un allo-anticorps spécifique. Cette définition montre bien que c'est l'anticorps correspondant qui définit l'existence d'un antigène.

L'officialisation de nouveaux antigènes de groupe sanguin est effectuée au niveau de l'ISBT par des groupes de travail⁽⁶⁾. Pour être intégré dans la nomenclature alphanumérique par l'ISBT, un antigène érythrocytaire doit être transmis héréditairement et non pas acquis.

C. Système de groupe sanguin

Tous les antigènes de groupe sanguin sont classés par l'ISBT dans une de ces quatre catégories : systèmes, collections, série 700 (antigènes de faibles prévalences ne rentrant pas dans une collection ou série), série 901 (antigènes de prévalences élevées ne rentrant pas dans une collection ou série).

Pour former un nouveau système de groupe de sanguin, un antigène érythrocytaire doit présenter les caractéristiques suivantes :

- L'antigène doit être défini par un allo-anticorps chez l'Homme.
- L'antigène doit être hérité et non pas acquis.
- Le gène codant pour cet antigène (ou pour l'enzyme fabriquant cet antigène) doit avoir été identifié et séquencé, et sa position chromosomique connue.
- Ce gène doit être indépendant de ceux de tous les autres systèmes de groupes sanguins (pas de transmission en haplotype).

Une collection de groupe sanguin contient au moins deux antigènes liés sérologiquement, biochimiquement ou génétiquement mais ne satisfaisant pas aux critères pour fonder un système de groupe. Il y a actuellement six collections de groupes sanguins.

Dans ce travail, le système de groupe H (ISBT 018) a été étudié. Ce système comprend un unique antigène, H1 (H en nomenclature usuelle). Les différents phénotypes pour ce système, en nomenclature ISBT, sont les suivants :

- **H:1** Le sujet exprime l'antigène H1 de façon normale sur ses hématies.
- **H:-1** Le sujet est dépourvu de l'antigène H1 sur ses hématies. Ce phénotype est également nommé O_h en nomenclature usuelle.
- **H:W1** Le sujet exprime de façon réduite l'antigène H1 par rapport à la population normale. La nomenclature alphanumérique ne permet pas de donner l'indication du niveau d'affaiblissement de l'expression.

III. Le système de groupe sanguin ABO (ISBT 001)

A. Antigènes et phénotypes du système ABO

Quatre antigènes différents sont exprimés par le produit des allèles du gène *ABO*. L'antigène ABO1 (en nomenclature internationale) correspond à A, synthétisé par l'enzyme codée par l'allèle A^1 (ou A^2), et ABO2 correspond à B, produit secondaire de l'allèle *B*. ABO3 est un antigène constitué d'un motif commun à ABO1 et ABO2. Les antigènes ABO1, ABO2 et ABO3 sont recherchés en groupage sanguin de routine par des anticorps monoclonaux (arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale). Enfin, ABO4 correspond à l'antigène A1 et est spécifique de l'allèle A^1 . L'antigène H, précurseur des antigènes A et B, a été exclu du système en 1991 lorsqu'il a été démontré que sa base génétique (*FUT1*) était indépendante du gène *ABO*.

Le groupage sanguin pour le système ABO est complété par la recherche des anticorps naturels réguliers anti-A et anti-B dont le résultat doit être compatible avec celui de la recherche des antigènes (présence d'anti-A si absence d'antigène A).

Les phénotypes A et B se notent en nomenclature internationale respectivement ABO:1,-2,3 et ABO:-1,2,3. Le phénotype O (ABO:-1,-2,-3) correspond à l'absence des antigènes A et B et découle de l'allèle *O* entraînant une enzyme non fonctionnelle. Le phénotype A₂ correspond à l'absence de l'antigène ABO4 (A1) et se note en nomenclature internationale : ABO:1,-2,3,-4. Le nombre de sites antigéniques A est plus faible que celui du phénotype A₁ et une quantité importante d'antigène H est laissée « libre ». Un anticorps naturel irrégulier anti-A1 peut être associé à ce phénotype. Le phénotype A₂ correspond à 20% des sujets A.

Des phénotypes dits « A faibles » existent, pouvant se noter ABO:W1,-2,W3 en nomenclature internationale. Ces phénotypes peuvent également s'accompagner d'un anticorps naturel irrégulier anti-A1. De même, des phénotypes « B faibles » ont été décrits. Les phénotypes affaiblis sont dus à des enzymes A ou B altérées du fait de mutations au niveau de leurs allèles correspondants. Il existe de nombreux variants phénotypiques A faibles mais qui restent néanmoins rares (au sens de la fréquence, l'approvisionnement en sang restant aisé car transfusables en CGR de phénotype O). Ils sont définis par une agglutination incomplète de l'antigène A par les

réactifs de routine. De façon caricaturale, l'expression de H augmente avec l'affaiblissement de l'expression de A (figure 2). Les caractéristiques phénotypiques des variants A n'ont pas de correspondance homogène au niveau génétique. Par exemple, le phénotype A_x n'est pas causé par une mutation spécifique de l'allèle A du gène ABO et plusieurs dizaines d'allèles entraînant ce phénotype ont été recensées⁽⁷⁾.

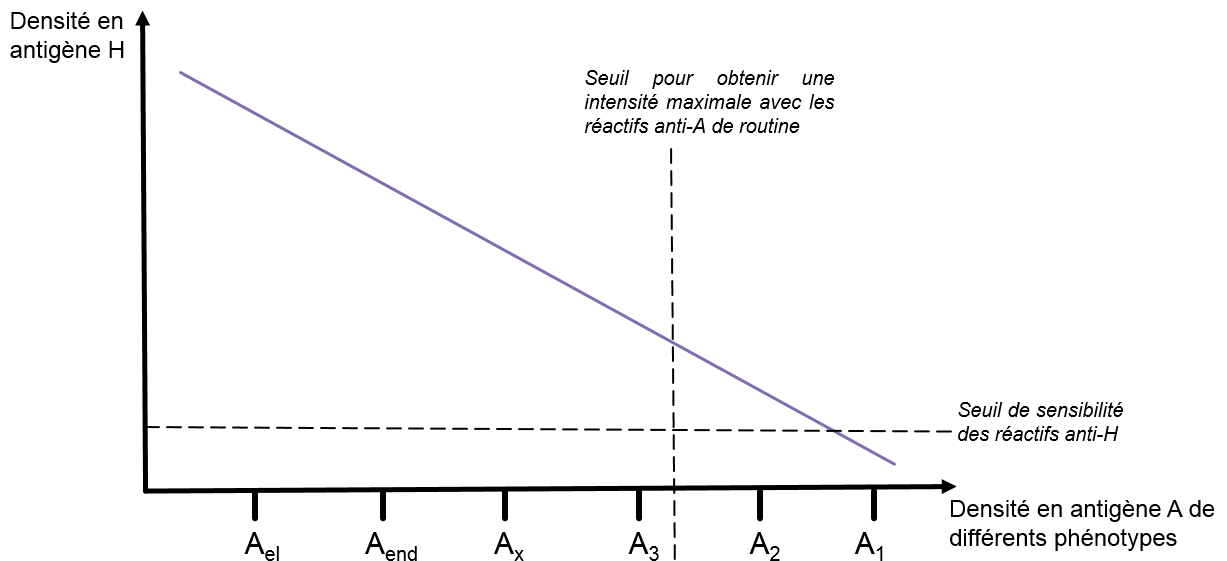


Figure 2 : Représentation caricaturale de l'expression de l'antigène H en fonction de différents phénotypes A

B. Biochimie du système ABO

La structure biochimique des antigènes des systèmes de groupes sanguins ABO et H n'est connue que depuis une soixantaine d'années⁽⁸⁾. Il s'agit de motifs glucidiques terminaux de chaînes oligosaccharidiques reliées à des glycoprotéines membranaires du globule rouge (protéine de bande 3 majoritairement⁽⁹⁾) ou à des glycosphingolipides (membranaires ou solubles), ou libres.

Ces chaînes oligosaccharidiques sont constituées d'une structure interne plus ou moins ramifiée (structures I et i) et de structures périphériques également nommées « disaccharides précurseurs » qui seront les accepteurs de ces motifs glucidiques terminaux. Les travaux sur ces antigènes et ces précurseurs ont été à l'origine effectués à partir de mucines (protéines fortement glycosylées) issues notamment de kyste ovariens⁽¹⁰⁾.

Il est d'intérêt d'évoquer les structures périphériques des chaînes oligosaccharidiques sur lesquelles sont fixés les antigènes ABO, H et Lewis. Les disaccharides précurseurs majoritairement exprimés par les globules rouges sont de trois types :

- type 1 : Gal β 1-3GlcNAc-R ;
- type 2 : Gal β 1-4GlcNAc-R ;
- type 3 : Gal β 1-3GalNAc-R.

Le précurseur de type 1 est exprimé dans les tissus dérivant de l'endoderme⁽¹¹⁾ (épithéliums des voies digestives et respiratoires notamment), c'est le substrat accepteur pour la formation de l'antigène H de type 1 retrouvé dans les sécrétions et le plasma. Les antigènes LE1 (Le^a) et LE2 (Le^b) sont également synthétisés à partir de ce précurseur. Les dérivés de cette structure de type 1 sont exprimés par les hématies après adsorption passive depuis le plasma.

Le précurseur de type 2 est exprimé dans les tissus dérivant du mésoderme (lignée érythrocytaire, endothélium), c'est le substrat accepteur pour la formation de l'antigène H de type 2 exprimé constitutionnellement dans la lignée érythrocytaire et duquel dérivent les antigènes A et B érythrocytaires. Cet antigène H de type 2 est donc un antigène de haute fréquence présent chez la quasi-totalité de la population.

Le précurseur de type 3 correspond à un antigène A (motif GalNAc) de type 2 sur lequel a été ajouté un galactose. Ce précurseur de type 3 est fucosylé pour obtenir l'antigène H de type 3 qui n'existe donc que chez les sujets A ou AB (puisque le précurseur de type 3 est bâti sur un antigène A)^{(12),(11)}. Les motifs de type 3 sont présents dans les tissus dérivant du mésoderme et de l'endoderme.

Les motifs glucidiques terminaux sont ajoutés de façon séquentielle par des enzymes de type glycosyltransférases (GT) catalysant leur transfert sur les disaccharides précurseurs. Les produits des allèles des gènes *ABO*, *FUT1* (ou *H*), *FUT2* (ou *Se*) et *FUT3* (ou *Lewis*) sont ainsi des glycosyltransférases catalysant les réactions de transfert de ces motifs sucrés.

Les enzymes A et B utilisent respectivement l'UDP-GalNAc et l'UDP-Gal comme substrats donneurs. Ces sucres sont transférés en bout de chaîne oligosaccharidique sur un accepteur : le motif Fucose- α (1,2)-Galactose correspondant à l'antigène H, qui est indispensable à l'expression des antigènes A et B que ce soit au niveau érythrocytaire ou dans les tissus épithéliaux⁽⁸⁾. L'antigène H est « consommé » par ces enzymes pour conversion en antigènes A et B.

L'expression de l'antigène H est donc minimale chez les sujets de phénotype ABO:1,2,3,4 (A₁B) et maximale chez les sujets ABO:-1,-2,-3 (O). Schématiquement, l'expression de l'antigène H selon les phénotypes ABO est : A₁B < A₁ < B < A₂ < O⁽¹³⁾.

L'enzyme A est une α(1,3)N-acétylgalactosaminyltransférase catalysant le transfert d'une molécule de N-acétylgalactosamine sur l'antigène H, au niveau du galactose terminal de la chaîne saccharidique⁽¹⁰⁾. L'enzyme A peut utiliser comme accepteur les antigènes H de types 1 et 2, mais également pour l'enzyme A₁ l'antigène H de type 3.

La différence entre les phénotypes A₁ et A₂ est quantitative par rapport au nombre de sites antigéniques A exprimés, respectivement de l'ordre de 1 000 000 et 200 000^{(14),(15)}. Elle est également qualitative, l'enzyme A₂ étant incapable de convertir l'antigène H de type 3 (fucose fixé sur un accepteur de type Gal-GalNAc et non pas Gal-GlcNAc) en antigène A₁⁽¹²⁾. La séquence de motifs glucidiques aboutissant à l'antigène A₁ est illustrée en figure 3. Cette différence entre phénotypes A₁ et A₂ n'a pas d'intérêt transfusionnel en pratique.

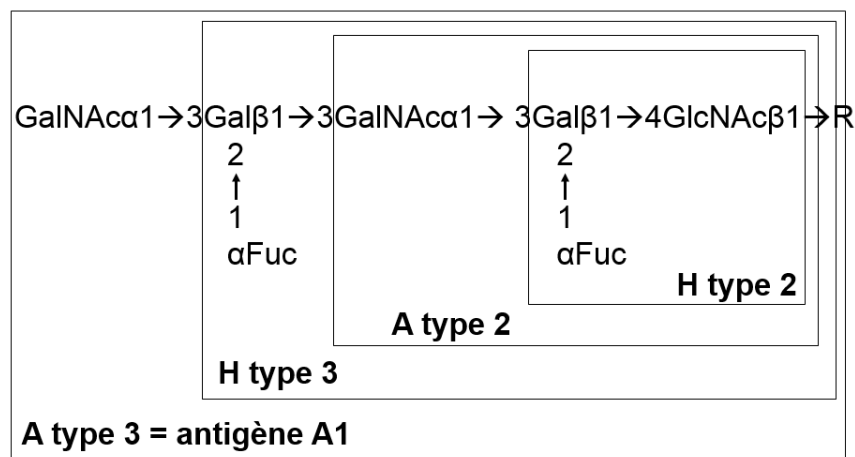


Figure 3 : structure de l'antigène A₁ (adapté de Clausen *et al.*⁽¹²⁾)

Gal : Galactose ; GalNAc : N-acétylgalactosamine ; GlcNAc : N-acétylglucosamine ; Fuc : Fucose.

L'enzyme B est une α(1,3)galactosyltransférase catalysant le transfert d'une molécule de galactose également sur l'antigène H. La schématisation d'un antigène B de type 2 est proposée en figure 4. L'enzyme B utilise les antigènes H de type 1 et 2 comme accepteurs.

Les enzymes A et B (ou galactosyltransférases [GT] A et B) ont été cristallographiées en 2002, leur relation structure – fonction est donc connue⁽¹⁶⁾ (figure 5).

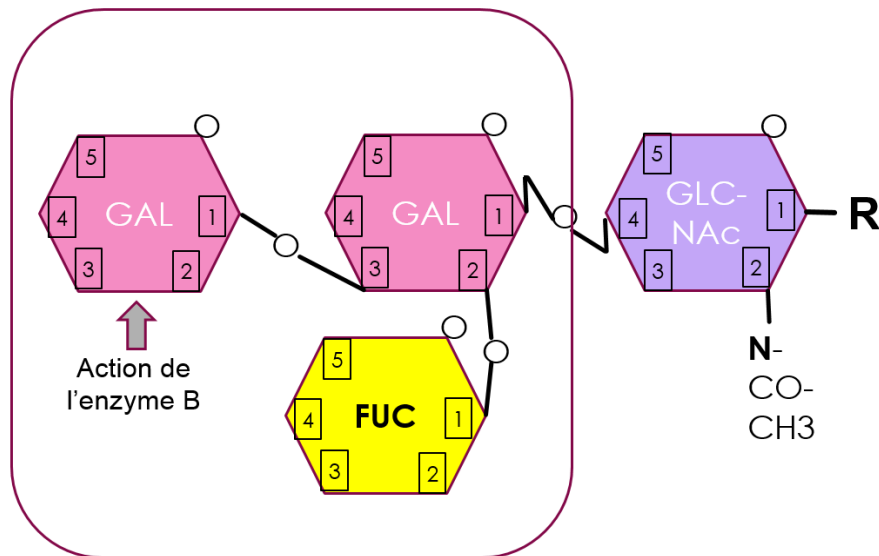


Figure 4 : Représentation schématique de l'antigène B érythrocytaire
Gal : Galactose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine ; Fuc : Fucose ; R : Structure support.

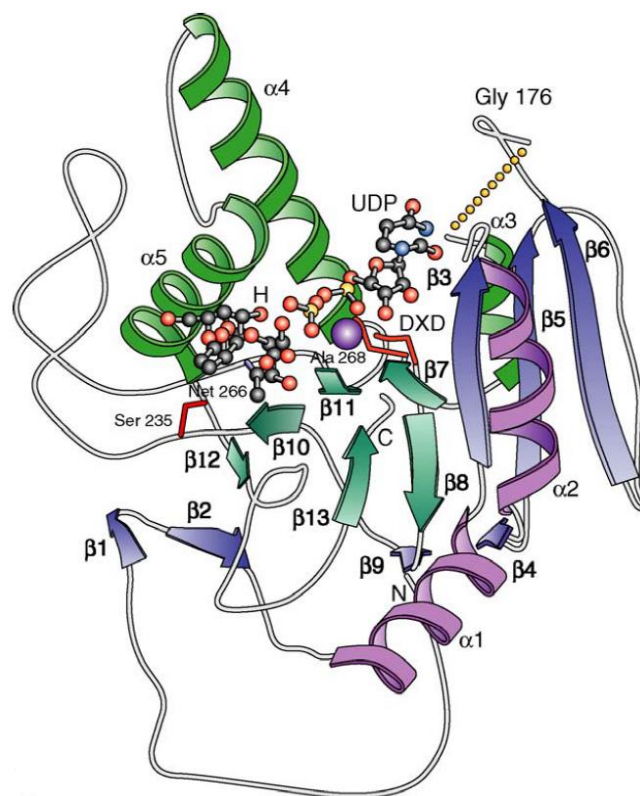


Figure 5 : Modélisation tridimensionnelle de l'enzyme B⁽¹⁶⁾
Le substrat donneur (UDP-Galactose) et le substrat accepteur (antigène H) sont placés dans leurs poches catalytiques respectives.

Les enzymes A et B (GTA et GTB) sont classées dans les glycoprotéines transmembranaires de type II, elle sont localisées dans le Golgi. Elles peuvent être clivées à leur base par des enzymes protéolytiques ce qui explique la présence des GTA et GTB solubles dans le plasma.

C. Base génétique du système ABO

Le base moléculaire du système ABO, codant pour les enzymes A et B, a été mise en évidence par Yamamoto *et al.* en 1990^{(17),(18)}. Le gène *ABO* est localisé sur le chromosome 9 (9q34) et comprend sept exons, dont les cinq premiers sont de très petite taille (respectivement 53 pb, 70 pb, 57 pb, 48 pb et 36 pb). La quasi-totalité de la séquence codant le site catalytique est contenue dans les exons 6 et 7, plus longs (134 pb et 1181 pb). Le gène s'étend sur 20 kb et code pour une glycoprotéine transmembranaire de 354 acides aminés.

La différence entre les allèles de référence *A*¹ et *B*, et donc entre les GTA et GTB, repose sur sept mutations nucléotidiques dont quatre entraînent une substitution d'acide aminé (figure 6).

L'allèle *O*¹, non fonctionnel, est caractérisé par la délétion d'un nucléotide en position 261 par rapport à l'allèle de référence *A*¹, entraînant un décalage du cadre de lecture (*frameshift*) et une séquence d'acides aminés tronquée. Il existe d'autres allèles *O* non fonctionnels, soit sur une base de c.261delG avec des mutations supplémentaires comme l'allèle *O*^{1var}, soit du fait d'autres mécanismes comme l'allèle *O*² résultant de quatre mutations faux-sens. Ces allèles « non délétionnels » sont néanmoins beaucoup plus rares que les allèles présentant la délétion.

L'allèle *A*² codant pour l'enzyme *A*₂ a la particularité de présenter une délétion d'un nucléotide décalant le cadre de lecture à l'extrémité 3' du gène avec l'extension de 21 acides aminés supplémentaires (extra-domaine C-terminal)⁽¹⁹⁾. Cette extension de la protéine est à l'origine des propriétés catalytiques différentes de l'enzyme *A*₂.

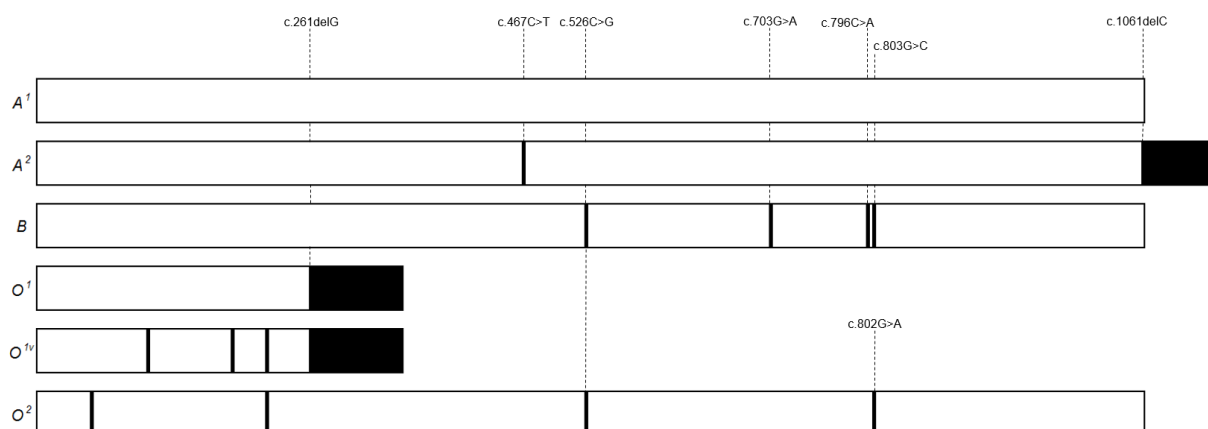


Figure 6 : Schématisation des transcrits des principaux allèles *ABO*

Les barres noires verticales indiquent les mutations entraînant des modifications d'acides aminés par rapport à l'allèle de référence *A*¹. Les motifs noirs indiquent un décalage du cadre de lecture jusqu'au codon stop généré.

IV. Le système de groupe sanguin H (ISBT 018)

A. L'antigène H1

L'antigène H1 est le substrat accepteur commun des glycosyltransférases A et B pour la formation des antigènes du système ABO. Il s'agit d'une structure fucosylée : α -L-fucosyl-(1,2)- β -D-galactosyl (figure 7) dont la synthèse est catalysée par des α (1,2)fucosyltransférases⁽¹⁰⁾. Ces enzymes catalysent le transfert d'un fucose, le substrat donneur étant le GDP-L-fucose, sur un accepteur oligosaccharidique (précurseur) généralement de type 1 (Gal β 1-3GlcNAc β 1-R), de type 2 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-R) ou de type 3 (Gal β 1-3GalNAc α 1-R).

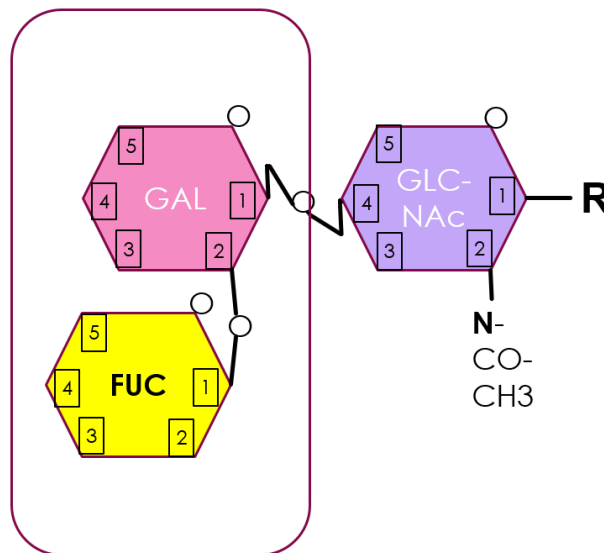


Figure 7 : Représentation schématique de l'antigène H de type 2

Gal : Galactose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine ; Fuc : Fucose ; R : Structure support.

Il est exprimé dans la lignée érythrocytaire et endothéliale par le gène *FUT1*, dans certains tissus épithéliaux (tractus digestif, urinaire, respiratoire), dans les sécrétions et dans le plasma. L'expression de H dans les tissus et les sécrétions a d'abord été considérée sous le contrôle d'un gène régulateur qui était alors nommé *Se*, pour « sécréteur ». La possible existence de deux α -(1,2)-fucosyltransférases structurellement différentes en fonction des tissus a été suggérée pour la première fois par Lemieux, en 1978, sur la base de différences stéréochimiques entre les précurseurs de type 1 et de type 2⁽²⁰⁾. Cette hypothèse fut appuyée en 1981 par Oriol *et al.* qui étudièrent d'un point de vue statistique plusieurs familles informatives comprenant des sujets H-déficients⁽²¹⁾. Plusieurs études biochimiques corroborèrent

enfin cette hypothèse par la suite^{(22),(23),(24),(25)}, amenant la conception actuelle de la synthèse de l'antigène H1. Il s'agit donc d'un antigène pouvant être synthétisé par deux enzymes différentes, en fonction du tissu et du substrat accepteur, ces enzymes étant codées par deux gènes structurels différents mais homologues et rapprochés du point de vue génétique : *FUT1* (H) dans les dérivés mésodermiques (lignée érythrocytaire, endothélium) et *FUT2* (Se) dans les dérivés endodermiques (épithéliums digestifs et pulmonaires, glandes sécrétrices).

B. Biochimie du système H

1. La protéine FUT1 (H)

La protéine FUT1 est une $\alpha(1,2)$ fucosyltransférase exprimée au niveau de la lignée érythroïde et de l'endothélium. C'est une enzyme transmembranaire ancrée dans le Golgi. Elle est composée de 365 AA : une courte (8 AA) partie N-terminale cytoplasmique, une région transmembranaire hydrophobe (17 AA) ancrée dans la membrane du Golgi, une région « souche » d'environ 118 AA supportant le site catalytique et le site catalytique comportant les 222 derniers AA⁽²⁶⁾. La région souche peut être la cible d'enzymes protéolytiques libérant le site catalytique, expliquant l'activité $\alpha(1,2)$ -fucosyltransférase retrouvée dans le sérum⁽²⁷⁾. Bien que n'ayant pas été cristallisée, la protéine FUT1 est l'archétype de la glycosyltransférase. Une représentation de la réaction catalysée par FUT1 est proposée en figure 8.

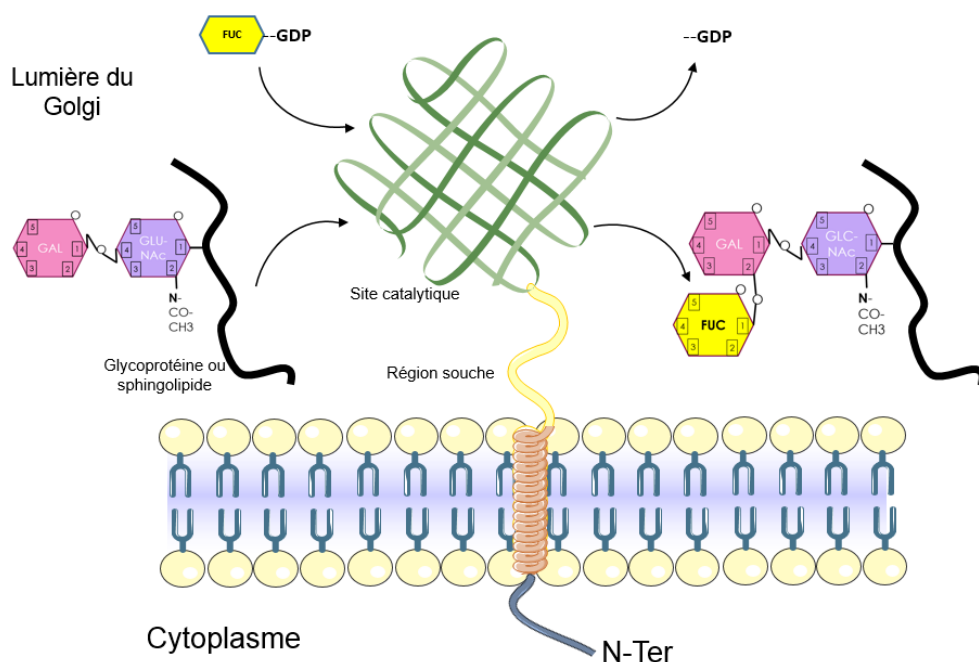


Figure 8 : Réaction catalysée par FUT1

L'enzyme FUT1 n'utiliserait que les précurseurs de types 2 et 3⁽²⁸⁾. Un encombrement stérique exercé par le groupe N-acétyl du GlcNAc pourrait empêcher l'accès de FUT1 au groupe 2'hydroxyle du galactose terminal dans la conformation des précurseurs de type 1⁽²⁰⁾.

2. La protéine FUT2 (SE)

L'expression et la sécrétion des antigènes A, B et H dans et depuis les tissus dérivant de l'endoderme sont sous le contrôle de l'enzyme FUT2, également appelée Se pour « sécréteur ». FUT2 est fonctionnelle chez 80% des sujets européens qui sont ainsi dits « sécréteurs ». Les autres ne présentent dans les sécrétions ni antigène H ni antigènes ABO, ils sont donc « non sécréteurs ».

Cette enzyme FUT2 est capable de convertir les précurseurs de types 1, 2 et 3 en antigènes H de types 1, 2 et 3^{(28),(29)}. Le Pendu *et al.* ont estimé qu'un tiers de l'antigène H de type 2 présent dans le plasma était sous contrôle de FUT2, le reste provenant de l'endothélium et contrôlé par FUT1⁽²⁸⁾. La totalité de l'antigène H de type 1 est sous contrôle de FUT2.

En dehors de cette préférence pour le substrat accepteur de type 1, la structure de la protéine FUT2 est quasiment la même que FUT1. Elle est composée de 343 AA bien qu'une isoforme plus courte du côté N-Ter cytoplasmique faisant 332 AA ait été prise pour référence dans la littérature. Cependant il s'agit de l'isoforme de 343 AA qui est la référence au niveau des bases de données moléculaire en ligne (NCBI, ensembl.org).

C. Base génétique du système H

1. Le gène *FUT1*

En 1989, la transfection et le clonage d'un fragment de 3,4 kb contenant la séquence humaine codant pour l'activité H furent publiés par Rajan *et al.* Le produit de ce gène, localisé sur le bras long du chromosome 19 en 19q13.3^{(30),(31)}, était une α -(1,2)-fucosyltransférase ayant les caractéristiques de l'enzyme responsable de l'antigène H érythrocytaire, mais différente de celle entraînant le statut sécréteur⁽³²⁾.

L'année suivante, l'ADN complémentaire cloné correspondant à ce fragment, issu d'une lignée de cellules humaines A431 (carcinome épithélial), était séquencé par Larsen *et al.*⁽²⁶⁾. La séquence obtenue correspondait à un transcrit démarrant en

c.-103 par rapport au codon d'initiation. La séquence codante prédisait une glycoprotéine transmembranaire type II à activité enzymatique, probablement résidente du Golgi (comme les autres glycosyltransférases). Ce gène fut nommé *FUT1* pour FUcosylTransférase-1.

En 1994, Kelly *et al.* déterminèrent la structure génomique et la séquence de l'allèle *wild-type* (« sauvage ») de *FUT1*, et la comparèrent à un sujet de phénotype H:-1 et un sujet H:W1⁽³³⁾. Les premières mutations causant un phénotype H-déficient étaient alors publiées.

Enfin, la description définitive de la structure du gène *FUT1* fut acquise en 1997 avec les publications de Koda *et al.* décrivant deux sites supplémentaires d'initiation de la transcription dans des lignées cancéreuses immatures (K652, HEL), amenant la structure du gène à quatre exons^{(34),(35)} (figure 9). Ces exons supplémentaires restaient non-codants car les sites promoteurs nouvellement décrits s'éloignaient en amont dans le 5'UTR. La structure finale de la protéine FUT1 décrite restait donc la même.

Il semblerait que la lignée érythroïde à un stade précoce de différenciation utilise comme site d'initiation de la transcription exclusivement le premier, puis le deuxième exon⁽³⁵⁾. La lignée érythroïde mature et les cellules endothéliales utiliseraient quant à elles le promoteur localisé dans l'exon 3 et donc produiraient le transcrit le plus petit des trois, c'est-à-dire le premier mis en évidence par Larsen *et al.*⁽²⁶⁾.

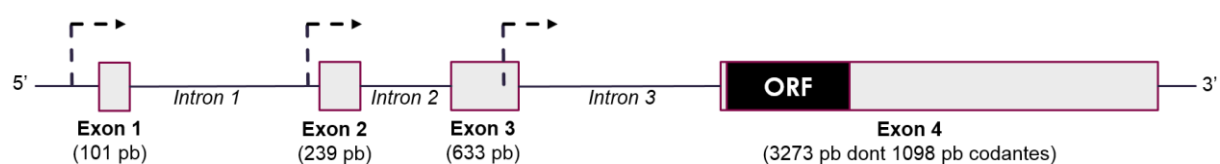


Figure 9 : Structure du gène *FUT1*

Les flèches en pointillé indique les différents sites promoteurs.
ORF : *Open reading frame* (séquence codante).

Dans la même publication, Koda *et al.* décrivaient également différentes formes de transcrits du fait d'épissages alternatifs au niveau des exons 1, 2 et 3. Les trois premiers exons de *FUT1* étant constitués de séquences non traduites (5'UTR), ces épissages alternatifs n'affectaient pas la séquence codante et donc ne produisaient pas d'isoformes de la protéine FUT1.

2. Le gène *FUT2*

Le clonage du gène *FUT2* (ou gène *SE*, « sécréteur ») intervint en 1995, après celui de *FUT1*. Rouquier *et al.* clonèrent le locus où se situe *FUT1*, mettant en évidence deux séquences extrêmement homologues liées à *FUT1*, nommées *Sec1* et *Sec2* (pour *Secretor candidate 1* et *2*)⁽³⁶⁾. Après étude de l'expression des transcrits et du séquençage de *Sec1* et *Sec2*, l' α -(1,2)-fucosyltransférase responsable du statut sécréteur se révéla être codée par *Sec2* qui prit le nom de *FUT2*⁽³⁷⁾. Quant à *Sec1*, l'absence de transcrit correspondant et la présence de codons stop dans le cadre de lecture établirent qu'il s'agissait d'un pseudogène.

L'organisation du locus comportant les deux α -(1,2)-fucosyltransférases *FUT1* et *FUT2*, et le pseudogène *Sec1* est représentée en figure 10. La faible distance intergénique séparant ces gènes entraîne leur transmission en bloc (haplotype) à la manière des gènes *RHD* et *RHCE* qui sont séparés de 30 kb.

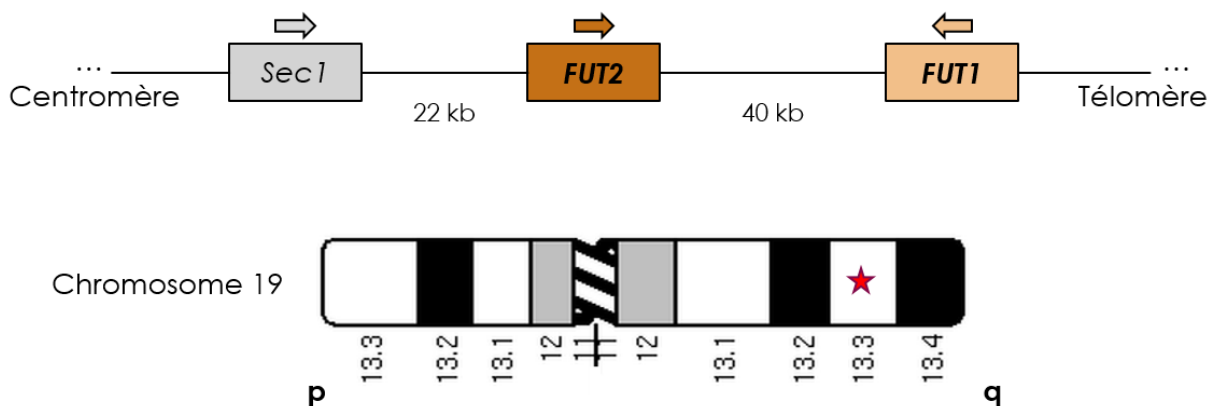


Figure 10 : Représentation du locus « H »

Le gène *FUT2* présente deux exons dont un seul est codant à l'instar de *FUT1* (figure 11). L'identité de séquence entre *FUT1* et *FUT2* est surtout visible au niveau de la zone catalytique, à partir des 292 derniers acides aminés des protéines. Il s'agit ainsi également d'une glycoprotéine transmembranaire de type II.



Figure 11 : Structure du gène *FUT2*

La flèche en pointillé indique le site promoteur.
ORF : *Open reading frame* (séquence codante).

V. Le système de groupe sanguin LE (ISBT 007)

Le système LE repose sur le gène *FUT3*, une $\alpha(1,4)$ fucosyltransférase⁽³⁸⁾ différente de *FUT1* et *FUT2*, qui sont des $\alpha(1,2)$ fucosyltransférases. L'enzyme *FUT3* (ou LE) catalyse le transfert d'un fucose sur le GlcNAc du précurseur de type 1. Le système LE est composé de six antigènes mais en pratique courante les deux antigènes explorés sont LE1 (Le^a) et LE2 (Le^b).

Les antigènes du système Lewis (LE) ont pour première particularité d'être synthétisés dans des tissus non-hématopoïétiques (dérivés de l'endoderme) et adsorbés sur la surface des hématies depuis le plasma⁽³⁹⁾. La deuxième particularité repose sur le fait que *FUT2* est impliquée dans la synthèse des antigènes LE :

- Si l'enzyme *FUT2* a ajouté un fucose sur le galactose terminal de la chaîne (formant l'antigène H de type 1 ou Le^d), l'action de *FUT3* catalyse la production de l'antigène LE2. Le phénotype est alors LE:-1,2 traduisant le statut sécréteur du sujet.
- Lorsque qu'un individu ne possède pas d'enzyme *FUT2* (environ 20% de la population caucasienne), le galactose terminal ne porte pas de fucose et c'est l'antigène LE1 qui est produit par LE (figure 12). Le phénotype érythrocytaire LE:1,-2 obtenu est le reflet du statut non sécréteur.

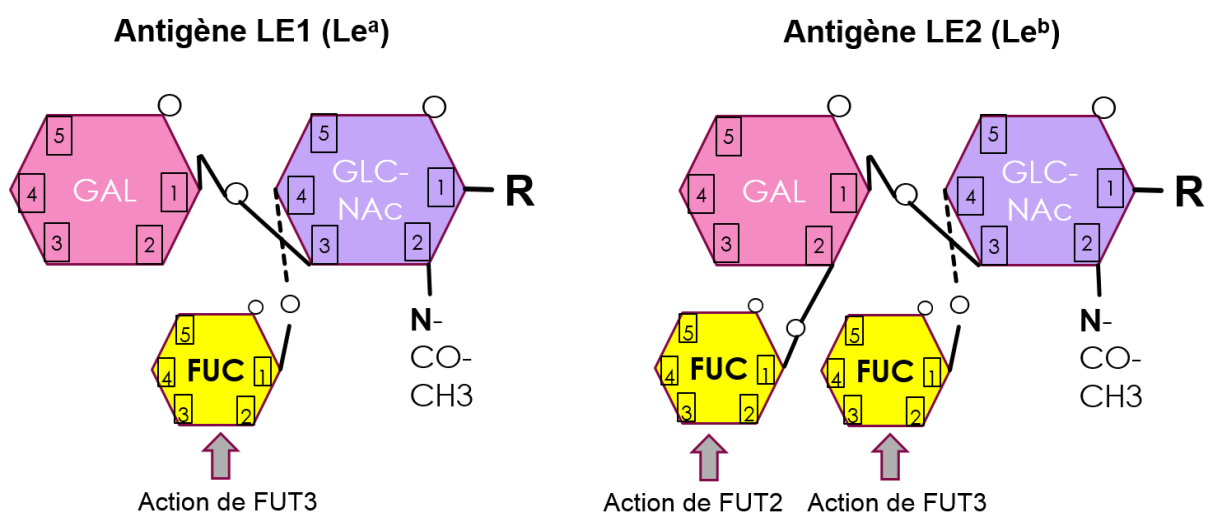


Figure 12 : Représentation schématique des antigènes LE1 et LE2

Gal : Galactose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine ; Fuc : Fucose ; R : Structure support.

Le phénotype LE:-1,-2 est causé par l'absence de protéine FUT3 fonctionnelle. Il peut être également acquis de façon transitoire pendant la grossesse⁽⁴⁰⁾.

Le phénotype LE:1,2 peut être rencontré chez les sujets présentant une protéine FUT2 de fonctionnalité réduite, entraînant une compétition avec FUT3⁽⁴¹⁾. Ce phénotype mineur en Europe est rencontré fréquemment en Asie du Sud-Est et au Japon (généralement avec expression d'un antigène LE2 faible⁽⁴²⁾ : LE:1,W2), dû à la mutation *FUT2*:c.418A>T (c.385A>T en nomenclature usuelle)⁽⁴³⁾.

Il est à noter que le phénotype LE:1,2 pourrait être plus fréquent qu'attendu chez les européens, sur un versant LE:W1,2. En effet, une mutation du gène *FUT2* affaiblissant légèrement la fonctionnalité de l'enzyme serait présente chez potentiellement 1% des sujets caucasiens (Letizia *et al.*, communication orale au congrès de Montpellier 2015 de la Société Française de Transfusion Sanguine).

Tableau 1 : Prévalence des phénotypes LE (adapté de Reid *et al.*⁽⁴⁴⁾)

	Europe de l'Ouest	Afrique	Japon
LE:1,-2	22%	23%	0,2%
LE:-1,2	72%	55%	73%
LE:1,2	Rare	Rare	16,8%
LE:-1,-2	6%	22%	10%

L'intervention de l'enzyme FUT2 modifie le substrat de FUT3 et dirige les spécificités antigéniques LE produites. Cependant, le système de groupe LE n'intègre pas le gène *FUT2* car le locus *FUT3* est génétiquement indépendant du locus *Sec1 – FUT2 – FUT1*, bien que porté par le même chromosome.

VI. Les phénotypes érythrocytaires H-déficients

A. Le phénotype « Bombay »

En 1952, le Docteur Y. M. Bhende reporta les cas dans la ville de Bombay (renommée Mumbai en 1995) de plusieurs sujets dont les hématies n'étaient pas agglutinées par les anti-A, les anti-B, les anti-A1, ni par les anti-H. Le plasma de ces sujets contenait des anticorps anti-A, des anti-B et un puissant anti-H⁽⁴⁵⁾ naturel pouvant être de haut titre. Les sécrétions de ces sujets ne présentaient pas non plus d'antigène H, que ce soit de type 1 ou type 2 : ils étaient donc non sécréteurs.

Ce phénotype rapidement dénommé « Bombay » ou O_h est depuis défini comme l'absence totale d'antigène H sur les hématies et dans les sécrétions (phénotype H:-1) associée à la présence d'un puissant anticorps anti-H. Sa base moléculaire a été mise en évidence en 1997 par Koda *et al.*⁽⁴⁶⁾ : l'étude de plusieurs indiens de phénotype « Bombay » a révélé de façon homogène la présence d'une mutation faux-sens de *FUT1* à l'état homozygote : c.725T>G entraînant le remplacement de la leucine en position 242 par une arginine (p.Leu242Arg en nomenclature HGVS). Il était également mis en évidence une délétion du gène *FUT2* (allèle *se^{del}*) expliquant le statut non sécréteur de ces sujets. La prévalence du phénotype « Bombay » en Inde est estimée à un pour 10 000 (0,01%)^{(47),(48)}. Cet haplotype [*FUT1*:c.725T>G / *se^{del}*] devant être à l'état homozygote pour que le phénotype s'exprime, une prévalence haplotypique élevée est attendue. En réalité, la prévalence élevée de ce phénotype récessif résulte en Inde des mariages « consanguins » qui sont culturels.

La prévalence du phénotype « Bombay » est beaucoup plus faible dans le reste du monde. Cette mutation *FUT1*:c.725T>G n'a pour l'instant été retrouvée que chez des sujets d'origine indienne ou du pourtour de l'Océan Indien. Des phénotypes H-déficients « totaux » H:-1 ont déjà été décrits en Europe mais les bases moléculaires étaient à chaque fois différentes^{(49),(50),(51)}. Ce phénotype présenterait une prévalence de un pour 300 000 sujets européens selon Wagner⁽⁵²⁾.

B. Le phénotype « Réunion »

En 1982 Gerard *et al.* reportèrent une concentration importante de phénotypes H-déficients sur l'Île de La Réunion⁽⁴⁹⁾ avec une série de 42 sujets⁽⁵³⁾. Dans cette étude les sujets étaient inclus sur la détection d'un anti-H au groupage sanguin. Ces 42 sujets étaient issus de 25 familles dont quatre d'origine indienne, ce qui était dû à la proximité de La Réunion avec l'Inde (figure 13). Les sujets « locaux » (ou leurs ascendants) étaient originaires de Cilaos, localité de 6000 habitants située dans un cirque naturel en altitude au centre de l'île.

Tous les sujets étaient non sécréteurs, mais certains exprimaient des quantités faibles d'antigènes A et B (phénotypes également dénommés A_h, B_h et AB_h) contrairement au phénotype « Bombay » décrit par Bhende.

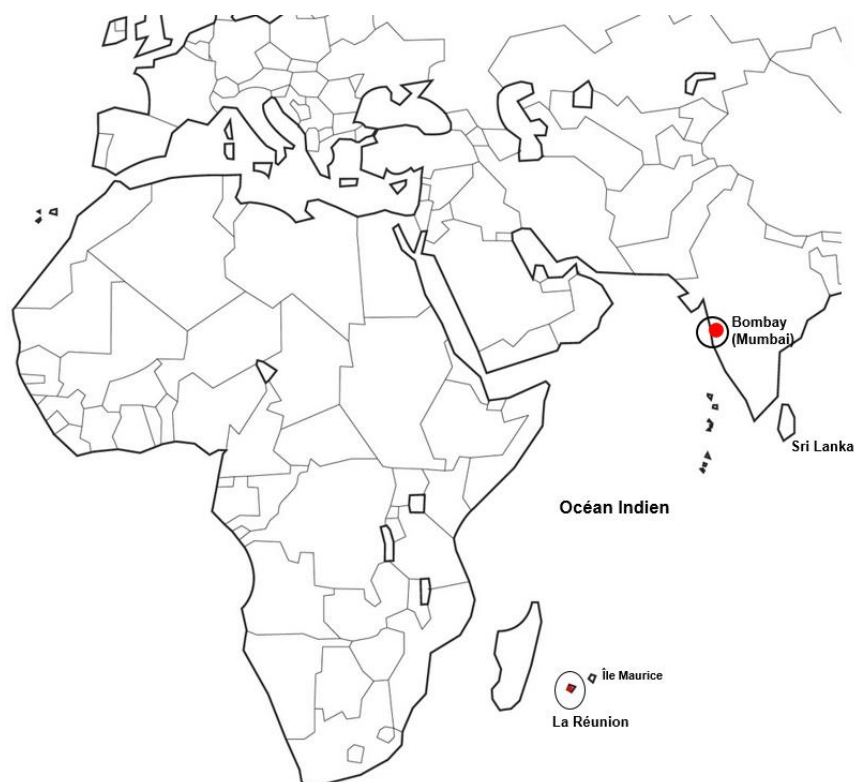


Figure 13 : Localisation de l'Île de La Réunion et de Bombay (Mumbai)

L'année suivante, Le Pendu *et al.* individualisèrent le phénotype « Réunion » à partir de cette série de 42 sujets⁽⁵⁴⁾. Les hématies des sujets de phénotype « Réunion » exprimaient effectivement une faible quantité d'antigène H et étaient agglutinées par le sérum des sujets de phénotype « Bombay ». Tous ceux qui possédaient au moins une GTA ou une GTB exprimaient faiblement les antigènes A

ou B correspondants. La présence d'antigène H chez ces sujets « Réunion » avait été objectivée avec une lectine *Ulex europaeus* purifiée sur des hématies traitées par la papaïne, les réactifs de routine ne permettant pas l'agglutination.

Tous les sérums des échantillons « Réunion » présentaient un anticorps anti-H réagissant avec les hématies O normales. Cet anti-H n'agglutinait pas les autres hématies « Réunion ». Au contraire, l'anti-H issu des sujets « Bombay » agglutinait les hématies « Réunion » et était en moyenne de plus haut score (62 +/-8 contre 24 +/-11 pour l'anti-H des sujets « Réunion », vis-à-vis d'hématies O contrôles). Une étude plus tardive de Le Pendu montra que les sujets « Bombay » synthétisaient des anticorps anti-H contre les spécificités de type 1 et de type 2 en grandes quantités⁽⁵⁵⁾. Les sujets « Réunion » synthétisaient quant à eux un anticorps anti-H dirigé surtout contre l'antigène H de type 1. Cela semblait logique étant donné que les hématies « Réunion » possèdent en quantité non négligeable de l'antigène H de type 2 mais pas d'antigène de type 1 du fait du statut non sécréteur.

L'équipe de Le Pendu poursuivit l'étude du phénotype « Réunion » avec la publication d'une étude visant à évaluer l'activité $\alpha(1,2)$ fucosyltransférase dans leur sérum⁽⁵⁶⁾. Les sujets de phénotype « Bombay » ne présentaient pas d'activité détectable, comme attendu. Les sujets de phénotype « Réunion » présentaient une activité à la limite du seuil de détection de la technique, si bien que sept étaient sous le seuil de détection et neuf faiblement positifs. Chez les sujets hétérozygotes pour l'allèle « Réunion » (déterminés à cette époque comme les parents où les enfants des sujets présentant le phénotype), l'activité $\alpha(1,2)$ fucosyltransférase était diminuée de moitié par rapport aux sujets contrôles. Ceci démontrait un effet dose remarquable entre la fonctionnalité d'un ou deux allèles « H » et l'activité de l'enzyme dans le sérum.

La base moléculaire du phénotype « Réunion » a été publiée par Fernandez *et al.* en 1998 : il s'agit de la mutation *FUT1*:c.349C>T ; p.His117Tyr associée à l'allèle non fonctionnel de *FUT2* typique des sujets d'origine caucasienne⁽⁵⁷⁾. Cette mutation intervient dans la région souche de la protéine qui soutient le site catalytique. Il semblerait que l'isolement géographique de Cilaos ait favorisé les mariages consanguins et la propagation de cette mutation. Le phénotype « Réunion » atteindrait ainsi une prévalence de 1% à Cilaos⁽⁵³⁾.

C. Les phénotypes H-déficients sporadiques

Dès les années 1960, d'autres cas de sujets présentant un phénotype H-déficient, exprimant ou non les antigènes A et B, ont été reportés chez des sujets d'origine européenne^{(58),(59),(60),(61),(62),(63),(64)}. Diverses nomenclatures ont été utilisées pour décrire ces sujets en fonction des antigènes ABH exprimés, notamment dans le plasma, et des génotypes ABO déduits : O^h_m et A^h_m ⁽⁵⁹⁾, O_h^A et O_h^O ⁽⁵⁸⁾, O_{Hm}^{AB} ⁽⁶²⁾, Hz et Hm ⁽⁶⁴⁾... Ces nomenclatures étaient inventées au fur et à mesure des phénotypes découverts résultant des combinaisons possibles entre l'affaiblissement total ou partiel à des degrés divers de l'expression de H et le statut sécréteur ou non. Il s'agissait d'une époque où les gènes *FUT1* et *FUT2* n'avaient pas encore été mis en évidence et où la compréhension du système H était incomplète. Ces appellations confusantes ne sont désormais guère plus utilisées. Néanmoins, le terme « para-Bombay » émis en 1974 par Race et Sanger⁽⁶⁵⁾ reste encore en 2015 employé dans la littérature⁽⁶⁶⁾. Ce terme désigne selon certains tout phénotype H-déficient de statut sécréteur, pour d'autres tout phénotype H:W1 peu importe le statut sécréteur. Pourtant, Le Pendu dès 1982 s'interrogeait sur l'utilisation de cette appellation qu'il jugeait « peu précise » et « utilisée de façon non uniforme par les auteurs »⁽⁵⁴⁾. Nous ne recommandons pas l'utilisation de cette appellation et ne l'utiliserons pas dans ce travail. Les termes génériques tels que « sujet H-déficient de statut sécréteur » seront préférés.

Les phénotypes « Bombay » et « Réunion » sont quant à eux relativement homogènes car bien décrits du fait des prévalences élevées dans leurs zones géographiques respectives et reposant sur une base moléculaire définie. Ces appellations nous semblent donc tolérables, bien qu'utilisant chacune un nom propre. Les phénotypes H-déficients rencontrés en Europe ou en Chine présentent par contre des caractéristiques extrêmement variables et seront nommés par des termes génériques.

La découverte des bases moléculaires du système H a permis de séquencer le gène *FUT1* de ces sujets, montrant ainsi l'hétérogénéité des bases moléculaires des phénotypes H-déficients en dehors de La Réunion et de l'Inde. Au moment de l'écriture de ce manuscrit, la base de l'ISBT recense 55 allèles *FUT1* entraînant un phénotype H-déficient⁽⁶⁷⁾, dont 21 allèles *FUT1* considérés nuls (mais qui ne présagent en rien de l'allèle *FUT2* ségrégeant avec). Parmi ces 21 allèles nuls, 11 résultent d'une mutation faux-sens ou d'une délétion entraînant un décalage du

cadre de lecture. On comprend alors qu'il était compliqué de systématiser les phénotypes sporadiques rencontrés.

Trois facteurs entrent en ligne de compte pour la détermination du phénotype H d'un sujet : chacun de ses deux allèles *FUT1* et son statut sécréteur (fonctionnalité d'au moins un allèle *FUT2* ou non). Les combinaisons possibles sont présentées dans le tableau 2. Il faut garder à l'esprit qu'un niveau de complexité supplémentaire existe : des allèles faiblement fonctionnels peuvent présenter des degrés divers et variés de fonctionnalité. L'analogie avec les phénotypes « A faibles » est pertinente : différents degrés d'affaiblissement existent, et pour chaque phénotype A faible il existe plusieurs dizaines de bases moléculaires différentes. Il n'y a aucune raison qu'il en soit autrement pour les phénotypes « H faibles », eux aussi dus à l'altération de l'enzyme qui synthétise l'antigène. Le tableau 2 illustre les combinaisons aboutissant à un phénotype H faible ou H:W1. La présence de deux allèles faiblement fonctionnels de *FUT1* chez un sujet non sécréteur (comme le phénotype « Réunion ») n'est ainsi qu'une possibilité parmi d'autres.

Tableau 2 : Combinaisons haplotypiques générant les différents phénotypes H

<i>FUT1</i>		Statut sécréteur	Phénotype
Allèle 1	Allèle 2		
Fonctionnel	\	Sécréteur	H:1 (80% de la population européenne)
Fonctionnel	\	Non sécréteur	H:1 (20% de la population européenne)
Non fonctionnel	Non fonctionnel	Non sécréteur	H:-1 (phénotype "Bombay")
Non fonctionnel	Non fonctionnel	Sécréteur	H:W1
Non fonctionnel	Faiblement fonctionnel	Non sécréteur	H:W1
Non fonctionnel	Faiblement fonctionnel	Sécréteur	H:W1
Faiblement fonctionnel	Faiblement fonctionnel	Non sécréteur	H:W1
Faiblement fonctionnel	Faiblement fonctionnel	Sécréteur	H:W1

\ : un allèle *FUT1* fonctionnel suffit pour obtenir le phénotype H:1 donc le deuxième allèle n'intervient pas ici.

Les phénotypes H:W1 auraient pu ainsi à la manière des phénotypes A faibles bénéficier d'une nomenclature telle que « H₂ », « H_x », « H_{el} »... Cela n'a probablement pas été le cas du fait de la rareté des sujets H-déficients, mais aussi du manque de réactifs puissants.

Contrairement à la gradation de l'expression antigénique pour A qui ne présente au final que peu d'intérêt en transfusion étant donné qu'il est aisé de contourner le

problème en transfusant en CGR de groupe O, il en est tout autrement pour les sujets déficients en antigène H. Par analogie avec le système ABO, le sang universellement compatible avec tous les sujets H-déficients est celui de phénotype H:-1 ou « Bombay », rarissime. La Banque Nationale de Sang de Phénotype Rare ne contient à ce jour que 27 CGR H:-1 dont aucun n'est RH:-1. Il semble irréaliste de penser transfuser tous les H:W1 présentant un anti-H en phénotype H:-1 réel étant donné la rareté de ce phénotype. Il n'existe hélas à notre connaissance aucune étude ou même retour d'expérience de la transfusion d'un sujet phénotype H:W1 par des CGR de phénotype H:W1, et encore moins avec la base moléculaire connue. En l'absence de données informatives se pose la question de l'intérêt de transfuser en « géno-compatible » les sujets H:W1 lorsqu'un protocole d'autotransfusion n'a pas été possible. Ceci permettrait également d'économiser certaines poches réellement H:-1 de la BNSPR.

Enfin, un génotypage *FUT1* des donneurs déterminerait quels CGR congelés à la BNSPR sont réellement H:-1. En cas de besoin en urgence vitale pour un sujet connu H:W1 ou H:-1, un retard transfusionnel dû à une épreuve de compatibilité positive pourrait en effet être délétère.

VII. Objectifs de l'étude

Le laboratoire d'immuno-hématologie érythrocytaire du Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins explore actuellement les sujets présentant un déficit d'expression de l'antigène H par des techniques sérologiques. Des réactifs d'origine humaine issus de sujets H-déficients non génotypés pour le système H sont utilisés. Des dizaines de receveurs et de donneurs présentant un phénotype H-déficient sont ainsi répertoriés au sein du registre national des sujets de phénotype ou génotype érythrocytaire rare.

L'objectif préliminaire de ce travail était de développer le séquençage des gènes codant pour la base moléculaire du système de groupe sanguin H (ISBT 018), c'est-à-dire les gènes *FUT1* et *FUT2*, par la technique de Sanger⁽⁶⁸⁾.

L'objectif principal de l'étude était le génotypage *FUT1* (et éventuellement *FUT2*) des sujets H-déficients répertoriés dans le registre national, pour lesquels un prélèvement sanguin congelé était disponible dans la bibliothèque du CNRGS.

L'objectif secondaire de l'étude était d'explorer les caractéristiques sérologiques, notamment l'expression des antigènes H et ABO, de certains échantillons présentant des génotypes *FUT1* / *FUT2* considérés d'intérêt.

Les applications résultant de cette étude sont les suivantes :

- Mise à jour dans le registre national du phénotype H des sujets étudiés.
- Mise à jour du phénotype des CGR de phénotypes H-déficients congelés à la Banque Nationale de Sang de Phénotype Rare.
- Utilisation « en routine » de ce génotypage pour les nouveaux sujets référés au CNRGS présentant un déficit d'expression de l'antigène H.
- Optimisation du diagnostic sérologique des phénotypes H-déficients, notamment par la sélection des réactifs d'origine humaine les plus adaptés après avoir été génotypés pour *FUT1*.
- Mise en évidence de nouvelles bases moléculaires à l'origine des phénotypes H:-1 et H:W1. À ce jour, seuls 55 allèles du gène *FUT1* sont répertoriés par l'ISBT comme étant associés à un phénotype H-déficient.

MATERIELS ET METHODES

I. Échantillons inclus

A. Origine des échantillons

Les échantillons inclus dans cette étude provenaient de la bibliothèque du Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins (CNRGS). Il s'agissait de prélèvements sanguins sur EDTA ou issus de CGR, conservés à -180°C en azote liquide sous formes de paillettes de volume d'environ 400 µL. La période de collection de ces échantillons s'étendait des années 1970 à 2014. Ces sujets étaient référencés dans le registre national des sujets présentant un phénotype érythrocytaire rare.

Le consentement des sujets était considéré comme implicite dans l'intérêt des soins prodigués et dans la mesure où il s'agissait d'une étude complémentaire par biologie moléculaire pour un groupage sanguin initialement prescrit, et non pas pour un diagnostic de pathologie. Il s'agit de la ligne de conduite suivie par le CNRGS et par la plupart des établissements de transfusion sanguine réalisant des examens de biologie moléculaire à but de prédiction de phénotypes de groupes sanguins.

B. Critère d'inclusion

La base de données du CNRGS a été interrogée afin de rechercher les sujets H-déficients référencés, pour lesquels au moins un échantillon de sang congelé en azote liquide était disponible pour étude en biologie moléculaire.

Le critère d'inclusion a donc été : tout échantillon de sang congelé disponible dans la bibliothèque du CNRGS, de phénotype référencé H:W1 ou H:-1.

C. Décongélation des échantillons

Les demandes de décongélation au cours de l'étude étaient effectuées via la base de données. Le personnel habilité à la manipulation de l'azote liquide effectuait une décongélation simple des paillettes. Pour les paillettes devant être utilisées en sérologie, des lavages en glycérol, sorbitol et eau physiologique étaient effectués afin d'éliminer le glycérol contenu dans le prélèvement.

II. Analyses génomiques par PCR et séquençage selon Sanger

A. Conception des amorces de PCR et de séquençage

Des amorces originales ont été conçues. Nous n'avons pas repris les amorces publiées dans la littérature pour plusieurs raisons : il s'agissait soit d'amorces destinées au séquençage après clonage alors qu'ici l'ADN génomique était séquençé, soit les amorces ne laissaient pas une distance de lecture suffisante dans les pieds d'introns. Il nous semblait également intéressant de mettre au point notre propre protocole.

1. Sélection des séquences de référence pour *FUT1* et *FUT2*

Le transcrit de référence utilisé était le NM_000148.3 pour le gène *FUT1* et le transcrit NM_000511.5 pour le gène *FUT2*. Les séquences sont disponibles sur la base de données NCBI Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) en format FASTA (format texte utilisé pour stocker des séquences d'acides nucléiques).

Les séquences complètes des gènes *FUT1* et *FUT2* sont détaillées dans l'annexe 1.



Le transcrit de *FUT2* choisi (NM_000511.5) pour cette étude est celui de référence pour les bases de données de polymorphismes génétiques (dbSNP, HGMD, ensembl.org...). Cependant, la majorité de la littérature concernant *FUT2* utilise le transcrit U17894 commençant 33 nucléotides en aval. Ceci entraîne un décalage systématique de 33 pb (et donc 11 acides aminés) de la dénomination de nos polymorphismes avec la littérature mais nous avons préféré être congruents avec les bases de données génétiques.

Exemple : le polymorphisme responsable du statut non sécréteur en Europe (rs601338).

Nomenclature « officielle » utilisée dans cette étude : c.461G>A.

Nomenclature « historique » de la littérature : c.428G>A.

2. Design et commande des amorces

L'objectif préliminaire de l'étude imposait de développer deux couples d'amorces spécifiques de *FUT1* et *FUT2*, amplifiant la totalité de leur séquence codante et au moins 50 à 100 pb de séquences non codantes bornantes ou « pieds d'introns » (pour le séquençage qui nécessite plusieurs dizaines de bases avant d'être lisible).

a) Primer-BLAST

La fonctionnalité et la spécificité des amorces d'amplification de *FUT1* et *FUT2* ont été vérifiées *in silico* à l'aide du logiciel gratuit Primer-BLAST, disponible également sur le site web du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Ce logiciel simule la compatibilité des amorces (Tm respectifs, GC%, recherche d'autohybridation ou d'hybridation entre les deux amorces).

Les amorces devant s'hybrider en une seule zone de l'ADN matrice, le logiciel Primer-BLAST aligne les amorces sur le génome humain afin de détecter si d'autres séquences peuvent s'hybrider avec les amorces. Ceci entraîne une perte de spécificité et dans le pire des cas une amplification parasite si les deux amorces du couple s'hybrident sur des séquences très rapprochées. Les écrans de résultats générés par Primer-BLAST pour nos amorces sont présentés en figures 14 et 15.

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TAACTTCCTCTTCCCTGGGACT	23	60.44	47.83	7.00	3.00
Reverse primer	TCTGGATACGGGCACCCATT	20	60.99	55.00	4.00	2.00

Products on target templates
>[NC_000019.10](#) Homo sapiens chromosome 19, GRCh38 Primary Assembly

product length = 1349
Features associated with this product:
[galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase 1](#)
[galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase 1 isoform X1](#)

Forward primer	1	TAACTTCCTCTTCCCTGGGACT	23
Template	48751408	48751386
Reverse primer	1	TCTGGATACGGGCACCCATT	20
Template	48750060	48750079

Figure 14 : écran de résultats de Primer-BLAST pour le couple d'amplification de *FUT1*

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTGCACACCACCGCATG	18	61.74	66.67	4.00	4.00
Reverse primer	TTCACAGAAGAGAGATGGGTCC	22	59.17	50.00	3.00	3.00

Products on target templates
>NC_000019.10 Homo sapiens chromosome 19, GRCh38 Primary Assembly

product length = 1229
Features associated with this product:
[galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase 2](#)
[galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase 2](#)

Forward primer	1	CCTGCACACCACCGCATG	18
Template	48702870	48702887
Reverse primer	1	TTCACAGAAGAGAGATGGGTCC	22
Template	48704098	48704077

Figure 15 : écran de résultats de Primer-BLAST pour le couple d'amplification de *FUT2*

Les amorces présentées dans les figures 14 et 15 étaient valides et spécifiques. Ce sont celles qui ont été utilisées pour l'amplification respective de la séquence codante de *FUT1* et *FUT2*.

b) SNPCheck3

Une étape supplémentaire de vérification des amorces était ensuite effectuée. Si un polymorphisme génétique est présent sur le gène à amplifier au niveau de la zone d'hybridation des amorces, l'amplification peut être inhibée, surtout en cas de polymorphisme présent à l'extrémité 3' de l'amorce.

Pour vérifier l'absence de polymorphisme fréquent à ce niveau, nous avons utilisé le logiciel SNPCheck3 (<https://secure.ngri.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm>), autre logiciel gratuit et disponible sur Internet. Aucun polymorphisme fréquent pouvant gêner l'amplification des gènes *FUT1* et *FUT2* n'était présent au niveau de nos amorces (cf. rapports SNPCheck3 en annexe 2).

c) Fabrication des amorces

Les amorces d'amplification et de séquence de cette étude ont été synthétisées par la société Eurofins Genomics.

B. Extraction et quantification de l'ADN génomique

1. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction d'ADN génomique des échantillons sanguins était réalisée dans les 30 minutes après décongélation. Le MagNA Pure (Roche), station de travail robotisée, a été utilisé. Le principe de l'extraction d'ADN repose ici sur la lyse

cellulaire et une digestion des protéines, puis la liaison des acides nucléiques à des billes de verre magnétiques. Une unité aimant permet ensuite de capter les billes magnétiques couvertes de l'ADN qui est ensuite purifié et élué.

2. Évaluation quantitative et qualitative des ADNs extraits

Le dosage de la concentration d'ADN extrait pour chaque échantillon était évaluée par détermination de l'absorbance des acides nucléiques. Le système utilisé était un Biophotomètre de la société Eppendorf. La concentration des acides nucléiques était mesurée par la lecture de l'absorbance à 260 nm. Le degré de pureté de l'ADN était évalué par la mesure de l'absorbance à 280 nm et le calcul du rapport A260/A280 idéalement compris entre 1,5 et 2. Les échantillons d'ADN étaient ensuite dilués à la concentration de 10 µg/mL pour pouvoir être utilisés lors des PCR.

C. Amplification par PCR des gènes *FUT1* et *FUT2*

1. Mix d'amplification

Le kit de réactifs utilisés pour la réaction de PCR était le kit HotStarTaq DNA Polymerase de la société Qiagen. Les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume de 25 µL par puits réactionnel en utilisant le mélange réactionnel suivant :

Tableau 3 : Mélange réactionnel utilisé pour l'amplification de la séquence codante des gènes *FUT1* et *FUT2*

Réactants PCR	Volume en µL par puits
Eau distillée stérile	12,2
PCR Buffer, 10x	2,5
Amorce sens (10 µM)	1,2
Amorce anti-sens (10 µM)	1,2
dNTP (2 mM chacun)	2,5
HotStarTaq DNA Polymerase	0,4
ADN (10 µg/mL)	5
<i>Volume total</i>	25

L'ajout de MgCl₂ supplémentaire ou l'utilisation de la Q-Solution contenue dans le kit n'ont pas été nécessaires.

2. Protocole d'amplification

L'amplification des ADN a eu lieu dans des thermocycleurs Gene Amp PCR System 2700-2720-9700 (Life Technologies, anciennement Applied Biosystems). Les conditions d'amplification étaient les suivantes :

Tableau 4 : Conditions d'amplification de la séquence codante de *FUT1* et *FUT2*

Étapes	Température	Temps
Activation de l'enzyme	95°C	15'
Dénaturation des brins d'ADN	94°C	30"
Hybridation des amorces	60°C	30"
Élongation	72°C	1'30"
Élongation finale	72°C	10'
Repos	4°C	∞

} x30 cycles

L'enzyme HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) nécessitait une étape préliminaire d'activation par la chaleur pendant 15 minutes.

3. Analyse préalable des produits de PCR par électrophorèse

Les produits de PCR obtenus étaient systématiquement analysés en électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% – BET avec migration à 100 volts pendant 45 minutes après marquage au bleu de bromophénol. Une photographie du gel était ensuite prise sous illumination UV.

L'obtention d'une seule bande spécifique de taille estimée correspondant à la taille attendue des amplicons (1349 pb pour *FUT1* et 1229 pb pour *FUT2*) permettait de confirmer le fonctionnement de la PCR et la spécificité de la réaction. L'absence de contamination était vérifiée par l'analyse du puits témoin « H₂O » sans ADN de la PCR pour lequel aucune bande ne devait apparaître.

D. Séquençage des gènes *FUT1* et *FUT2*

1. Purification ExoSAP-IT des produits de PCR

Ce réactif commercial (société USB) était composé :

- d'une exonucléase I éliminant l'excès d'amorces non consommées durant la réaction d'amplification ;
- d'une phosphatase alcaline de crevette dégradant les dNTPs en excès.

Les amorces de séquence utilisées en première intention pour les réactions de séquence étaient les suivantes :

Tableau 5 : Amorces de séquence de première intention

Gène	Amorce sens (S) ou anti-sens (AS)	Intitulé de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')
<i>FUT1</i>	S	FUT1-F1	TAACCTCCTCTTTCCCTGGGACT (identique amorce PCR)
<i>FUT1</i>	S	FUT1-F2	ATCAGATGGGACAGTATGCCAC
<i>FUT1</i>	S	FUT1-F3	GCACCTTTGTCGGCGTCC
<i>FUT2</i>	S	FUT2-F1	CCTGCACACCACCGCATG (identique amorce PCR)
<i>FUT2</i>	S	FUT2-F2	TGGCCAAGATGAACGGGC
<i>FUT2</i>	AS	FUT2-R3	TTCACAGAAGAGAGATGGGTCC (identique amorce PCR)

Des amorces supplémentaires ont été conçues pour confirmer les mutations en séquençant le fragment dans le sens contraire, ou dans l'hypothèse où une amorce ne fonctionnerait pas (polymorphisme sous-jacent) :

Tableau 6 : Amorces de séquence de deuxième intention

Gène	Amorce sens (S) ou anti-sens (AS)	Intitulé de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')
<i>FUT1</i>	AS	FUT1-R1	CTTCAGGAAAGGATCTCTCAAGT
<i>FUT1</i>	AS	FUT1-R2	TTTCTTTACACCACTCCATGCCG
<i>FUT1</i>	AS	FUT1-R3	TCTGGATACGGGCACCCATT (identique amorce PCR)
<i>FUT2</i>	AS	FUT2-R1	CGGTGAAGCGGACGTA
<i>FUT2</i>	AS	FUT2-R2	GTGGGAGGTGTCAATGTTCT
<i>FUT2</i>	S	FUT2-F3	CCATGTCATGCCAAAAGTGTGGA

Le mélange réactionnel utilisé pour les réactions de séquence était le suivant :

Tableau 7 : Mélange réactionnel utilisé pour les réactions de séquence des gènes *FUT1* et *FUT2*

Réactants pour séquence	Volume en μL par puits
Eau distillée stérile	12,5
BigDye Sequencing Buffer, 5X	3,5
Reaction Premix BigDye (ddNTPs, enzyme)	1
Amorce (3,2 μM)	2
Produit de PCR, purifié	1
<i>Volume total</i>	20

Le programme utilisé pour les réactions de séquence était le suivant :

Tableau 8 : Conditions des réactions de séquence des gènes *FUT1* et *FUT2*

Étapes	Température	Temps
Dénaturation initiale	96°C	1'
Dénaturation	96°C	30"
Hybridation de l'amorce	50°C	30"
Élongation	60°C	1'30"
Repos	4°C	∞

} x25 cycles

3. Purification en colonne des produits de séquence

Le système de purification en colonnes individuelles DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) a été utilisé. Le principe reposait sur la filtration des produits de séquence par centrifugation dans le gel pré-hydraté contenu dans les colonnes de purification. Les dNTPs et ddNTPs non incorporés lors de la réaction de séquence étaient retenus dans la matrice du gel. Après une courte étape de centrifugation les produits de séquence purifiés étaient prêts à être chargés sur la plaque du séquenceur.

4. Électrophorèse capillaire

Le principe du séquençage selon Sanger reposant sur la détection de la fluorescence émise par le dernier ddNTP incorporé, les produits de réaction de séquence devaient donc être séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire permettant d'atteindre une résolution de lecture d'une base. À l'extrémité

du capillaire, les fragments passaient un à un par taille croissante devant le faisceau laser, et la fluorescence émise par le ddNTP terminal était enregistrée pour en déduire la séquence du produit. Cette étape avait lieu au CNRGS dans un séquenceur 4 capillaires ABI Prism 3130 (Life technologies, anciennement Applied Biosystems).

Les produits de séquence étaient d'abord déposés en solution de formamide sur une plaque compatible avec le séquenceur. La plaque était ensuite insérée pour migration dans les capillaires contenant une substance polymère (POP-7TM Polymer). Les chromatogrammes de séquence étaient ensuite enregistrés au format « *.ab1 ».

E. Interprétation des séquences

1. Lecture des séquences

Les chromatogrammes natifs (fichiers *.ab1 ou « *raw data* ») étaient lus par le logiciel SeqScape et alignés avec les séquences de référence de *FUT1* et *FUT2* que nous avons incrémentées dans le logiciel. Pour chaque base séquencée, ce logiciel propose un indice QV (*Quality Value*) indiquant la limite de confiance dans l'interprétation des données par le logiciel (mauvaise lisibilité, ambiguïtés).

Les valeurs de qualité sont calibrées sur une échelle correspondant à :

$$QV = -10 \log_{10}(Pe) \quad \text{où } Pe \text{ est la probabilité d'erreur (tableau 9).}$$

Les valeurs de qualité générées sont comprises entre 1 et 99.

Tableau 9 : Probabilité d'erreur d'assignation des bases en fonction du QV

Quality Value	Probabilité d'erreur (en %)
10	10
20	1
30	0,1
40	0,01
50	0,001

QV : *Quality value*

Tableau 10 : Interprétation des QV calculés par SeqScape dans l'étude

Couleur de la barre de QV	Valeur de QV	Base considérée comme :
Rouge	0 à 14	Non acceptable
Jaune	15 à 19	À vérifier visuellement, voire à repasser
Bleue	20 à 99	Acceptée

QV : *Quality value*

2. Interprétation des mutations : bases de données et logiciels de prédiction

La nomenclature utilisée pour définir les variations de séquence était celle recommandée par HGVS (*Human Genome Variation Society*)⁽⁶⁹⁾, largement répandue dans la littérature.

Des fiches d'enregistrement pour standardiser l'interprétation des séquences de *FUT1* et *FUT2* ont été créées, recensant les polymorphismes les plus fréquents (cf. annexe 3). Tous les autres polymorphismes détectés non présents sur la fiche du gène correspondant étaient explorés via les moyens suivants :

- recherche de ce polymorphisme dans la base de données des allèles connus pour *FUT1* et *FUT2* sur le site web de l'ISBT et dbRBC⁽⁷⁰⁾ ;
- base de données de polymorphismes : dbSNP sur NCBI, Ensembl.org ;
- utilisation de logiciels d'algorithmes de prédiction d'altération des protéines par les variations de séquence : PolyPhen-2, SIFT, MutationTaster, Align-GVGD.

Les mutations non décrites à ce jour pour *FUT1* et *FUT2* étaient vérifiées par reséquençage à l'aide d'amorces de sens contraire (amorces du tableau 6).

III. Analyses sérologiques

A. Données sérologiques rétrospectives

Les dossiers contenant les explorations sérologiques des échantillons ont été revus afin d'intégrer ces données rétrospectives (intensité de l'anticorps, phénotypes ABO, H, LE obtenus) à l'étude.

B. Techniques sérologiques utilisées

Le test indirect à l'antiglobuline (TIA) en technique gel microfiltration sur cassette IgG (Bio-Rad) a été principalement utilisé. Le principe consiste à mettre en contact 50 μ L d'une solution d'hématies en ID-Diluent 2 (Bio-Rad) avec 25 μ L de plasma, ceci dans une cassette de gel microfiltration contenant des immunoglobulines anti-IgG humaines. Après 15 minutes d'incubation à 37°C, une centrifugation de la cassette est effectuée : une hémagglutination (empêchant la migration des hématies vers le fond du puits) est observée si les anticorps du plasma reconnaissent un antigène sur les hématies.

Les intensités des réactions ont été évaluées selon la figure 17.

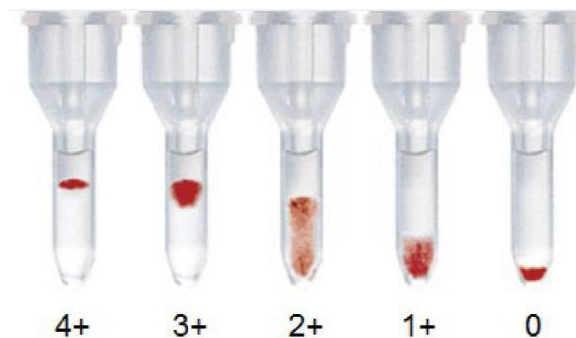


Figure 17 : Intensités des agglutinations en technique microfiltration

C. Réactifs anti-H1 utilisés dans l'étude

1. Réactifs humains

a) Titrages

Des plasmas de la bibliothèque du CNRGS issus de cinq sujets H-déficients connus pour leur anti-H puissant ont été titrés en technique TIA microfiltration vis-à-vis d'un pool de trois hématies O; LE:1,-2.

Des dilutions géométriques de raison 2 du plasma étaient préparées en solution saline 0,9%. Le titre retenu était l'inverse de la dernière dilution pour laquelle une agglutination $\geq 1+$ était observée. Le score d'agglutination était également calculé : 4+ : 12 points ; 3+ : 10 points ; 2+ : 8 points ; 1+ : 5 points ; (+) : 2 points ; intensité *strong* « s » : + 1 point.

b) Fixations-éluions

Ces plasmas anti-H de haut titre contenaient également des anticorps anti-A et anti-B. L'adaptation de ces plasmas en réactif « tout groupe » a été effectuée en réalisant une fixation-éluion afin de fixer l'anti-H puis de l'éluier pour récupérer un réactif concentré et déplété en anti-A et en anti-B.

Le plasma était incubé à 37°C avec des hématies O; LE:1,-2 puis des lavages successifs à 37°C étaient effectués. La dernière eau de lavage était testée en TIA pour vérifier l'absence d'anticorps anti-A et anti-B résiduels. L'éluion était effectuée en technique acide (Gamma ELU-KIT II, Immucor) et l'éluat titré sur hématies O; LE:1,-2 en TIA.

2. Réactifs monoclonaux

Les réactifs anti-H monoclonaux Immucor (Immucor) et de la société Jacques Boy ont été utilisés pour évaluer la quantité d'antigène H exprimée par les échantillons. La technique était l'agglutination directe en tube sur hématies natives selon les recommandations des fournisseurs et adaptée sur hématies papainées.

D. Étude phénotypique de l'antigène H des échantillons

Des paillettes de sang des échantillons inclus dans cette étude, présentant des mutations considérées d'intérêt, étaient décongelées pour étude en TIA avec des plasmas anti-H de haut titre dilués à différentes concentrations. Ceci avait pour but d'estimer les uns par rapport aux autres la quantité d'antigène H exprimée par ces sujets H-déficients.

Les tests ont été réalisés sur hématies natives et papainées (papaine PALERM, Diagast) selon disponibilité des ressources biologiques. Un témoin négatif (hématie H:-1) et des témoins de phénotype O et A₁ étaient réalisés en parallèle à ces réactions.

E. Étude phénotypique des antigènes A et B des échantillons

Les hématies de certains échantillons H-déficients exprimant des antigènes A et B et considérés d'intérêt ont été testées en technique d'agglutination directe par microfiltration. Les réactifs utilisés étaient les cassettes ID-Card « Diaclon ABO/Rh for Patients » de la société Bio-Rad comprenant des anticorps anti-A, anti-B et anti-A,B monoclonaux ainsi que des cassettes comprenant des anticorps polyclonaux anti-A et anti-B humains (ID-Card ABO/Rh, société Bio-Rad également).

Comme préconisé par le fournisseur, les hématies étaient diluées en ID-Diluent 2 pour les analyses sur gels à anticorps monoclonaux et en ID-Diluent 1 (broméline) pour les analyses sur gels à anticorps polyclonaux.

Ces tests ont été réalisés sur hématies natives et papainées (papaine PALERM, Diagast) pour les gels monoclonaux. L'étude des hématies papainées sur gels ABO monoclonaux était une technique adaptée afin de sensibiliser la recherche des antigènes A et B.

RESULTATS

I. Échantillons inclus

A. Diagramme de flux

L'extraction de données à l'aide de la base CNRGS a révélé l'existence de 85 sujets présentant un phénotype H-déficient (référéncés H:W1 ou H:-1) et dont au moins un échantillon de sang congelé en paillette était disponible pour étude en biologie moléculaire. Onze échantillons n'ont pas été analysés car disposant d'un membre de la fratrie déjà étudié. L'extraction d'ADN a ensuite échoué pour quatre échantillons qui n'ont pas non plus pu être analysés. Au total, la séquence codante de *FUT1* a été obtenue pour 70 échantillons (figure 18).

B. Caractéristiques initiales des échantillons inclus

Les caractéristiques principales des 85 échantillons H-déficients inclus sont détaillées dans l'annexe 4 qui comprend également les résultats de séquençage. Préalablement à l'étude, 62 sujets référencés étaient considérés de phénotype H:-1 et 23 de phénotype H:W1. La proportion de sujets de sexe féminin était de 62%.

Le phénotype LE:-1,-2 était retrouvé chez 17% des sujets contre 6% dans la population générale d'Europe de l'Ouest. Cela n'avait pas de signification particulière, le phénotype LE:-1,-2 étant fréquemment acquis pendant la grossesse⁽⁴⁰⁾. Or, le phénotype H-déficient des sujets avait souvent été découvert au cours des examens immuno-hématologiques obligatoires pendant la grossesse (au moins 23% des diagnostics, tous les cas n'étant pas documentés). Le phénotype LE (Lewis) reflétait le statut non sécréteur (*ie.* deux allèles *FUT2* nuls) d'un sujet lorsqu'il était LE:1,-2 ou le statut sécréteur (*ie.* au moins un allèle *FUT2* fonctionnel) lorsqu'il était LE:-1,2. Lorsque le phénotype était LE:-1,-2 donc correspondant à deux allèles *FUT3* nuls, le statut sécréteur pouvait être déterminé par étude moléculaire du gène *FUT2*.

Une grande partie des échantillons de l'étude était issue de sujets originaires de La Réunion (46%), ce qui est logique étant donné qu'il s'agit du foyer français de sujets H-déficients. Le reste des échantillons était d'origine assez variée puisque les sujets originaires d'Europe de l'Ouest ne constituaient que 16% des échantillons.

L'objectif principal de cette étude était de mettre en évidence les bases moléculaires du déficit d'expression de l'antigène H d'une cohorte d'échantillons H-déficients. Si plusieurs membres d'une même fratrie étaient inclus, seul l'un d'eux était étudié en biologie moléculaire. En effet, s'agissant d'anomalies exceptionnelles, la même base moléculaire dans une fratrie atteinte était attendue pour toute la fratrie.

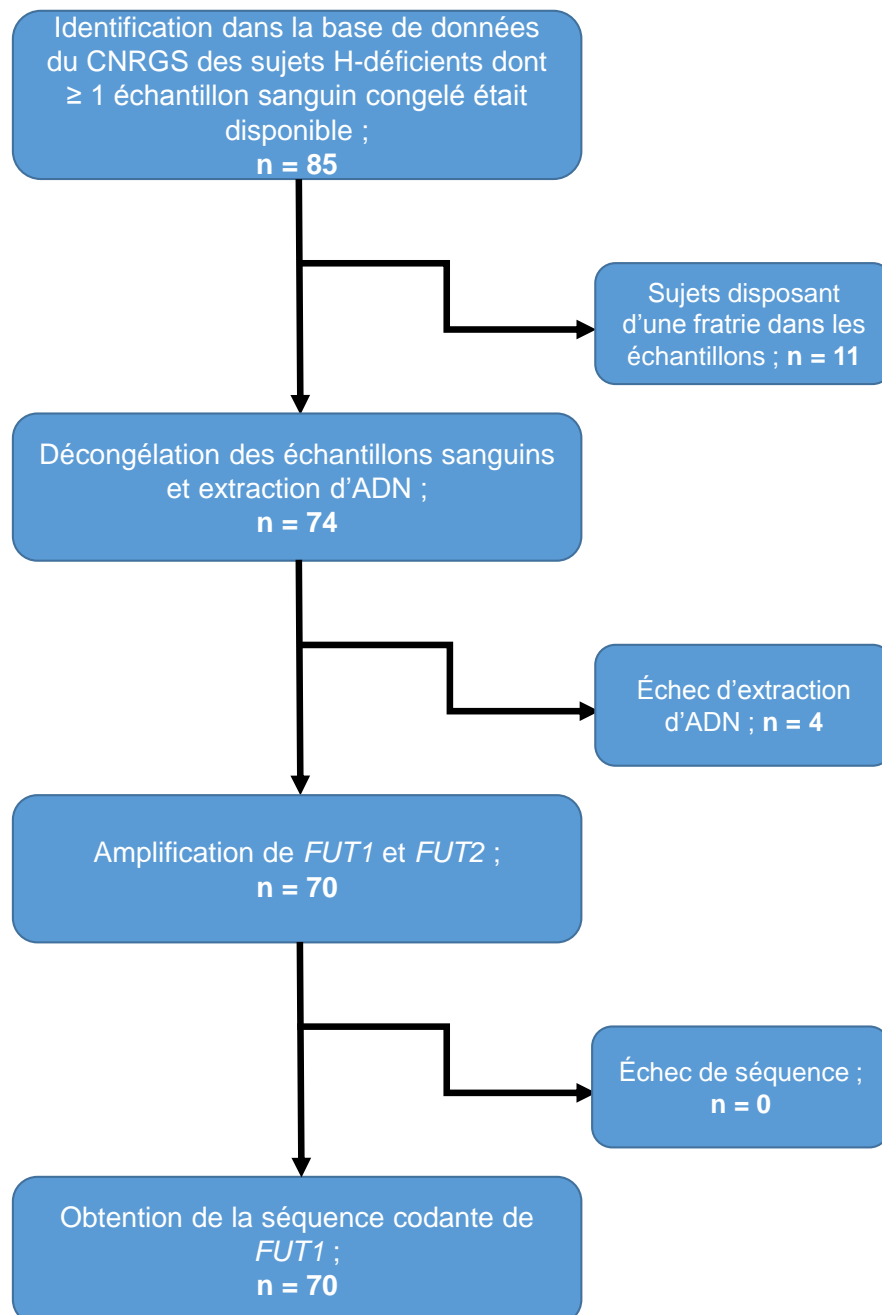


Figure 18 : Diagramme de flux des 85 échantillons satisfaisant au critère d'inclusion

II. Analyses génomiques par PCR et séquençage selon Sanger

A. Amplification par PCR des gènes *FUT1* et *FUT2*

Les amplifications des séquences codantes des gènes *FUT1* et *FUT2* entraînaient de façon systématique avec le protocole utilisé la production d'une seule bande en électrophorèse, de la taille attendue (1349 pb pour *FUT1* et 1229 pb pour *FUT2*) chez les ADNs témoins et les ADNs inclus dans l'étude. Certains échantillons H-déficients, la plupart d'origine indienne ou sri lankaise, présentaient une absence d'amplification pour le gène *FUT2* (figure 19). Ce phénomène était attendu puisqu'il a été montré que la mutation de *FUT1* à l'origine du phénotype « Bombay » décrit par Bhende en 1952⁽⁴⁵⁾ ségrégeait avec une délétion complète du gène *FUT2*⁽⁴⁶⁾.

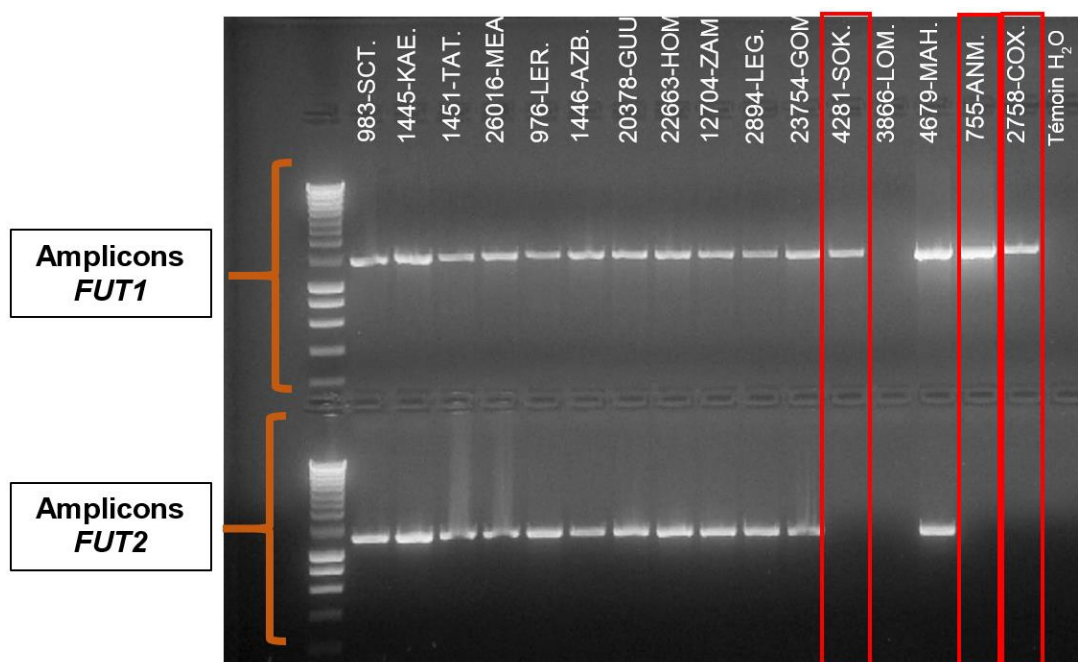


Figure 19 : Exemples de résultats d'amplification des gènes *FUT1* et *FUT2*

Les trois sujets encadrés en rouge présentaient une amplification de *FUT1* sans amplification de *FUT2* ce qui concordait avec leur origine indienne. Le sujet 3866-LOM. présentait quant à lui un échec d'amplification des deux gènes, dû à un ADN de mauvaise qualité (rapport A260/A280 à 3,13).

Quatre échantillons ont présenté des échecs de d'amplification attendus au vu des rapports A260/A280 médiocres (2,5 à 3,5). Ces quatre échantillons ont été exclus de l'étude. L'ADN dégradé de ces échantillons sanguins pourrait s'expliquer par l'origine des paillettes (CGR déleucocytés) ou par la présence d'inhibiteurs de PCR.

La mise au point des PCR *FUT1* et *FUT2* était ainsi fonctionnelle. L'ADN des témoins normaux et des sujets inclus était amplifié de façon spécifique.

Au total, 70 échantillons de phénotypes H-déficients ont été amplifiés pour *FUT1* et 57 pour *FUT2*. Les 13 échantillons ne présentant pas d'amplification pour *FUT2* étaient tous originaires de régions proches de l'Océan Indien (Inde, La Réunion, Sri Lanka, Île Maurice) et présentaient un phénotype « Bombay ».

B. Résultats du séquençage des gènes *FUT1* et *FUT2*

1. Données globales

Un séquençage complet des parties codantes des gènes *FUT1* et *FUT2* a été obtenu pour les ADNs témoins, avec une QV satisfaisante pour toutes les bases et une étendue de lecture en 5'UTR et 3'UTR suffisante. Le protocole de séquençage mis au point était donc fonctionnel. Il s'agissait de l'objectif préliminaire de l'étude.

Ce protocole a ainsi été appliqué aux 70 échantillons inclus et amplifiés : tous ont bénéficié d'un séquençage de *FUT1* de qualité satisfaisante. Des mutations du gène *FUT1* à l'état homozygote ou hétérozygote composite pouvant expliquer le phénotype H-déficient ont été mises en évidence pour 65 échantillons sur 70. Un aperçu de la répartition des mutations séquencées est exposé en figure 20.

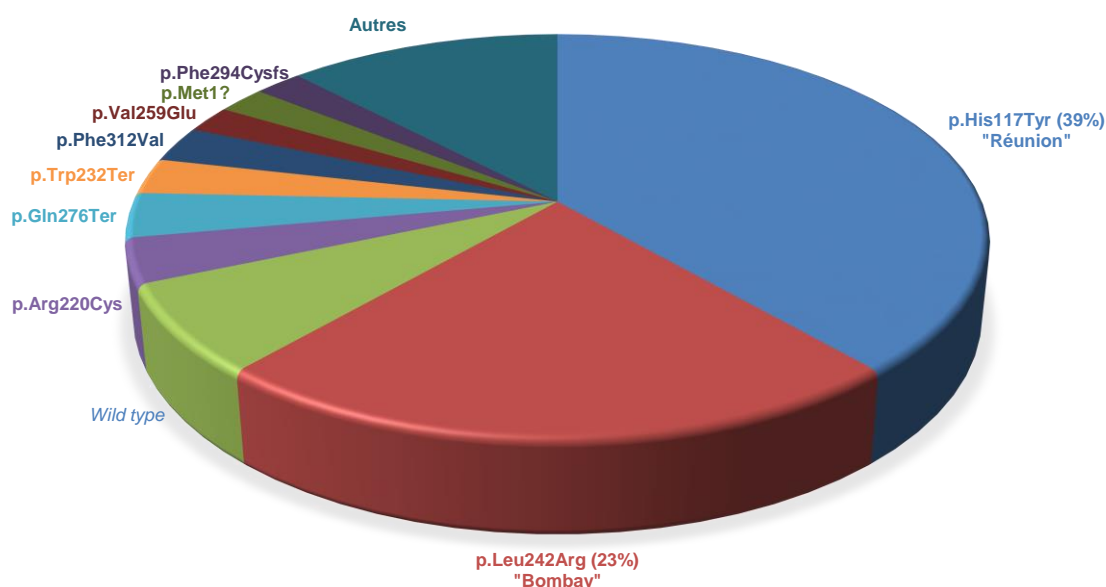


Figure 20 : Répartition des mutations de *FUT1* séquencées (n = 140 allèles)

Les génotypes issus du séquençage de *FUT1* sont globalement présentés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Génotypes *FUT1* obtenus chez les 70 sujets séquencés

Génotype <i>FUT1</i>	Nombre (n = 70)	
Mutation "Bombay" homozygote	13	19%
Mutation "Réunion" homozygote	24	34%
Séquence <i>wild type</i> (normale)	5	7%
Autres mutations homozygotes ou hétérozygotes composites	28	40%

Parmi les 28 génotypes *FUT1* mutés autres que les classiques « Bombay » et « Réunion », 19 mutations atypiques différentes ont été mises en évidence. Neuf d'entre elles n'étaient pas répertoriées dans les 55 allèles *FUT1* reconnus par l'ISBT comme entraînant un phénotype H-déficient.

Ce génotypage *FUT1* de l'ensemble de la cohorte correspondait à l'objectif principal de notre étude.

Des exemples de chromatogrammes illustrant ces mutations de *FUT1* non répertoriées sont présentés dans les figures 21 à 23.

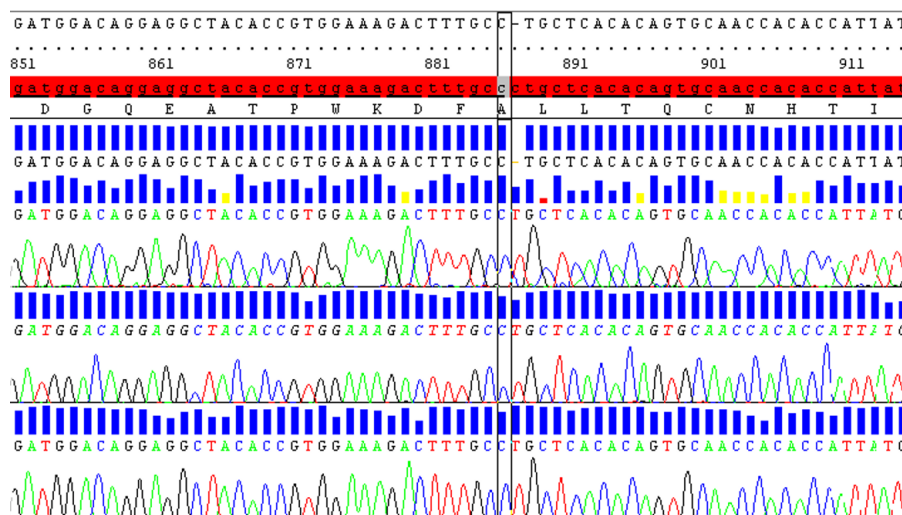


Figure 21 : Mutation *FUT1*:c.886delC homozygote de l'échantillon 2683-CHM. Le nucléotide C en position 886 est ici manquant par rapport à la séquence de référence (ligne en rouge). Le fait que cette mutation soit en (apparente) homozygotie ne provoque pas de chevauchement de séquence au niveau du logiciel de lecture. Cette mutation a été mise en évidence par deux amorces de séquençage sens et une anti-sens.

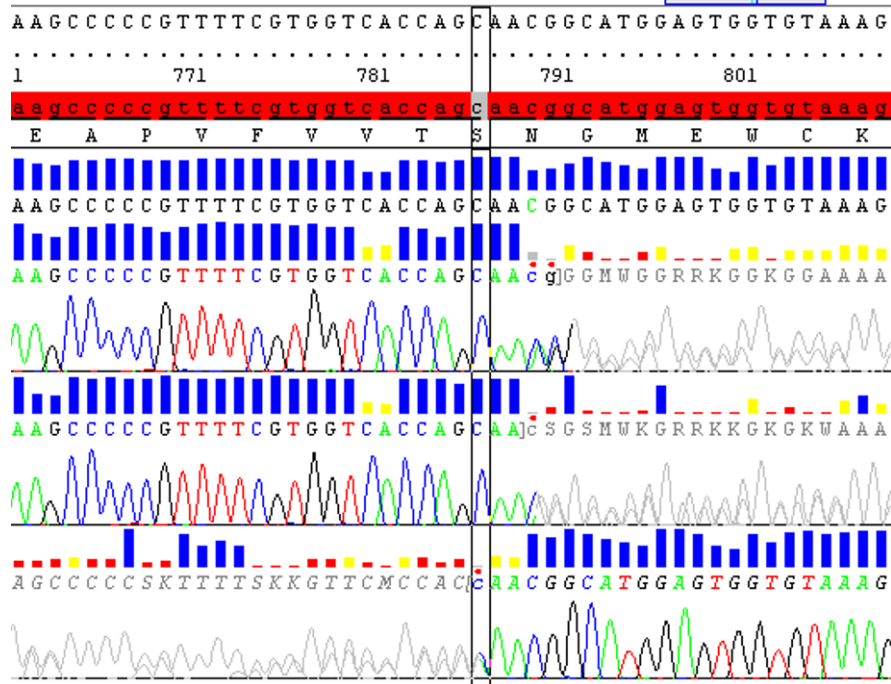


Figure 22 : Mutation *FUT1*:c.788dupA hétérozygote de l'échantillon 957-JUP. Le nucléotide A en position 788 est dupliqué pour un seul des deux allèles séquencés, ce qui entraîne sur le logiciel de lecture le chevauchement des deux séquences (en 3' de la mutation pour la séquence sens et en 5' pour la séquence anti-sens).

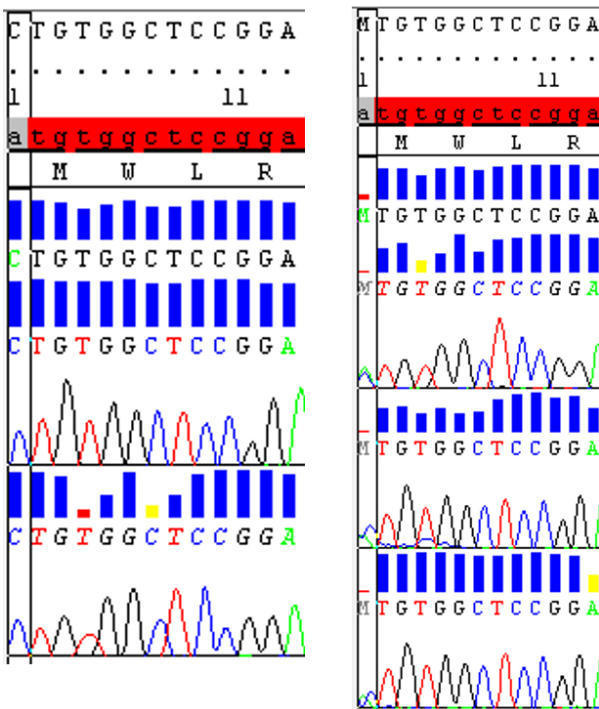


Figure 23 : Mutation *FUT1*:c.1A>C des échantillons 983-SCT. (homozygote) et 957-JUP. (hétérozygote) Cette mutation affecte le codon d'initiation de *FUT1*.

Le séquençage de la partie codante du gène *FUT2* a également été obtenu pour les ADNs témoins et n'a été réalisé que pour les échantillons présentant une mutation « atypique » de *FUT1*, c'est-à-dire lorsqu'une mutation autre que c.725T>G (p.Leu242Arg) ou c.349C>T (p.His117Tyr) était présente. Les raisons de ce choix

étaient diverses : tout d'abord économiques, ensuite le statut du gène *FUT2* était reflété par le phénotype LE (Lewis), enfin l'allèle *FUT1*01W.03* (c.349C>T) spécifique du phénotype H-déficient « Réunion » était connu pour ségréger avec l'allèle non sécréteur « caucasien » de *FUT2* (*FUT2*01N.02*)⁽⁵⁷⁾.

Tous les sujets dont le gène *FUT2* n'avait pas été amplifié se sont révélés être homozygotes pour la mutation *FUT1:c.725T>G* spécifique du phénotype « Bombay » classique, connue pour ségréger avec une délétion de *FUT2*⁽⁴⁶⁾ ce qui confirmait la validité et la spécificité de nos PCR. Le pseudogène *Sec1* n'était donc pas amplifié.

Le détail des génotypes obtenus pour chaque échantillon est présenté en annexe 4.

2. Interprétation des données de séquence

a) Les mutations de *FUT1* non répertoriées par l'ISBT

Neuf mutations de *FUT1* non répertoriées par l'ISBT ont été mises en évidence lors de cette étude.

Parmi elles, trois entraînent un décalage du cadre de lecture du transcrit par les ribosomes et étaient sans aucun doute à l'origine d'un défaut total de la protéine *FUT1* codée par ces allèles (*frameshift*) : **c.788dupA** à l'état hétérozygote chez 957-JUP., **c.886delC** à l'état homozygote chez 2683-CHM. et **c.966dupT** à l'état homozygote chez 23473-DIH.

Quatre mutations faux-sens de *FUT1* ont été mises en évidence : **c.323G>T (p.Arg108Leu)** chez 26016-MEA. à l'état hétérozygote, **c.934T>G (p.Phe312Val)** chez 954-JOE. et 982-TUB. à l'état homozygote, **c.1022C>T (p.Pro341Leu)** chez 22663-HOM. à l'état homozygote. La mutation **c.528T>A (p.His176Gln)** jamais décrite retrouvée chez 1332-VAB. (homozygote) et 22663-HOM. (hétérozygote) était de signification inconnue et ici sans conséquence, car sur le même allèle que la mutation non-sens 695G>A (Trp232Ter).

Les résultats des logiciels de prédiction d'altération de protéine pour ces mutations faux-sens sont exposés dans le tableau 12.

Une mutation « originale » a été mise en évidence : la délétion de 3 nucléotides **c.396_398del (p.Pro133del)** qui entraîne la suppression d'un acide aminé (proline) en respectant le cadre de lecture, à l'état hétérozygote chez 4679-MAH.

Enfin, la mutation **c.1A>C** retrouvée à l'état hétérozygote chez 957-JUP. et à l'état homozygote chez 983-SCT. semblerait altérer le codon d'initiation de *FUT1* en remplaçant la méthionine par une leucine.

Cependant, l'échantillon 983-SCT., non sécréteur, présentait cette mutation de façon homozygote et pourtant exprimait des quantités non négligeables d'antigène H (cf. Rodier *et al.*⁽⁶³⁾, article publié en 1974 dont ce sujet était le propositus, et la partie sérologie de l'étude). Ce phénomène inattendu nous a poussés à développer une nouvelle paire d'amorces pour ré-amplifier cette zone et séquencer à nouveau. Cela avait pour but de vérifier que l'amplification d'un éventuel autre allèle n'avait pas été inhibée par un polymorphisme au niveau de la zone d'hybridation des amorces utilisées en première intention. La vérification a confirmé cette mutation *FUT1*:c.1A>C à l'état homozygote chez 983-SCT. Ce cas a fait l'objet d'un poster présenté au congrès annuel de l'ISBT à Londres en juillet 2015 (Letizia *et al.*⁽⁷¹⁾, présenté en annexe 5).

Tableau 12 : Résultats des logiciels de prédiction pour les mutations faux-sens

Mutations faux sens de <i>FUT1</i> mises en évidence dans l'étude	Échantillons	Logiciels de prédiction			
		SIFT	Polyphen-2	Mutation Taster	Align-GVGD
c.1A>C p.Met1?	957-JUP. (hétérozygote), 983-SCT. (homozygote)	Deleterious	Probably damaging	Non applicable	Non applicable
c.323G>T p.Arg108Leu	26016-MEA. (hétérozygote)	Tolerated	Probably damaging	Polymorphism	C0 (unlikely deleterious)
c.528T>A p.His176Gln	1332-VAB. (homozygote), 22663-HOM. (hétérozygote)	Tolerated	Probably damaging	Polymorphism	C0 (unlikely deleterious)
c.934T>G p.Phe312Val	954-JOE. (homozygote), 982-TUB. (homozygote)	Deleterious	Probably damaging	Disease causing	C0 (unlikely deleterious)
c.1022C>T p.Pro341Leu	22663-HOM. (hétérozygote)	Tolerated	Probably damaging	Polymorphism	C0 (unlikely deleterious)
c.293C>T p.Thr98Met	Phénotype prédit : H:W1	Deleterious	Probably damaging	Disease causing	C0 (unlikely deleterious)
c.328G>A p.Ala110Thr	Phénotype prédit : H:W1	Tolerated	Probably damaging	Polymorphism	C0 (unlikely deleterious)
c.349C>T p.His117Tyr	Phénotype prédit : H:W1 "Réunion"	Deleterious	Probably damaging	Disease causing	C0 (unlikely deleterious)
c.424C>T p.Arg142Trp	Phénotype prédit H:W1	Deleterious	Probably damaging	Polymorphism	C0 (unlikely deleterious)
c.658C>T p.Arg220Cys	Phénotype prédit : H:-1	Deleterious	Probably damaging	Disease causing	C65 (likely deleterious)
c.725T>G p.Leu242Arg	Phénotype prédit : H:-1 "Bombay"	Deleterious	Probably damaging	Disease causing	C35 (possibly deleterious)
c.776T>A p.Val259Glu	Phénotype prédit : H:-1	Deleterious	Probably damaging	Disease causing	C65 (likely deleterious)

Les cinq premières lignes correspondent aux nouvelles mutations faux-sens décrites dans ce travail. Pour comparaison, les lignes suivantes indiquent des mutations également retrouvées dans l'étude qui ont déjà été publiées et leur phénotype prédit.

Les localisations de ces mutations faux-sens au niveau de la structure linéaire de la protéine FUT1 sont exposées dans la figure 24.

Il est probable que les mutations faux-sens intervenant dans le domaine catalytique soient plus délétères que celles intervenant dans la région souche (soutenant le site catalytique) de l'enzyme. Les trois mutations faux-sens retrouvées dans l'étude et entraînant des allèles *FUT1* nuls étaient d'ailleurs situées dans le site catalytique (p.Arg220Cys, p.Leu242Arg et p.Val259Glu).

Ces nouvelles mutations seront prochainement soumises pour référencement à l'ISBT et GenBank (NCBI).

b) Les mutations de *FUT1* atypiques répertoriées par l'ISBT

i. Mutations entraînant une protéine *FUT1* inactive

c.551_552delAG (p.Glu184Valfs) et **c.881_882delTT (p.Phe294Cysfs)** sont des délétions de deux nucléotides entraînant un décalage du cadre de lecture (*frameshift*) avec l'apparition d'un codon stop prématuré et une protéine FUT1 inactive. Ces mutations ont été décrites pour la première fois en 1997 par Yu *et al.* chez des sujets chinois⁽⁷²⁾. Depuis, ces deux mutations ont été retrouvées à plusieurs reprises, toujours chez des sujets d'origine chinoise, ségrégeant avec un allèle *FUT2* fonctionnel dit sauvage. Ces mutations semblent être la base moléculaire prévalente des phénotypes H-déficients en Chine.

Nous avons retrouvé ces deux mutations chez trois échantillons différents dans notre collection : c.881_882delTT en homozygotie chez un sujet d'origine cambodgienne (1451-TAT.), c.551_552delAG et c.881_882delTT en double hétérozygotie chez un sujet d'origine chinoise (2261-PEM.) et c.551_552delAG chez un sujet d'origine réunionnaise, en double hétérozygotie avec la mutation classique réunionnaise (chez 12704-ZAM.). Pour nos trois échantillons, ces allèles mutés de *FUT1* étaient effectivement transmis en haplotype avec un allèle *FUT2* sauvage.

Plusieurs échantillons de notre étude présentaient la mutation **c.658C>T (p.Arg220Cys)** également reportée par Yu *et al.* dans la même publication que ci-dessus⁽⁷²⁾ et dans d'autres études ultérieures chez plusieurs sujets chinois. Cet allèle de *FUT1* ségrégeait systématiquement avec un allèle *FUT2* fonctionnel.

Nous décrivons donc ici pour la première fois l'allèle *FUT1*:c.658C>T chez des sujets non asiatiques : 938-BEB. et 6077-ZEM. originaires d'Afrique du Nord. La

mutation était présente chez ces échantillons à l'état homozygote et était, contrairement aux sujets chinois décrits dans la littérature, associée à l'allèle *FUT2* non sécréteur typique des sujets caucasiens : *FUT2*:c.[461G>A;772G>A] (c.[428G>A;739G>A] en dénomination usuelle). Le phénotype H:-1 de 938-BEB. et 6077-ZEM., peu importe la technique sérologique utilisée, les rendait similaires à des sujets « vrais Bombay », au moins du point de vue de l'expression de l'antigène H.

Nous avons par ailleurs retrouvé dans notre collection cette mutation c.658C>T chez un échantillon d'origine thaïlandaise (23478-TAN.), mais dans l'haplotype classique asiatique, associée à un allèle *FUT2* fonctionnel.

Au Japon, la mutation non-sens **c.695G>A (p.Trp232Ter)** entraînant un codon stop prématuré avait été reportée en 1997 par Kaneko *et al.* à l'état homozygote chez quatre sujets japonais H-déficients⁽⁷³⁾. De façon associée, ces sujets portaient tous à l'état homozygote la mutation de *FUT2* entraînant le statut « sécréteur faible » spécifique de la population d'Asie de l'Est (*FUT2*:c.418A>T ou c.385A>T en dénomination usuelle).

Cet haplotype n'était pas retrouvé dans les trois échantillons d'origine caucasienne de notre collection présentant cette mutation c.695G>A de *FUT1* (992-BOG., 1332-VAB. et 22663-HOM.). La mutation ségrégeait chez 1332-VAB. et 22663-HOM. avec l'allèle *FUT2* non sécréteur typique des sujets caucasiens.

Chez 1332-VAB. et 22663-HOM. les allèles de *FUT1* présentant cette mutation non-sens c.695G>A comprenaient également la mutation : **c.528T>A (p.His176Gln)** présentée ci-dessus dans les mutations non décrites à ce jour, de signification inconnue puisque située sur un allèle d'emblée silencieux. Cette mutation supplémentaire était de façon surprenante absente de l'échantillon 992-BOG.

Une hypothèse pour expliquer l'existence de la mutation c.695G>A sur ces trois haplotypes différents dans (au moins) deux régions géographiques distinctes pourrait être la présence d'un *hotspot* mutationnel sur ce nucléotide c.695G.

La mutation **c.422G>A (p.Trp141Ter)** a été reportée en 2006 par Storry *et al.* chez un sujet suisse à l'état hétérozygote avec un autre allèle *FUT1* nul⁽⁵¹⁾. Ce sujet était non sécréteur, homozygote pour la mutation non-sens de *FUT2* retrouvée classiquement chez les caucasiens.

Nous avons mis en évidence cette mutation non-sens c.422G>A à l'état homozygote chez un sujet d'origine iranienne (23443-SAT.), associée au classique allèle *FUT2* non sécréteur caucasien. L'haplotype était donc identique à celui décrit dans l'article. Du point de vue phénotypique, ce sujet était assimilable à un « vrai Bombay » par son absence totale d'expression de l'antigène H, que ce soit par la protéine *FUT1* ou *FUT2*.

Une des premières mutations de *FUT1* à avoir été publiée, **c.826C>T (p.Gln276Ter)**, dont la première description date de 1994 dans une publication de Kelly *et al.*⁽³³⁾, était retrouvée dans notre collection chez deux sujets d'origine turque (3335-UCC. et 20378-GUU.) à l'état homozygote et chez un sujet originaire d'Europe de l'Ouest (992-BOG.) à l'état hétérozygote. Cet allèle de *FUT1* était associé à un allèle fonctionnel de *FUT2* chez nos échantillons d'origine turque (l'haplotype n'avait pas été déterminé dans la publication initiale). Cependant, plusieurs travaux ont depuis décrit cette mutation associée avec un allèle *FUT2* nul par la mutation caucasienne : Storry *et al.* en 2004 (sujet croate reporté dans un poster en 2004 au congrès de l'AABB⁽⁷⁴⁾) et en 2006 (sujet suisse)⁽⁵¹⁾, Nogues *et al.* dans un poster au congrès régional de l'ISBT à Amsterdam en 2013 (sujet colombien)⁽⁷⁵⁾.

L'allèle de *FUT1* portant la mutation faux-sens **c.776T>A (p.Val259Glu)** codant pour une protéine *FUT1* inactive a été décrite en 1997 par Wagner et Flegel chez un sujet caucasien⁽⁴⁹⁾. Nous avons mis en évidence cet allèle à l'état homozygote chez 4959-JAG. qui s'est, par la suite après prise de contact avec les auteurs, révélé être le cas index de l'étude de Monsieur Wagner.

Cet allèle était également présent de façon hétérozygote chez l'échantillon 26016-MEA., originaire de la même zone géographique (Est de la France). Cet allèle n'ayant jamais été mis en évidence dans des études d'exome (tableau 13), il est possible qu'il soit localisé à cette partie de l'Europe (Est de la France, Allemagne). Cet allèle de *FUT1* semble ségréger avec un allèle nul de *FUT2* (mutation des caucasiens) car 4959-JAG. présentait deux allèles nuls de *FUT2*.

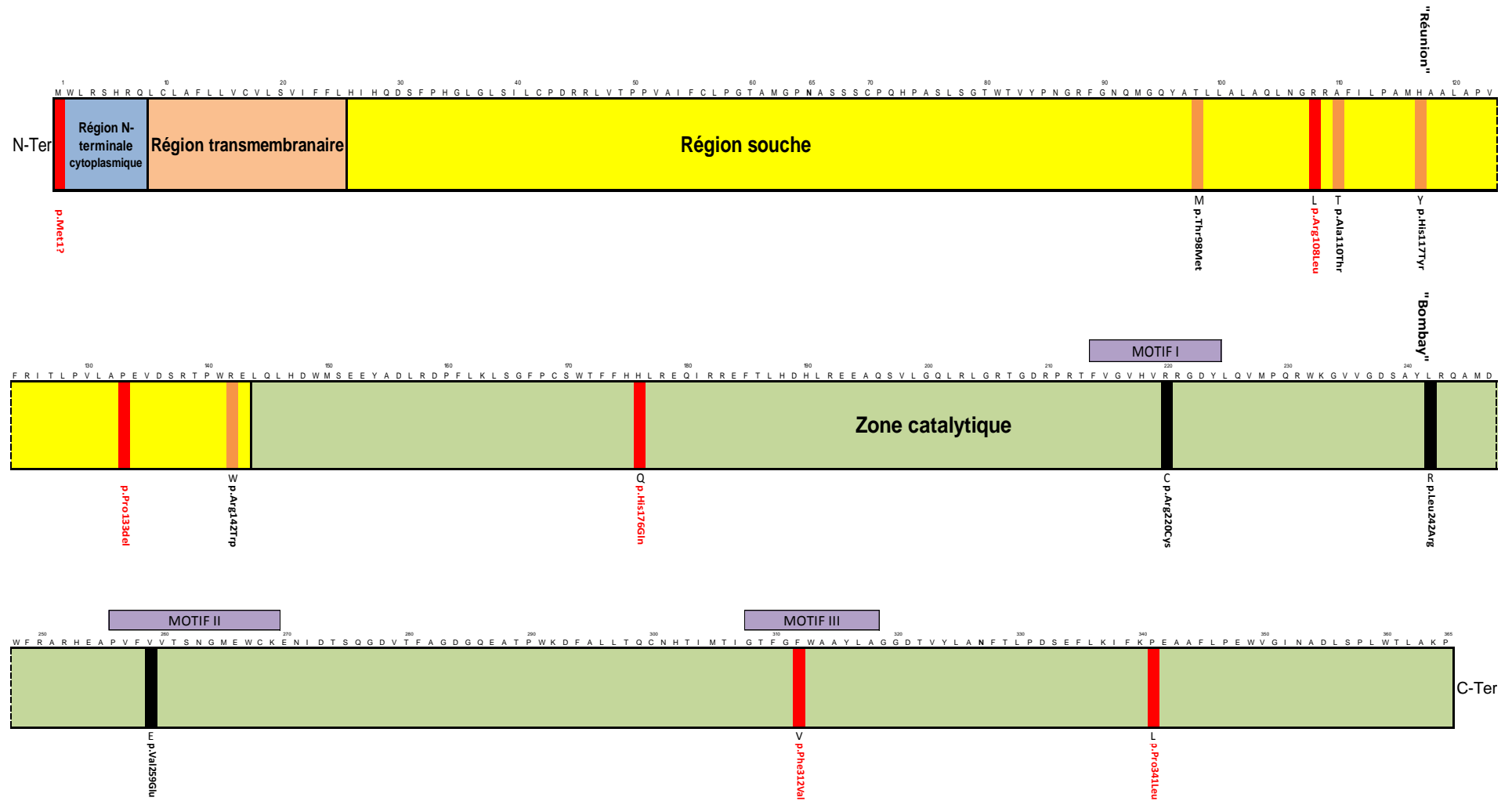


Figure 24 : Positions des mutations faux-sens de l'étude sur une représentation linéaire de la protéine FUT1
 Les mutations non référencées par l'ISBT sont en rouge, les mutations référencées entrainant des phénotypes H:-1 sont en noir et les mutations référencées entrainant des phénotypes H:W1 sont en marron. Les trois motifs ultra-conservés du site catalytique sont indiqués en couleur violet.

Tableau 13 : Référencement et fréquences des mutations de *FUT1* de l'étude

Mutations <i>FUT1</i> détectées dans notre étude	Inclus à l'ISBT	Référencement dans les bases de données génétiques	Étude d'exome ayant détecté la mutation	Fréquences alléliques
p.Met1?	Non	rs200607617	CLINSEQ_SNP	1/709 allèles caucasiens
p.Arg108Leu	Non	Jamais détectée	NA	NA
p.Pro133del	Non	Jamais détectée	NA	NA
p.His176Gln	Non	Jamais détectée	NA	NA
p.Asn263Lysfs	Non	Jamais détectée	NA	NA
p.Leu296Cysfs	Non	Jamais détectée	NA	NA
p.Phe312Val	Non	Jamais détectée	NA	NA
p.Val323Cysfs	Non	Jamais détectée	NA	NA
p.Pro341Leu	Non	rs146216905	1000 Genomes ESP6500	1/5008 allèles (un espagnol) 4/8600 allèles caucasiens, 0/4406 allèle africains
p.Thr98Met	Oui	Jamais détectée	NA	NA
p.Ala110Thr	Oui	rs56342683	1000 Genomes	2/1008 allèles dans le sous-groupe est-asiatique
p.Trp141Ter	Oui	rs749165173	NA	NA
p.Arg142Trp	Oui	rs772921327	NA	NA
p.Glu184Valfs	Oui	rs573412368	1000 Genomes	3/1008 allèles dans le sous-groupe est-asiatique
p.Arg220Cys	Oui	rs574691621	1000 Genomes	5/1008 allèles dans le sous-groupe est-asiatique
p.Trp232Ter	Oui	Jamais détectée	NA	NA
p.Val259Glu	Oui	Jamais détectée	NA	NA
p.Gln276Ter	Oui	rs104894688	NA	NA
p.Phe294Cysfs	Oui	rs777455020	NA	NA
p.His117Tyr	Oui	rs150074056	ESP6500	1/8006 allèles caucasiens 1/4404 allèles africains
p.Leu242Arg	Oui	rs28934588	1000 Genomes	3/978 allèles dans le sous-groupe sud-asiatique

Les neuf premières lignes correspondent aux mutations non référencées par l'ISBT.

NA : non applicable.

ii. Mutations entraînant une protéine *FUT1* partiellement active

La mutation **c.328G>A (p.Ala110Thr)** retrouvée chez 23478-TAN., échantillon d'origine Thaïlandaise, associée à un allèle *FUT2* sauvage, a été précédemment publiée en 2004 par l'équipe de Guo *et al.* qui avait étudié une cohorte de dix sujets « para-Bombay » chinois⁽⁷⁶⁾. L'haplotype et l'origine ethnique de l'échantillon de notre étude était concordant avec cette publication.

Une autre mutation initialement décrite chez un individu asiatique : **c.293C>T (p.Thr98Met)** a été détectée dans un échantillon de notre collection, 971-DOA., à l'état homozygote. Cette mutation a été publiée en 2005 par Yan *et al.* qui étudiaient deux sujets « para-Bombay » chinois⁽⁷⁷⁾. Un de ces individus présentait cette mutation à l'état hétérozygote associée à deux allèles *FUT2* fonctionnels. Notre échantillon 971-DOA. présentait quant à lui deux allèles *FUT2* nuls « caucasiens ».

De façon semblable, la mutation **c.424C>T (p.Arg142Trp)** présentée par Chi *et al.* dans un poster au congrès régional de l'ISBT en 2011 à Taiwan⁽⁷⁸⁾, a été décrite initialement chez un sujet chinois associée à un allèle *FUT2* fonctionnel. Dans notre collection, nous avons retrouvé cette mutation de *FUT1* dans un échantillon d'origine nord-africaine (732-MEF.) à l'état homozygote, associé à un allèle *FUT2* nul (mutation caucasienne).

Au total, ces résultats concernant les mutations atypiques mises en évidence indiquent que les recombinaisons entre les gènes *FUT1* et *FUT2* pourraient être de façon étonnante beaucoup plus fréquentes qu'attendues. Nous avons ainsi mis en évidence, pour des mutations de *FUT1* déjà référencées, cinq haplotypes en discordance avec les haplotypes initialement décrits. Ces discordances haplotypiques sont résumées dans le tableau 14.

Tableau 14 : Haplotypes des mutations mises en évidence dans notre étude par rapport à la littérature

Mutations <i>FUT1</i> détectées dans notre étude	Ethnie du cas rapporté dans la littérature	Allèle <i>FUT2</i> associé dans la littérature	Ethnie du cas rapporté dans l'étude	Allèle <i>FUT2</i> associé dans l'étude
p.Thr98Met	Chine	Fonctionnel	Europe de l'Ouest	Nul
p.Arg142Trp	Chine	Fonctionnel	Afrique du Nord	Nul
p.Arg220Cys	Chine	Fonctionnel	Afrique du Nord	Nul
p.Trp232Ter	Japon	Weak	Europe de l'Ouest	Nul
p.Gln276Ter	Croatie, Suisse, Colombie	Nul	Turquie	Fonctionnel
p.Ala110Thr	Chine	Fonctionnel	Thaïlande	Fonctionnel
p.Trp141Ter	Suisse	Nul	Iran	Nul
p.Glu184Valfs	Chine	Fonctionnel	Chine, Réunion	Fonctionnel
p.Phe294Cysfs	Chine	Fonctionnel	Cambodge, Chine	Fonctionnel

Les cinq premières lignes correspondent aux discordances haplotypiques avec la littérature.

**c) Les mutations de *FUT1* entraînant les phénotypes « Bombay »
et « Réunion »**

i. Haplotype « Bombay »

Tous les haplotypes « Bombay », c'est-à-dire un allèle *FUT1* présentant la mutation c.725T>G (p.Leu242Arg) associé à une délétion du gène *FUT2* ont été retrouvés chez des sujets originaires de la zone Océan Indien (Inde, Sri Lanka, Réunion...). La combinaison de deux haplotypes tels que celui-ci entraîne le phénotype « Bombay » : une absence totale d'antigène H chez le sujet avec le développement d'un allo-anticorps naturel anti-H puissant.

Comme attendu, aucune amplification du gène *FUT2* n'était obtenue lorsque le sujet présentait c.725T>G à l'état homozygote (pas de discordance haplotypique ici).

Chez les six échantillons présentant un seul haplotype « Bombay » associé à un autre haplotype, l'allèle *FUT2* amplifié était donc considéré hémizygotique.

Parmi eux, cinq (2105-LEJ., 3573-MOP., 13007-MAB., 23754-GOM., 25764-CAM.) étaient d'origine réunionnaise et portaient en association l'haplotype « Réunion », dont l'île est connue pour abriter de nombreux ressortissants indiens.

Le sixième échantillon hétérozygote pour l'haplotype « Bombay » était indien, 4679-MAH., cité ci-dessus car porteur d'un allèle *FUT1* inédit : c.396_398del (p.Pro133del) associé à un allèle *FUT2* fonctionnel.

ii. Haplotype « Réunion »

Cet haplotype composé d'un allèle *FUT1* portant la mutation c.349C>T (p.His117Tyr) et d'un allèle *FUT2* nul portant la mutation typique des sujets caucasiens est à l'origine d'une expression affaiblie de l'antigène H.

Nous n'avons retrouvé cet haplotype que dans des échantillons d'origine réunionnaise, à l'exception de 30559-PIR. censé être originaire d'Europe de l'Ouest qui le présentait de façon homozygote. Ce résultat a été confirmé en repartant d'une autre paillette congelée de cet échantillon. Il s'agissait vraisemblablement d'une erreur de renseignement sur l'origine du sujet.

Enfin, aucun polymorphisme de type mutation silencieuse dans la partie codante de *FUT1* n'a été mis en évidence dans cette collection, confirmant le caractère peu polymorphe de ce gène.

III. Analyses sérologiques

A. Données sérologiques rétrospectives

1. Phénotypes ABO

L'analyse rétrospective des dossiers immuno-hématologiques des sujets inclus a permis d'attribuer un phénotype ABO à tous les échantillons. La fixation-élution d'anticorps anti-A et anti-B avait été réalisée lorsque l'expression de ces antigènes A et B était faible ou lorsque le sujet apparaissait O. Il n'est cependant pas à exclure que certains échantillons exprimant une quantité minimale d'antigène H et donc des antigènes A et/ou B d'expression très faible aient pu être considérés de phénotype O. C'était le cas par exemple du sujet 22612-PEM, dont les fixations-élutions étaient négatives mais dont le génotypage *ABO* effectué au CNRHP prédisait un phénotype AB. Cet échantillon était sécréteur : une quantité certes très faible d'antigènes A et B devait être de ce fait exprimée et n'avait pas été détectée même par fixation-élution. Un génotypage *ABO* pour tous les échantillons de la collection aurait été d'intérêt mais n'était malheureusement pas possible pour des raisons logistiques et économiques, cette analyse n'étant pas réalisée pour le moment au CNRGS.

Certains phénotypes ABO pouvaient aussi être issus de données d'articles d'études sérologiques publiés dans les années 1960 à 1980 dont certains sujets de cette cohorte étaient les cas index^{(54),(64),(79)}. Il s'agissait notamment de l'étude de l'activité des glycosyltransférases A et B sériques.

Les phénotypes ABO des sujets sont présentés dans l'annexe 6. Il s'agit d'un tableau qui tient compte des données du séquençage de *FUT1*. Les phénotypes H prédits ont donc été mis à jour par rapport à l'annexe 4. Les sujets H:-1 n'y figurent pas, apparaissant par définition obligatoirement O.

2. Recherche d'agglutinines irrégulières

Les données de RAI des sujets étaient issues des dossiers immuno-hématologiques archivés. Ces données n'avaient qu'une valeur indicative car les RAI avaient été réalisées sur une période allant des années 1960 à 2014, ce qui entraînait de nombreux biais. L'analyse rétrospective de ces dossiers comportant exclusivement de la sérologie était rendue difficile par la dispersion dans le temps au niveau inter-échantillons et intra-échantillon.

La réactivité des allo-anticorps anti-H (anti-H1) et anti-HI (anti-H1I1 en nomenclature internationale, dirigé contre l'antigène composé HI) des sujets semblait extrêmement labile pour des raisons physiologiques : fluctuation dans le temps du titre des anticorps, et pour des raisons techniques : variabilité dans le temps des opérateurs, des méthodes et des réactifs, ainsi que des hématies-tests rares utilisées. L'utilisation de plasma ou de sérum semblait également intervenir dans la détection ou non d'un anticorps lorsqu'il était peu puissant. L'existence de transfusions ou grossesses préalables n'était également pas toujours connue.

Nous avons effectué un classement sommaire des anticorps rencontrés en anti-H et anti-HI, présenté en annexe 7. Morgan et Watkins⁽⁸⁰⁾ avaient distingué les anticorps anti-H des anticorps anti-HI en posant les bases de certaines caractéristiques de ces anticorps. Les anticorps anti-H sont inhibés par de la salive de sujets sécréteurs alors que les anticorps anti-HI ne le sont pas. La salive n'ayant été que rarement utilisée au moment de la réalisation des RAI, cette analyse salivaire n'était pas accessible et la classification de l'anticorps à partir des archives en anti-H ou anti-HI difficile. Globalement, l'anticorps était classé en anti-HI lorsqu'il n'avait pas réagi avec les sujets de phénotype exceptionnel H:1; I:-1.

L'anticorps anti-HI était également censé ne pas réagir avec les hématies O de cordon, ces dernières étant dépourvues d'antigène I. Cependant l'interprétation des réactions avec les hématies O de cordon était délicate du fait de leur expression affaiblie en antigène H. La contamination par du sang maternel (I:1 et H:1) pouvait également expliquer les nombreuses discordances observées dans les dossiers. Leur phénotype étendu et élargi (notamment Lewis) n'était pas non plus connu.

La faiblesse des réactions parfois rencontrée était un frein supplémentaire à la classification des anticorps en anti-H ou anti-HI.

Malgré toutes ces limitations méthodologiques du fait de l'analyse de dossiers rétrospectifs s'étendant sur une longue période temporelle, plusieurs caractéristiques semblaient ressortir du « bruit de fond » :

L'anticorps anti-H des sujets de phénotype « Bombay » était puissant et capable en TIA d'agglutiner les hématies H:W1. Les hématies de phénotype « Réunion » étaient agglutinables de façon assez intense par cet anticorps. Au contraire, l'anti-H des sujets « Réunion » n'était pas capable d'agglutiner les autres

hématies H:W1, qu'elles soient de phénotype « Réunion » ou pas. Ces observations vont dans le sens de Le Pendu *et al.* qui en 1986 décrivaient une spécificité anti-H de type 2 beaucoup plus importante pour l'anticorps des sujets « Bombay » par rapport à l'anti-H des sujets « Réunion »⁽⁵⁵⁾. Il a été également montré que l'anti-H des sujets « Bombay » était de plus haut titre que celui des sujets « Réunion »⁽⁵⁴⁾. Un anti-LE2 était ici fréquemment associé à l'anti-H des sujets de phénotype « Bombay ».

L'anti-H produit par les six sujets H:-1 d'origine non indienne et non porteurs de l'haplotype « Bombay » semblait dans cette cohorte rétrospective bien moins puissant que celui des sujets H:-1 « Bombay » indiens. Lorsque leur plasma avait été testé en TIA avec des hématies de phénotype « Réunion », ces dernières n'étaient pas agglutinées contrairement à lorsqu'elles étaient testées avec du plasma de « vrai Bombay ». Cette apparente différence de puissance entre anti-H de sujets H:-1 porteurs de l'haplotype « Bombay » et sujets H:-1 porteurs de mutations sporadiques n'a à notre connaissance jamais été rapportée. Il est possible qu'il s'agisse d'une coïncidence du fait de l'effectif faible de ces sujets H:-1 à mutations sporadiques. Il est également envisageable que les sujets de phénotype « Bombay », étant d'origine indienne, présentent un système immunitaire avec des caractéristiques particulières ou alors aient été mis en contact avec des antigènes environnementaux ayant contribué à la production de leur anticorps anti-H particulièrement puissant.

Les sujets de phénotype « Réunion » présentaient un anti-H plutôt qu'un anti-HI, plus souvent de nature IgM, dont la puissance semblait hétérogène, contrairement à ce qui peut être décrit dans la littérature⁽⁵⁴⁾. Certaines RAI étaient même négatives, alors que d'autres montraient des pan-agglutinations à 3+. Les données étant rétrospectives, l'hétérogénéité des réactions pourrait être expliquée par des antécédents inconnus de grossesse et de transfusion, ou des prises médicamenteuses et/ou états pathologiques diminuant la réponse immunitaire au moment où les prélèvements pour ces RAI avaient été effectués.

En accord avec ce qui est admis, les sujets H-déficients de statut sécréteur (également appelés de façon approximative « para-Bombay ») semblaient produire des anticorps de type anti-HI très faibles, réagissant surtout à basse température et sur hématies traitées par les enzymes.

B. Caractéristiques des réactifs anti-H

1. Titrages des anti-H issus de sujets H:-1 « Bombay »

Les titres et scores d'agglutination des plasmas issus de dons de cinq sujets H:-1 sont détaillés dans le tableau 15. La technique utilisée était le TIA microfiltration et le titrage était effectué sur pool d'hématies O; LE:1,-2. Les cinq sujets dont étaient issus ces plasmas étaient également inclus dans la cohorte séquencée pour *FUT1* et présentaient la mutation c.725T>G des sujets « Bombay » à l'état homozygote. Les plasmas sélectionnés ensuite pour l'étude ont été : 2479-LAM., 3184-SEL. et 2387-RAS du fait de leur titre élevé et de la quantité de plasma disponible.

Tableau 15 : Titrage des anti-H issus de sujets de phénotype H:-1 « Bombay »

Plasmas	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	T. auto	TITRE	SCORE
2479-LAM.	4+	4+	3+ ^s	3+	3+	3+	3+	2+ ^s	2+	2+	1+ ^s	1+	-	≥ 2048	≥ 111
3184-SEM.	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	2+ ^s	2+	2+	-	≥ 2048	≥ 125
2387-RAS.	4+	3+ ^s	3+ ^s	3+	3+	3+	2+ ^s	2+	1+	(+)	-	-	-	256	88
755-ANM.	4+	4+	3+ ^s	3+	3+	3+	2+ ^s	2+	1+	-	-	-	-	256	87
4281-SOK.	4+	3+ ^s	3+	2+ ^s	2+ ^s	2+	1+	-	-	-	-	-	-	64	64

T. auto : témoin autologue. Pour le calcul du score : 4+ = 12 ; 3+ = 10 ; 2+ = 8 ; 1+ = 5 ; (+) = 2 ; les réactions cotées « *strong* » comptaient pour un point en plus. Les trois premières lignes correspondent aux anti-H utilisés pour l'étude des hématies H-déficientes.

2. Fixations-éluions

Les fixations-éluions sur hématies O; LE:1,-2 de l'anti-H des sujets 2479-LAM., 3184-SEL. et 2387-RAS ne furent pas contributives. Seul un anti-H de faible titre (2 à 8) était élué, donnant des réactions négatives au pur en TIA avec des hématies H:W1 de type « Réunion » et ne présentait donc plus d'intérêt pour l'étude.

Nous n'avons ainsi pas réussi à obtenir d'anti-H déplété en anti-A et en anti-B.

3. Réactifs anti-H1 monoclonaux

Les réactifs anti-H1 monoclonaux utilisés n'étaient pas adaptés à l'étude. Les réactions sur hématies natives et papainées étaient négatives pour toutes les hématies H-déficientes testées, y compris des sujets O de phénotype « Réunion ». Ces réactifs ne permettaient donc pas de discriminer les sujets selon leur expression de l'antigène H et ne présentaient pas d'intérêt dans l'étude. Le rôle de ces réactifs monoclonaux semble limité à différencier les sujets de phénotype A₁ et A₂.

C. Étude phénotypique de l'antigène H des échantillons

L'étude sérologique, correspondant à l'objectif secondaire de ce travail, a été réalisée dans la limite et dans l'économie des ressources précieuses disponibles dans la biothèque du CNRGS. Ces ressources biologiques rares étaient les plasmas issus de sujets « Bombay » et les hématies de phénotype exceptionnel H:-1 et H:W1. C'est la raison pour laquelle toutes les réactions entre anticorps anti-H et hématies H:W1 n'ont pas été réalisées.

Globalement, les hématies testées avec les plasmas issus de sujets de phénotype « Bombay » pouvaient se diviser en trois catégories :

- Les hématies réellement H:-1 pour lesquelles aucune agglutination ne pouvait être observée. Il s'agissait donc des sujets dont les enzymes FUT1 et FUT2 étaient inactives, correspondant majoritairement au phénotype « Bombay » indien, c'est-à-dire présentant la mutation c.725T>G de *FUT1* à l'état homozygote, associée à la délétion de *FUT2*. D'autres échantillons présentaient également une absence d'expression de l'antigène H. Il s'agissait des exceptionnels sujets porteurs de deux allèles nuls de *FUT1* et de statut non sécréteur sans haplotype indien « Bombay ».
- Les hématies de groupe O; H:W1. Un échantillon était prédit H:W1 avant étude sérologique à partir du moment où il présentait au moins une des caractéristiques suivantes :
 - un allèle *FUT1* avec une mutation faux-sens mais décrit comme partiellement fonctionnel dans la littérature ;
 - un allèle *FUT1* de fonctionnalité inconnue mais un antécédent d'agglutination démontré dans le dossier rétrospectif (agglutination directe ou fixation-élution positive avec anti-H) ;
 - un allèle *FUT2* fonctionnel (statut sécréteur démontré).
- Les hématies H:W1 de groupe A, B ou AB. Tout échantillon ayant présenté une agglutination avec un anticorps anti-A ou anti-B (directe ou après fixation-élution) rétrospectivement dans les dossiers immuno-hématologiques était considéré *de facto* comme H:W1. Notre tentative de production d'un réactif anti-H « tout groupe » ayant échoué, les résultats des réactions entre les plasmas utilisés et les hématies rares A, B ou AB; H:W1 étaient difficiles à interpréter. Les agglutinations constatées

pouvaient provenir de l'anti-H puissant agglutinant l'antigène H de ces hématies, ou par exemple d'un anti-A puissant réagissant avec le phénotype ABO:W1,-2,W3 entraîné par la faible expression de H. La conversion de la faible quantité d'antigène H par les enzymes A et B en antigènes A et B compliquait d'autant plus l'interprétation de ces réactions.

Les résultats de ces tests sérologiques à l'aide de plasmas issus de sujets de phénotype « Bombay » sont présentés dans l'annexe 8.

Trois types d'hématies H:-1 (avec des mutations *FUT1* différentes de l'haplotype « Bombay ») ont été utilisés : ces hématies servaient de témoins négatifs, et cela permettait dans le même temps de confirmer le caractère H-déficient total de ces échantillons.

Les hématies H-déficientes O exprimant le plus d'antigène H étaient celles de l'échantillon de phénotype « Réunion », présentant une agglutination avec les trois plasmas utilisés jusqu'à une dilution plus importante que les autres hématies H:W1 (jusqu'au titre 32 à 512 sur hématies natives en fonction du plasma utilisé).

Un effet-dose était observé avec l'échantillon qui ne possédait qu'un haplotype « Réunion » (associé à un haplotype nul « Bombay »), pour lequel les titres et scores d'agglutination étaient plus faibles qu'avec l'échantillon ci-dessus présentant l'haplotype « Réunion » en double dose.

L'échantillon 983-SCT. exprimait une quantité d'antigène H non négligeable, ce qui confirmait les données de l'article de Rodier *et al.* en 1974 dont cet échantillon était le propositus⁽⁶³⁾. Nous avons mis en évidence une mutation homozygote de *FUT1* touchant le codon d'initiation de la protéine (c.1A>C ; p.Met1?) chez ce sujet non sécréteur. Cette mutation c.1A>C était retrouvée à l'état hétérozygote chez 957-JUP., de statut non sécréteur, associée à un allèle nul de *FUT1*. Cela permettait encore une fois de mettre en évidence un effet-dose : la présence d'une agglutination était toujours observée chez 957-JUP. mais plus faible qu'avec 983-SCT.

Chez les trois autres échantillons H-déficients, O, mais de statut sécréteur étudiés, les intensités d'agglutination étaient faibles sur hématies natives mais fortement rehaussées par la papaïne, ce qui était concordant avec nos données de phénotypes ABO qui montraient un fort rehaussement des antigènes adsorbés par la papaïne chez les échantillons H-déficients sécréteurs.

Pour les échantillons exprimant des antigènes A et B, les réactions étaient quasiment toutes négatives sur hématies natives. Il était difficile d'interpréter ces données pour en déduire la fonctionnalité de l'enzyme H puisque les enzymes A et/ou B de ces échantillons utilisaient le peu d'antigène H présent comme substrat. Néanmoins les plasmas utilisés contenant également des anti-A et anti-B, ces réactions négatives signifiaient dans tous les cas des enzymes H de fonctionnalité réduite. Les réactions positives pouvaient quant à elles être dues à l'action des anti-H ou à celle des anti-A et anti-B contenus dans ces plasmas.

Les réactions entre plasmas et hématies H-déficientes non-O étaient donc difficilement interprétables, hormis pour 954-JOE. et 982-TUB. : la négativité de la quasi-totalité des réactions allait dans le sens d'une enzyme FUT1 peu fonctionnelle. Cela était attendu, ces sujets présentant la mutation inédite p.Phe312Val localisée dans un motif conservé du site catalytique de la protéine (cf. figure 24).

D. Étude phénotypique des antigènes A et B des échantillons

Dix échantillons H-déficients de groupe A, B ou AB ont été testés avec les cartes ABO en microfiltration afin d'étudier le niveau d'expression des antigènes ABO en fonction des différentes combinaisons haplotypiques *FUT1* / *FUT2* conduisant au phénotype H:W1. Ces échantillons testés comprenaient :

- un échantillon de phénotype « Réunion » de groupe A ;
- les deux échantillons non sécréteurs présentant la mutation inédite *FUT1*:c.934T>G (p.Phe312Val) altérant fortement la fonction de l'enzyme ;
- cinq échantillons ne comportant que des allèles *FUT1* nuls mais de statut sécréteur, donc exprimant des antigènes ABO adsorbés depuis le plasma ;
- deux échantillons sécréteurs avec un seul allèle *FUT1* partiellement actif.

Les résultats pour ces échantillons sont résumés dans le tableau 16 et les cartes de microfiltration exposées en annexe 9. Tous les puits contrôles étaient négatifs.

Les échantillons censés être de groupe O et présentant une mutation inédite ont été également testés, la sensibilisation par la papaïne s'étant révélée extrêmement efficace pour la détection d'une faible expression d'antigène A. Cependant aucun de ces sujets n'avait révélé d'expression d'antigène du système ABO (données non présentées). Comme attendu, aucun sujet de phénotype prédit H:-1 n'avait présenté la moindre expression d'antigène du système ABO.

Tableau 16 : Résultats de l'étude sérologique des antigènes ABO de certains échantillons non O

Échantillons	Phénotype ABO	Phénotype Lewis	Séquence <i>FUT1</i>	Enzyme <i>FUT1</i> (H)		Statut sécréteur	Phénotype H prédit après séquençage	Carte ABO "monoclonal" Hématies natives			Carte ABO "monoclonal" Hématies papainées			Carte ABO "human" Hématies en ID-Diluent1		
				Version allèle 1	Version allèle 2			ABO1	ABO2	ABO3	ABO1	ABO2	ABO3	ABO1	ABO2	ABO3
				Sujet "Réunion" de groupe A	A			LE:1,-2	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Partiellement active		Non sécréteur	H:W1	3+	-	4+
954-JOE.	AB	LE:1,-2	p.[Phe312Val];[(Phe312Val)]	Mutation faux-sens de signification inconnue		Non sécréteur	H:W1	-	-	2+	-	-	3+	-	-	2+
982-TUB.	B	LE:1,-2	p.[Phe312Val];[(Phe312Val)]	Mutation faux-sens de signification inconnue		Non sécréteur	H:W1	-	-	-	-	1+	-	-	-	1+ ^s
992-BOG.	A	LE:-1,2	p.[Trp232Ter];[Gln276Ter]	Inactive		Sécréteur (hétérozygote)	H:W1	-	-	-	2+	-	3+	1+ ^s	-	3+
1451-TAT.	A	LE:-1,2	p.[Phe294Cysfs];[(Phe294Cysfs)]	Inactive		Sécréteur (homozygote)	H:W1	-°	-	(+)	3+	-	3+ ^s	2+ ^s	-	3+
3335-UCC.	B	LE:-1,2	p.[Gln276Ter];[(Gln276Ter)]	Inactive		Sécréteur (homozygote)	H:W1	-	-	-	-	1+	-	-	-	3+
20378-GUU †	A	LE:-1,2	p.[Gln276Ter];[(Gln276Ter)]	Inactive		Sécréteur (homozygote)	H:W1	-°	-	(+)	3+	-°	3+ ^s	2+ ^s	-	3+ ^s
22612-PEM.	AB	LE:-1,2	p.[Glu184Valfs];[Phe294Cysfs]	Inactive		Sécréteur (homozygote)	H:W1	-°	-	(+)	3+	-°	3+ ^s	2+ ^s	-	3+ ^s
23478-TAN.	A	LE:-1,-2	p.[Ala110Thr];[Arg220Cys]	Décrite comme partiellement active	Inactive	Sécréteur (homozygote)	H:W1	(+)	-	3+	3+	-	4+	2+ ^s	-	3+ ^s
12704-ZAM.	A	LE:-1,2	p.[His117Tyr];[Glu184Valfs]	Partiellement active	Inactive	Sécréteur (hétérozygote)	H:W1	-	-	3+	(+)	-	3+ ^s	-	-	3+

† : le sujet 20378-GUU. présentait une réaction de très faible intensité inattendue dans le puits anti-ABO2 monoclonal sur hématies papainées. Une demande de génotypage ABO a été effectuée et est en cours au moment de la rédaction de ce manuscrit. NT : non testé.

Les conclusions pouvant être tirées de ces échantillons étudiés étaient :

- L'antigène A exprimé par l'échantillon de phénotype « Réunion » présentait une agglutination d'intensité élevée, à 3+ sur hématies natives. Cette agglutination intense chez un sujet de phénotype « Réunion » était cohérente avec la quantité relativement importante d'antigène H exprimée que nous avons mise en évidence chez ces sujets. Des échantillons de groupe B seraient intéressants à tester.
- Chez les échantillons présentant une enzyme FUT1 inactive et de phénotype sécréteur (au moins un allèle *FUT2* fonctionnel), les puits anti-ABO1 et anti-ABO3 étaient à peine positifs sur hématies natives. Le fait de traiter les hématies par les enzymes (papaïne, ou broméline contenue dans l'ID-Diluent 1) augmentait de façon importante l'expression des antigènes ABO1 et ABO3. Cette combinaison haplotypique *FUT1*_{nu1} / *FUT2* fonctionnel chez un sujet génétiquement de groupe A est à rapprocher d'une situation courante : les patients A greffés de cellules souches hématopoïétiques O. Après greffe ces patients n'expriment plus de façon constitutionnelle l'antigène A sur leurs hématies. Ils continuent par contre (s'ils sont sécréteurs) d'adsorber de façon passive l'antigène A depuis le plasma entraînant des réactions positives en groupage. Les réactions des hématies natives et papaïnées de ces patients et de nos sujets *FUT1*_{nu1} / *FUT2* fonctionnel de groupe A sur gels ABO sont identiques (figure 25).

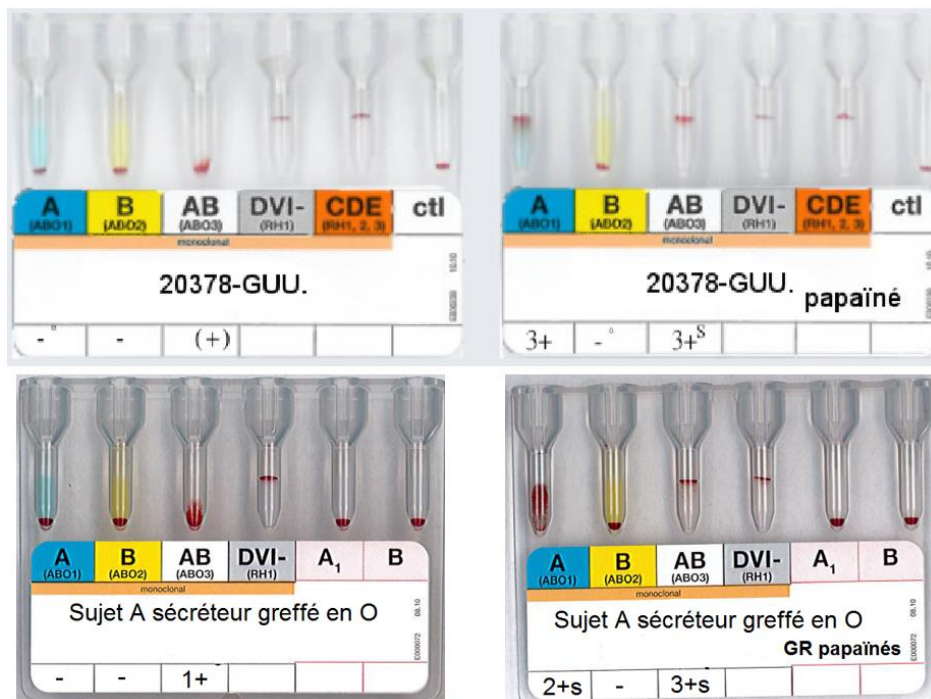


Figure 25 : Comparaison d'un sujet *FUT1*_{nu1} sécréteur de A et d'un greffé A en O

L'antigène B de l'échantillon 3335-UCC. était détecté sur hématies papainées ce qui était corrélé avec les données du génotypage *ABO*. À noter que ce sujet avait fait l'objet d'une étude sérologique dans un article de Le Pendu *et al.* en 1983 qui avaient mis en évidence une expression d'antigène B uniquement par fixation-élution⁽²⁷⁾ et une activité α -2-L-fucosyltransférase dans le sérum estimée chez ce sujet à 1970 cpm (*counts per minute*) par rapport à 30 000 cpm chez un sujet H:1 normal. L'étude des antigènes *ABO* en cassette gel microfiltration, technique adaptée sur hématies papainées, semblait aussi sensible que la fixation-élution pour détecter les antigènes *ABO* adsorbés depuis le plasma.

- Chez les échantillons de groupe A ou AB et présentant une enzyme *FUT1* faiblement fonctionnelle (954-JOE., 23478-TAN. et 12704-ZAM.) le puits anti-*ABO1* était négatif sur hématies natives alors que le puits anti-*ABO3* était déjà positif avec une agglutination relativement intense (3+), contrairement aux hématies qui avaient adsorbé ces antigènes depuis le plasma.
- L'antigène B des sujets H-déficients n'était détecté que sur hématies papainées, avec les cartes à anticorps monoclonaux. Cette détection était faible (agglutinations « -° » de type soulèvement de culot jusque 1+ sur ces échantillons). Cette donnée serait à confirmer sur un plus grand nombre d'échantillons H-déficients, notamment des sujets B de phénotype « Réunion » et d'autres sujets *FUT1* nuls mais sécréteurs.

L'échantillon 22612-PEM. avait par exemple un phénotype AB prédit par génotypage *ABO*. Aucune expression d'antigène B n'avait pu ici être mise en évidence à part un soulèvement de culot sur hématies papainées dans le puits anti-*ABO2* monoclonal. De ce fait, l'échantillon 20378-GUU. non génotypé pour *ABO* et présentant également un soulèvement de culot dans les mêmes conditions pourrait tout à fait être en réalité AB et non pas B. Un génotypage *ABO* a été demandé au CNRHP pour ce sujet et est en cours au moment de la rédaction de ce manuscrit.

- L'échantillon 12704-ZAM. était particulier à deux niveaux. Une faible expression de H était retrouvée du fait d'un seul haplotype « Réunion » associé à un allèle *FUT1* nul et à un allèle *FUT2* fonctionnel. Bien que les échantillons de phénotype « Réunion » expriment une quantité relativement importante de l'antigène H, le

fait chez ce sujet de n'exprimer qu'une « demi-dose » de l'haplotype « Réunion » semblait suffire à négativer le puits anti-ABO1 sur hématies natives (qui était 3+ pour l'échantillon avec deux haplotypes « Réunion »). De plus, cet échantillon qui était sécréteur grâce à un allèle *FUT2* fonctionnel ne présentait pas de rehaussement de l'antigène A sur hématies traitées aux enzymes, contrairement aux cinq autres échantillons A sécréteurs testés ici. Cette discordance est restée inexplicée et nécessiterait de plus amples investigations, notamment sur d'autres échantillons présentant cette combinaison : haplotype « Réunion » / haplotype *FUT1*_{nul} – *FUT2* fonctionnel.

Il est également possible que les faibles réactivités du puits anti-ABO1 sur hématies natives et papainées pour cet échantillon soit dues à une enzyme A moins efficace que chez les autres échantillons H-déficients, éventuellement la version A₂ de l'enzyme A.

Au final, selon le résultat des investigations (génotypage *FUT1* plus ou moins *FUT2* et étude phénotypique ABO sur hématies natives et papainées), un génotypage ABO pourrait être recommandé chez tous les sujets prédits H:W1, notamment pour confirmer ou infirmer le phénotype B qui semble délicat à mettre en évidence dans ce contexte. La question du risque transfusionnel de considérer un donneur rare H:W1; ABO:-2 au lieu de H:W1; ABO:W2 reste entière.

IV. Applications de l'étude

A. Mise à jour du phénotype H des sujets étudiés dans le registre national

Sur les 70 sujets, 37 ont bénéficié d'une mise à jour de leur phénotype H dans le registre national (53%). Trente-deux modifications allaient dans le sens H:-1 vers H:W1 (tableau 17) ce qui était logique puisque le diagnostic avait pu à une époque être réalisé avec des réactifs manquant de sensibilité. Le mode de saisie dans le registre des sujets H-déficients était également différent il y a plusieurs dizaines d'années quand les sujets H:W1 pouvaient être rentrés H:-1. Cinq modifications ont par contre ramené des sujets à un phénotype normal H:1 (avec prise en compte de la revue rétrospective des dossiers immuno-hématologiques).

Tableau 17 : Mise à jour dans le registre national du phénotype H des sujets étudiés

Identifiant	Phénotype H initial	Phénotype H prédit après séquence	Identifiant	Phénotype H initial	Phénotype H prédit après séquence
755 ANM.	H:-1	H:-1	6832 LEE.	H:-1	H:W1
921 HOM.	H:-1	H:W1	12304 DUM.	H:-1	H:W1
938 BEB.	H:-1	H:-1	12704 ZAM.	H:-1	H:W1
952 MUY.	H:-1	H:W1	13007 MAB.	H:-1	H:W1
957 JUP.	H:-1	H:W1	13709 ANR.	H:-1	H:-1
982 TUB.	H:-1	H:W1	21338 FIS.	H:-1	H:-1
983 SCT.	H:-1	H:W1	22612 PEM.	H:-1	H:W1
992 BOG.	H:-1	H:W1	23008 PAR.	H:-1	H:-1
1016 PAP.	H:-1	H:W1	23443 SAT.	H:-1	H:-1
1330 SEM.	H:-1	H:W1	23473 DIH.	H:-1	H:-1
1332 VAB.	H:-1	H:-1	24370 BOM.	H:-1	H:W1
1355 BEF.	H:-1	H:W1	26016 MEA.	H:-1	H:W1
1445 KAE.	H:-1	H:1	29267 DED.	H:-1	H:W1
1451 TAT.	H:-1	H:W1	29293 GAK.	H:-1	H:-1
1502 SUJ.	H:-1	H:-1	30389 SIV.	H:-1	H:-1
1509 THJ.	H:-1	H:W1	30559 PIR.	H:-1	H:W1
1611 SEJ.	H:-1	H:W1	31847 NEK.	H:-1	H:-1
1947 CHM.	H:-1	H:W1	732 MEF.	H:W1	H:W1
2105 LEJ.	H:-1	H:W1	954 JOE.	H:W1	H:W1
2387 RAS.	H:-1	H:-1	971 DOA.	H:W1	H:W1
2479 LAM.	H:-1	H:-1	976 LER.	H:W1	H:1
2683 CHM.	H:-1	H:W1	1006 MAJ.	H:W1	H:W1
2714 FIM.	H:-1	H:W1	1446 AZB.	H:W1	H:1
2758 COX.	H:-1	H:-1	2136 BOD.	H:W1	H:1
2807 RIP.	H:-1	H:W1	2234 DAR.	H:W1	H:1
2891 BAA.	H:-1	H:-1	2894 LEG.	H:W1	H:W1
3335 UCC.	H:-1	H:W1	13827 CAS.	H:W1	H:W1
3374 TEL.	H:-1	H:W1	20378 GUU.	H:W1	H:W1
3375 DIJ.	H:-1	H:W1	21572 GUM.	H:W1	H:W1
3573 MOP.	H:-1	H:W1	22663 HOM.	H:W1	H:W1
4281 SOK.	H:-1	H:-1	23478 TAN.	H:W1	H:W1
4679 MAH.	H:-1	H:W1	23754 GOM.	H:W1	H:W1
4959 JAG.	H:-1	H:-1	25764 CAM.	H:W1	H:W1
5367 DID.	H:-1	H:W1	28375 CLP.	H:W1	H:W1
6077 ZEM.	H:-1	H:-1	31389 RIC.	H:W1	H:W1

Les lignes grisées correspondent aux phénotypes H modifiés après l'étude.

B. Mise à jour du phénotype des CGR H-déficients congelés à la Banque Nationale de Sang de Phénotype Rare

Parmi les sujets inclus dans la cohorte, 22 étaient des donneurs actifs (au moins un CGR congelé à la BNSPR) considérés de phénotype H:-1 totalisant 88 CGR congelés. Après reprise des dossiers immuno-hématologiques archivés du CNRGS et séquençage de *FUT1*, les phénotypes ABO et H de certains de ces donneurs ont été modifiés au niveau des fichiers de la BNSPR (tableau 18). Sur les 88 CGR congelés considérés H:-1, 61 ont été reclassés H:W1 et 27 confirmés H:-1.

Tableau 18 : Mise à jour du phénotype des CGR H-déficients congelés à la BNSPR

Identifiant	Phénotype ABO BNSPR avant étude	Phénotype ABO BNSPR après étude	Phénotype H BNSPR avant étude	Phénotype H BNSPR après étude	Nombre de CGR congelés (fin 2014)
690 HOJ.	O _h	O _h	H:-1	H:W1	7
732 MEF.	O _h	O _h	H:-1	H:W1	2
755 ANM.	O _h	O _h	H:-1	H:-1	4
957 JUP.	O _h	O _h	H:-1	H:W1	9
982 TUB.	O _h	B _h	H:-1	H:W1	3
1332 VAB.	O _h	O _h	H:-1	H:-1	12
1611 SEJ.	B _h	B _h	H:-1	H:W1	10
2479 LAM.	O _h	O _h	H:-1	H:-1	3
4958 UCR.	O _h	AB _h	H:-1	H:W1	6
3335 UCC.	O _h	B _h	H:-1	H:W1	3
4957 UCE.	O _h	B _h	H:-1	H:W1	1
1355 BEF.	O _h	A _h	H:-1	H:W1	7
2807 RIP.	O _h	O _h	H:-1	H:W1	1
4281 SOK.	O _h	O _h	H:-1	H:-1	1
4679 MAH.	O _h	O _h	H:-1	H:W1	3
5367 DID.	B _h	B _h	H:-1	H:W1	1
992 BOG.	A _h	A _h	H:-1	H:W1	3
6832 LEE.	A _h	A _h	H:-1	H:W1	2
23008 PAR.	O _h	O _h	H:-1	H:-1	4
23443 SAT.	O _h	O _h	H:-1	H:-1	2
22612 PEM.	O _h	AB _h	H:-1	H:W1	3
30389 SIV.	O _h	O _h	H:-1	H:-1	1
TOTAL					88 (dont 27 H:-1)

Les lignes grisées correspondent aux donneurs actifs dont le phénotype a été modifié suite à l'étude.

Le « h » en indice des phénotypes ABO symbolise un phénotype H-déficient sous-jacent.

C. Optimisation du diagnostic sérologique des sujets de phénotype H-déficient au CNRGS

Le génotypage *FUT1* des sujets référencés dans le registre national avait également pour intérêt de permettre de choisir les réactifs d'origine humaine les plus adaptés pour l'exploration des échantillons H-déficients qui seront référés au CNRGS dans le futur. Ces réactifs étaient des plasmas de spécificité anti-H et des hématies de phénotype rare H:-1 ou H:W1.

1. Phénotypage

Une prédiction du phénotype H pourra donc désormais être effectuée par biologie moléculaire pour les nouveaux sujets référés au CNRGS. Le génotypage pourra mettre en évidence des allèles déjà décrits et connus pour provoquer des phénotypes H:-1 ou H:W1, mais également des mutations de signification inconnue. L'exploration sérologique restera complémentaire et plus ou moins indispensable en fonction de la mutation mise en évidence.

L'étude du phénotype H pourra reposer sur l'utilisation d'au moins deux plasmas contenant un anti-H de haut titre issus de sujets de phénotype « Bombay » (*FUT1:c.725T>G*) comme 3184-SEM. et 2479-LAM. Le phénotypage par technique TIA sur support gel microfiltration anti-IgG s'était révélé sensible. Si le résultat est négatif, la réaction pourra être encore sensibilisée avec le traitement par la papaïne des hématies du sujet à tester. Un témoin négatif H:-1 comme 1332-VAB. (plus de 1000 paillettes congelées) est à utiliser ainsi qu'un témoin H:W1 de groupe O. Le témoin H:W1 sera dans l'idéal issu d'un échantillon dont l'expression de H n'est pas trop élevée pour vérifier la sensibilité du réactif, comme 4679-MAH. ou 957-JUP. (ne pas utiliser une hématie de phénotype « Réunion » qui exprime une quantité de H relativement grande).

L'étude du phénotype ABO sera possible sur support gel microfiltration commercial à anticorps monoclonaux. La réaction sera à réaliser en technique fournisseur sur hématies natives et en technique adaptée sur hématies papaïnées ayant montré ici une grande sensibilité. Si le sujet à tester est de phénotype H:W1 et si un doute est présent sur l'expression d'antigène B, un génotypage *ABO* sera à discuter.

Le phénotypage Lewis est également à réaliser, étant le reflet de la fonctionnalité de l'enzyme FUT2 et donc de l'adsorption de substance H par les hématies depuis le plasma. En cas de phénotype LE:-1,-2 non informatif un génotypage *FUT2* pourra être discuté.

2. RAI

Pour affirmer la spécificité anti-H de l'anticorps du sujet, trois hématies H:-1 sont attendues négatives. L'assurance de choisir trois hématies réellement H:-1 est renforcée par ce travail.

Il est intéressant d'utiliser également au moins une hématie-test O; H:W1 de phénotype « Réunion » confirmé par ce travail afin de savoir si l'anticorps du sujet est puissant et s'il peut avoir une spécificité anti-H de type 2 comme les anti-H issus de sujets « Bombay ».

Un titrage de l'anticorps anti-H est à réaliser (avec et sans DTT) sur pool d'hématies O; LE:1,-2 notamment s'il s'agit d'une femme enceinte.

Les allo-anticorps potentiellement associés continueront d'être éliminés après allo-adsorption en veillant à utiliser une hématie d'adsorption LE:-2 en raison de la forte prévalence de l'association de l'anti-H avec un anti-LE2 retrouvée ici chez les sujets « Bombay ».

En cas de doute avec un anticorps anti-H111 (anti-HI) une hématie rare informative H:1; I:-1; LE:-2 est à tester.

DISCUSSION

I. Réflexions sur le système de groupe sanguin H

À ce jour le système H repose officiellement sur un seul gène : *FUT1*. Il s'agit du seul système où un allèle nul en double dose du gène sur lequel repose le système peut quand même avoir un phénotype qui s'exprime, dû au gène *FUT2* homologue. Le gène *FUT2* ne s'exprime certes pas dans la lignée érythroblastique mais *FUT3* non plus qui pourtant est la base du système de groupe Lewis (ISBT 007). Les gènes *FUT1* et *FUT2* sont transmis en bloc et répondent donc à la définition d'un système de groupe par l'ISBT : « Les systèmes consistent en un ou plusieurs antigènes contrôlés par un seul gène ou par plusieurs gènes homologues fortement liés et rapprochés avec peu de recombinaisons entre eux ».

Conceptuellement, il nous apparaissait logique de reclasser d'emblée en phénotype H:W1 tous les sujets étant sécréteurs. Ces sujets expriment de la substance H (majoritairement de type 1) adsorbée sur leurs hématies. À partir du moment où de la substance H est sécrétée dans le plasma puis adsorbée par les hématies, il est compliqué d'interpréter les résultats de biologie moléculaire avec des mutations faux-sens de *FUT1* : la réactivité observée en phénotypage est-elle due à l'expression d'antigène H adsorbé ou à une fonctionnalité faible de l'enzyme *FUT1* ? C'est pour cela que le terme « para-Bombay » encore utilisé parfois ne nous semblait pas correct : ce terme imprécis signifie la plupart du temps tout H-déficient de statut sécréteur. Mais le fait d'être sécréteur ne présage en rien d'allèles nuls *FUT1* en double dose en cas de phénotype H-déficient. La confusion a été entretenue par le fait que les phénotypes H-déficients prévalents en Chine et à l'origine de nombreuses publications étaient dus à des haplotypes effectivement [*FUT1*_{nul} – *FUT2* fonctionnel], donnant l'impression d'un groupe « para-Bombay » homogène.

II. Résultats principaux de l'étude

A. Résultats généraux

Notre étude était bivalente : elle s'attachait tout d'abord à explorer les bases moléculaires des phénotypes H-déficients. Nous avons ainsi retrouvé dans la cohorte

22% des mutations de *FUT1* déjà recensées par l'ISBT et même augmenté le *pool* de mutations de 15% (huit nouvelles mutations responsables de phénotypes H:-1 ou H:W1). Aucune étude n'avait jamais décrit en une seule fois un si grand nombre de nouvelles mutations pour ce gène : ce résultat prolifique était dû aux nombreux échantillons inclus grâce à la richesse de la bibliothèque du CNRGS. Les neuf nouveaux allèles de *FUT1* (dont huit mutations altérant la fonction de la protéine) décrits dans ce travail pourront être référencés par l'ISBT, publiés et enrichir les connaissances sur ce système de groupe sanguin.

Cette étude n'était pas que la description de bases moléculaires pour un phénotype érythrocytaire. Il s'agissait également d'améliorer la sécurité transfusionnelle en combinant les données de la biologie moléculaire, de la sérologie et une revue rétrospective des dossiers immuno-hématologiques pour effectuer une mise à jour des phénotypes H et ABO des sujets inclus dans le registre national dont certains sont des donneurs actifs. Le diagnostic et la classification des futurs sujets H-déficients référés au CNRGS seront également facilités par l'ensemble des données présentées dans ce manuscrit.

Cinq échantillons enregistrés dans le registre national comme H-déficients ne présentaient pas d'anomalie de la séquence codante de *FUT1*, pas même à l'état hétérozygote. Il est improbable qu'une mutation du promoteur de *FUT1* (jamais décrite) non détectée par le séquençage affecte tous ces sujets à l'état homozygote, et aucun autre de façon hétérozygote : aucun des 65 autres sujets ne présentait en effet de mutation unique à l'état hétérozygote pouvant être potentiellement associée à une mutation non détectée du promoteur. Ces cinq sujets (quatre de groupe B et un de groupe A) ne présentaient pas d'affaiblissement des antigènes A et B ce qui était incompatible avec un déficit en antigène H, et ont été conclus H-déficients il y a plus de vingt ans alors que les réactifs anti-H utilisés étaient moins sensibles (lectines). Les RAI ne montraient qu'un faible anti-H111, voire aucun anticorps à 37°C. Enfin, ces sujets avaient été enregistrés dans la base de façon rapprochée dans le temps, il semblait donc s'agir d'une attitude temporaire de considérer de tels sujets H-déficients. Quatre de ces sujets étaient de groupe B et d'origine africaine : une galactosyltransférase particulièrement efficace dans la conversion d'antigène H en antigène B semble exister en Afrique et expliquer l'apparente diminution d'expression de H. Ces cinq sujets ont été reclassés H:1 de groupe A et B sans particularité après notre étude.

B. Comparaison à la littérature

1. Généralités

Au niveau français, aucun centre n'effectue le séquençage du gène *FUT1* à notre connaissance, pas même à La Réunion où les phénotypes H-déficients peuvent être plus fréquemment rencontrés.

Les publications internationales concernant *FUT1* ont posé les bases du système entre 1989 et 1997 : le locus a été décrit et la majorité des mutations, dont les prévalentes, publiées pendant cette période. Depuis 1997, les publications concernaient la description de nouveaux allèles.

Nous confirmons ainsi certaines données de la littérature :

- La mutation *FUT1*:c.725T>G (p.Leu242Arg) « Bombay » ségrégeait bien chez nos treize sujets indiens avec une délétion du gène *FUT2*.
- La mutation *FUT1*:c.349C>T (p.His117Tyr) « Réunion » ségrégeait avec l'allèle non fonctionnel *FUT2**01N.02.
- Pour les mutations sporadiques nous retrouvions des haplotypes *FUT1* – *FUT2* identiques aux cas index des publications lorsque nos sujets provenaient de la même zone géographique.
- Le gène *FUT1* était très monomorphe avec aucune variation de séquence autre que les mutations mises en causes sur plus de 70 séquençages.

Par contre, il était inattendu de retrouver des discordances haplotypiques (cinq constatées, cf. tableau 14) étant donné la rareté des mutations de *FUT1* et la proximité avec *FUT2*. L'exemple du locus *RHD* – *RHCE* montre que des recombinaisons entre deux gènes très rapprochés sur un locus sont possibles dans l'évolution, mais il est étonnant que cet événement attendu rare intervienne justement sur des allèles rares de *FUT1*. Une hypothèse serait qu'il n'y ait pas eu de recombinaison entre les deux gènes mais qu'il existe des *hotspots* mutationnels sur le gène *FUT1* (les allèles *FUT2* comprenaient d'autres polymorphismes associés).

Un autre fait troublant venait confirmer les impressions de Wagner⁽⁵⁰⁾ : toutes les mutations non-sens et *frameshift* de *FUT1* interviennent à partir du deuxième tiers de la séquence codante (figure 26). Les trois nouvelles mutations entraînant des décalages du cadre de lecture que nous mettons en évidence sont également situées dans la deuxième moitié de la séquence.

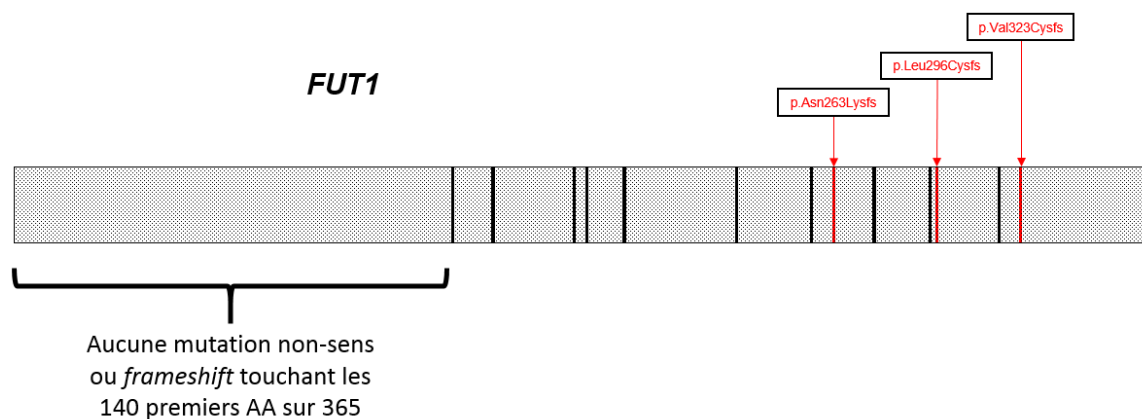


Figure 26 : Localisation sur la séquence d'AA de *FUT1* des mutations non-sens et *frameshift* décrites

Les mutations déjà décrites dans la littérature sont indiquées par des traits noirs et les nouvelles de notre étude par des traits rouges.

Aucune raison évidente ne permet d'expliquer pourquoi des mutations de ce type interviendraient particulièrement au niveau du site catalytique (contrairement aux mutations faux-sens qui altèrent plus volontiers le phénotype quand elles touchent le site catalytique). L'hypothèse envisagée pourrait être l'existence d'un deuxième codon *start* plus lointain mais avant le 140^{ème} acide aminé, qui pourrait shunter les mutations non-sens et *frameshift* bien que cela n'ait jamais été décrit. Trois méthionines dans le cadre de lecture seraient potentiellement candidates : celles en positions 62, 93 et 116. Cependant, p.Met93 ne présente pas un contexte de séquence de Kozak⁽⁸¹⁾ acceptable du fait d'une pyrimidine au lieu d'une purine en position -3. L'acide aminé p.Met116 présente une purine en -3 mais est suivi d'un C au lieu d'un G en +1. De plus, les 115 premiers acides aminés de la protéine seraient manquants alors que le phénotype « Réunion » est causé par une mutation faux-sens sur l'AA 117. La méthionine candidate la plus envisageable serait donc p.Met62 qui est dans le contexte suivant : **GCG ATG G** avec une purine en -3 et un G en +1 satisfaisant aux critères de Kozak, et amputant le moins d'acides aminés à l'enzyme FUT1 parmi les trois méthionines candidates. Cette éventuelle isoforme manquerait néanmoins de domaine transmembranaire pour l'ancrage dans le Golgi et serait ainsi une forme soluble de l'enzyme. Il semble néanmoins improbable qu'une telle isoforme de FUT1 puisse ne jamais avoir été mise en évidence. De plus, une forme soluble plasmatique de l'enzyme produirait de l'antigène H adsorbé incompatible avec une expression normale des antigènes ABO.

2. Cas particuliers

Le sujet 12704-ZAM., réunionnais, présentait un allèle *FUT1* retrouvé pour le moment seulement chez des sujets chinois ou japonais (c.551_552delAG) en double hétérozygotie avec la mutation classique réunionnaise. Pour ce dernier sujet né en 1985, il est possible qu'un de ses parents, porteur de cette mutation du Sud-Est asiatique, ait émigré à La Réunion après la fin du protectorat français et la Guerre d'Indochine (1946-1954) et ait conçu un enfant avec un sujet porteur de la mutation réunionnaise. C'est une explication potentielle pour expliquer la présence de cet allèle typiquement asiatique chez un sujet d'origine réunionnaise.

Le sujet 971-DOA., non sécréteur, présentait la mutation p.Thr98Met à l'état homozygote et exprimait de toute évidence de l'antigène H puisque l'antigène A était détecté en épreuve globulaire ABO. Cependant, cet allèle *FUT1* avait été décrit comme non fonctionnel après transfection dans des cellules COS-7 dans un poster en 2011 au congrès annuel de l'AABB San Diego⁽⁸²⁾.

III. Résultats secondaires

Ces résultats correspondaient à la partie sérologique de l'étude. De grandes disparités d'expression de l'antigène H selon les génotypes *FUT1-FUT2* des hématies-tests étaient observées lors des titrages à l'aide de plasmas issus de sujets « Bombay ». Cela confirmait que le phénotype H:W1 pouvait être extrêmement hétérogène, à la manière des phénotypes ABO:W1 (A faibles), avec une gradation de l'expression de l'antigène en fonction du niveau d'altération de la protéine. Les hématies de phénotype « Réunion » présentaient la plus forte expression d'antigène H, pouvant être agglutinées jusqu'au titre 256. Au contraire, les hématies de génotype *FUT1*_{nu1} de statut sécréteur et de groupe non O présentaient une expression de H très faible, rehaussée par la papaïne.

La fonctionnalité des allèles *FUT1* altérés pouvait être pressentie par l'interprétation de ces titrages. Par ordre décroissant de fonctionnalité (les nouvelles mutations décrites sont soulignées) :

p.His117Tyr (« Réunion ») >>> p.Pro133del > p.Ala110Thr > p.Arg108Leu > p.Met1?
> p.Phe312Val.

Les autres mutations correspondaient à des allèles non fonctionnels.

Néanmoins, l'interprétation de la fonctionnalité d'un allèle *FUT1* était délicate en raison des éléments qui interféraient : le second allèle *FUT1* (effet-dose), les deux allèles *FUT2*, le phénotype ABO. Ces données sont donc des indications très larges mais ne peuvent en aucun cas remplacer des études fonctionnelles qui n'étaient pas réalisables dans le cadre d'une thèse d'exercice.

Au niveau de l'expression des antigènes ABO : l'échantillon de phénotype « Réunion » testé était agglutiné 3+ avec l'anti-ABO1 et 4+ avec l'anti-ABO3 sur hématies natives. Cela reflétait bien l'expression relativement importante de substance H par ce sous-groupe H-déficient. Cependant au niveau de la revue rétrospective des phénotypages ABO, quelques échantillons comme 2894-LEG. ou 12304-DUM., génétiquement d'haplotypes « Réunion » homozygotes, avaient nécessité une fixation-élution afin de mettre en évidence l'antigène A. Une telle différence de sensibilité entre les réactifs d'épreuve globulaire utilisés il y a une dizaine d'années et ceux actuels semble peu probable. Une enzyme A_2 pourrait être chez ces sujets la cause de la discordance. Il serait intéressant de reprendre tous ces échantillons « Réunion » désormais génotypés afin de refaire les phénotypages ABO avec les réactifs actuels de façon standardisée. Cependant le nombre de paillettes disponibles est le facteur limitant et il faudrait évaluer la balance coût en ressources biologiques / intérêt de la démarche.

Tous les sujets *FUT1*_{null} n'exprimant du H que par l'intermédiaire de l'enzyme *FUT2* présentaient des réactions à la limite de la détection sur hématies natives. Pour ceux de groupe A, la réactivité était augmentée de façon notable après action des enzymes. Pour 3335-UCC. de groupe B il était intéressant de constater que l'anti-B monoclonal sur hématies papainées permettait de mettre en évidence (1+) l'antigène B mais pas l'anti-B polyclonal sur hématies bromélinées. Le puits anti-ABO3 ne réagissait pas non plus du tout de la même manière en gel monoclonal et polyclonal chez ce sujet (négatif sur gel monoclonal, positif 3+ sur gel polyclonal). La difficulté de mettre en évidence l'antigène B pour les sujets H-déficients « atypiques » (intensité jamais supérieure à 1+ sur hématies traitées par les enzymes) fait se poser la question du génotypage ABO lorsque le génotype *FUT1* sort de l'ordinaire « Réunion » ou « Bombay ». Les implications transfusionnelles de cet antigène « B faible » chez les donneurs actifs sont également incertaines.

IV. Applications

L'application avec le plus d'impact clinique était le reclassement des CGR congelés à la BNSPR. À la suite de ce travail, 61 CGR considérés H:-1 ont été reclassés H:W1. Seuls 27 CGR dont il était certain qu'il s'agissait de réels H:-1 ont conservé ce phénotype. Parmi les CGR qui étaient considérés H:-1 avant l'étude, la moitié exprimait une quantité de substance H relativement importante (sujets « Réunion »). Les épreuves de compatibilité (EDC) auraient été positives avec un receveur H:-1 « Bombay » présentant un anti-H naturel puissant comme c'est toujours le cas. Outre une incompréhension de la positivité de l'EDC, cela aurait pu entraîner un retard à la prise en charge transfusionnelle. Le problème est particulièrement important en période de garde si un besoin en sang rare H:-1 apparaît urgent : dans ce contexte les EDC ne sont pas réalisées au CNRGS à partir des paillettes mais au niveau du dépôt de sang du receveur avec les tubulures des CGR décongelés. On comprend donc l'importance dans ce contexte de sélectionner d'emblée une poche présumée compatible. Ces 27 CGR confirmés H:-1 sont donc un stock certes faible mais sécurisant lorsque le statut *FUT1* du receveur avec anti-H est inconnu dans la mesure où ils passeront l'EDC sans entraîner de retard transfusionnel (si le receveur n'a pas d'autre allo-anticorps associé...). Connaître le statut *FUT1* des CGR congelés permettra de transfuser éventuellement en CGR « géno-compatible » les sujets de phénotype H:W1 qui sont comme nous l'avons montré très hétérogènes dans l'expression de l'antigène H.

L'autre grande application de ce travail est donc l'étude moléculaire des nouveaux cas de sujets H-déficients référés au CNRGS. Ce génotypage peut être relativement rapide puisqu'une seule PCR d'amplification suffit et seulement 3 puits de séquence nécessaires pour obtenir la séquence codante de *FUT1*. Selon l'orientation qui sera décidée d'utiliser ou non la biologie moléculaire en première intention, cela pourrait permettre d'économiser des ressources rares biologiques comme certaines hématies H:W1 en faible quantité et le plasma rare « Bombay ».

Au niveau sérologique, le typage moléculaire des réactifs issus de sujets H-déficients est également d'intérêt puisqu'à partir de maintenant une liste claire des hématies-tests H:-1, H:W1 d'intensité relativement élevée et H:W1 d'intensité très faible est disponible pour sélectionner les réactifs d'origine humaine les plus adaptés.

V. Forces et limites de l'étude

Des mutations à l'état homozygote ou hétérozygote composite expliquant les phénotypes H-déficients rencontrés ont été mises en évidence chez 65 sujets séquencés pour *FUT1*. Nous avons considéré que les cinq sujets pour lesquels aucune mutation n'avait été retrouvée ne présentaient pas réellement de phénotype H-déficient après étude rétrospective de leurs dossiers respectifs. La sensibilité et la spécificité de la méthode étaient donc confirmées. La cohérence des résultats était également parfaite : par exemple, aucune discordance n'avait été constatée entre les séquences de *FUT2* et le phénotype Lewis des sujets inclus, les sujets de génotype « Bombay » étaient bien originaires du pourtour de l'Océan Indien et ne présentaient pas d'amplification de *FUT2* (confirmant au passage la non-amplification du pseudogène *Sec1*) et les sujets « Réunion » étaient bien non sécréteurs.

Une autre force de cette étude était son efficience. En effet des résultats très intéressants ont été obtenus pour la prise en charge diagnostique et thérapeutique des sujets H-déficients, dont des résultats publiables en ce qui concerne la mise en évidence de nouvelles mutations pour le gène *FUT1*. Ces résultats ont été obtenus avec une consommation de réactifs relativement modeste, ce projet n'ayant bénéficié d'aucun financement en dehors des fonds de fonctionnement du CNRGS.

Les limites concernaient les deux parties de l'étude : génétique et sérologique.

Comme précisé plus haut, l'exploitation des données rétrospectives, notamment celles de RAI, était délicate du fait de la dispersion dans le temps des analyses. La limite entre anticorps anti-H1 et anti-H111 était parfois floue en l'absence d'étude salivaire effectuée au moment de la réalisation des RAI, surtout quand l'anticorps était d'intensité faible. Pour les phénotypages ABO, les techniques utilisées en routine avant l'avènement de la microfiltration et des anticorps monoclonaux étaient moins sensibles pour la détection des expressions antigéniques faibles. La fixation-élution, technique de deuxième intention très sensible, était cependant plus répandue. La fixation-élution reste de nos jours une technique très sensible, mais il n'y a plus de réactifs anti-A et anti-B polyclonaux de bonne qualité en phase liquide facilement disponibles pour la réaliser. Cette partie sérologique avait pour but d'éclairer certains points mais pas d'être exhaustive et ne constituait pas le cœur de l'étude. Le volume d'hématies récupérées après décongélation et

lavages successifs des paillettes était assez faible et peu de prélèvement était disponible, notamment pour le traitement enzymatique. Ces paillettes constituent avec les plasmas rares une des richesses du CNRGS et ne pouvaient pas être dilapidées.

La tentative de réalisation à partir de plasma de sujet « Bombay » d'un réactif tout groupe déplété en anti-A et anti-B a échoué. Peut-être une technique d'élution par la chaleur au lieu de l'acide aurait-elle mieux fonctionné. Il est possible également que le nombre de sites H disponibles n'ait pas été suffisant pour fixer assez d'anticorps anti-H et retrouver un haut titre après élution. Par conséquent la présence d'anti-A et d'anti-B dans le plasma des réactifs humains utilisés pouvait gêner l'interprétation des réactions avec les hématies H:W1 de groupe non O.

Au niveau moléculaire, un écueil était que les allèles de *FUT1* n'avaient pas été séparés par clonage ou PCR allèle spécifique. L'échantillon 1332-VAB. permettait de définir l'allèle p.[His176Gln;Trp232Ter] qu'il possédait à l'état homozygote (ou homogène) et retrouvé à l'état hétérozygote chez 22663-HOM. En dehors de cet allèle comprenant deux mutations, tous les allèles mutés ne comprenaient qu'une seule mutation sans polymorphisme associé. Ce caractère particulièrement monomorphe de *FUT1* nous permettait de considérer les mutations rencontrées comme se situant sur des allèles différents. La délétion du gène *FUT1* n'a également jamais été décrite.

Aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée pour les mutations faux-sens mises en évidence bien qu'il soit quasiment certain que ces allèles soient la cause des phénotypes H-déficients rencontrés, étant donné le caractère monomorphe du gène *FUT1* et l'absence de description de mutations décrites touchant le promoteur.

VI. Perspectives

L'apport diagnostique du génotypage *FUT1* est important pour la prise en charge transfusionnelle des sujets H-déficients (donneurs comme receveurs). Cependant le système de groupe sanguin H étant en étroite relation phénotypique avec le système ABO, ces systèmes expriment leurs antigènes respectifs de façon interdépendante : les antigènes ABO sont bien sûr dépendants de H qui est leur précurseur mais l'expression de H dépend également des allèles *ABO* en présence.

L'étape suivante de l'exploration de ces phénotypes serait donc de développer le génotypage *ABO* au CNRGS afin de parfaire la compréhension des interactions de ces deux systèmes et de prédire le phénotype des sujets de la manière la plus précise possible, notamment pour l'antigène B qui s'est montré particulièrement délicat à mettre en évidence en sérologie, même avec des techniques adaptées de grande sensibilité.

Des études fonctionnelles qui étaient impossibles dans le cadre de ce travail pourraient étudier de façon précise et sans interférence de *FUT2* ni du phénotype *ABO* l'altération de l'enzyme *FUT1* entraînée par les mutations observées.

Une étude sérologique exhaustive des échantillons H-déficients et de plus grande envergure pourrait également être réalisée mais dépend des ressources biologiques disponibles. Ce type d'étude ne peut être réalisable qu'avec l'aide des laboratoires qui transmettent des échantillons en quantité suffisante au CNRGS.

Enfin, un partenariat avec l'Établissement de Transfusion Sanguine de La Réunion serait souhaitable afin de mutualiser les ressources et les données disponibles. Un partage de l'expérience et des retours d'actes transfusionnels dans ce foyer géographique de sujets H-déficients est aussi à encourager.

CONCLUSION

Le phénotypage de certains systèmes de groupes sanguins peut être difficile en l'absence de réactifs commerciaux adaptés. Dans ce contexte, l'utilisation de la biologie moléculaire est d'une grande aide diagnostique en permettant de prédire le phénotype. Elle est ainsi devenue un outil prépondérant de l'immuno-hématologie moderne et son usage continuera à se répandre dans la discipline⁽⁸³⁾.

Dans ce travail, le séquençage des gènes *FUT1* et *FUT2* a été mis au point au CNRGS. Ces gènes codent pour les deux $\alpha(1,2)$ fucosyltransférases à l'origine de l'antigène H, précurseur des antigènes ABO. Le déficit total de cet antigène conduit au phénotype érythrocytaire « Bombay », le groupe sanguin rare le plus connu du corps médical et le plus médiatisé. Ce séquençage sera appliqué pour le diagnostic moléculaire des nouveaux sujets H-déficients référés au CNRGS, dont une des missions essentielles est d'assurer la sécurité transfusionnelle de tous les sujets de phénotype érythrocytaire rare⁽⁸⁴⁾.

Le séquençage d'une cohorte de 70 sujets H-déficients a permis de mettre à jour de façon précise leur phénotype H dans le registre national des sujets présentant un phénotype érythrocytaire rare. L'annexe 10 est le récapitulatif de l'étude pour tous ces sujets. Le phénotype de CGR H-déficients congelés à la Banque Nationale de Sang de Phénotype Rare a également été mis à jour suite à cette étude, permettant un choix plus adapté pour les besoins transfusionnels des sujets H:W1 et H:-1.

Neuf nouveaux allèles *FUT1* à l'origine de phénotypes H-déficients ont été mis en évidence amenant le nombre d'allèles altérés décrits à 64.

Une représentation simplifiée des phénotypes H-déficients est enfin proposée :

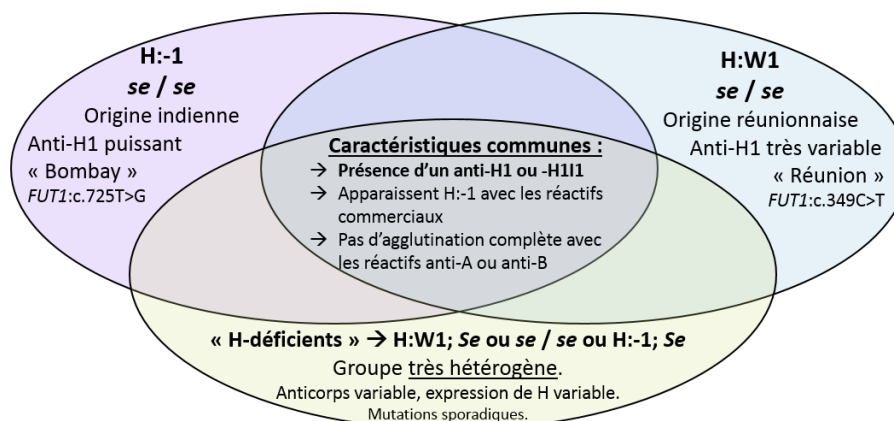


Figure 27 : Représentation des trois *clusters* de phénotypes H-déficients

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Landsteiner K. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wien Klin Wochenschr.* 1901;14:1132–4.
2. Lefrère J-J, Berche P. Karl Landsteiner découvre les groupes sanguins. *Transfus Clin Biol.* 2010 Feb;17(1):1–8.
3. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. *Br J Exp Pathol.* 1945;26:255–66.
4. Daniels G, Reid ME. Blood groups: the past 50 years. *Transfusion (Paris).* 2010 Feb;50(2):281–9.
5. Peyrard T, Pham BN, Rouger P. [The red blood cell antigen terminologies]. *Transfus Clin Biol J Société Fr Transfus Sang.* 2009 Sep;16(4):388–99.
6. Storry JR, Castilho L, Daniels G, Flegel WA, Garratty G, de Haas M, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Cancun report (2012). *Vox Sang.* 2014 Jul;107(1):90–6.
7. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. ABO Blood Group System. In: *The Blood Group Antigen FactsBook* [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2015 Sep 5]. p. 27–51. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012415849800003X>
8. Watkins WM. The ABO blood group system: historical background. *Transfus Med Oxf Engl.* 2001 Aug;11(4):243–65.
9. Laine RA, Rush JS. Chemistry of human erythrocyte polylectosamine glycopeptides (erythroglycans) as related to ABH blood group antigenic determinants. *Adv Exp Med Biol.* 1988;228:331–47.
10. Watkins WM. Biochemistry and Genetics of the ABO, Lewis, and P blood group systems. *Adv Hum Genet.* 1980;10:1–136, 379–85.
11. Clausen H, Hakomori S. ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang.* 1989;56(1):1–20.
12. Clausen H, Lavery SB, Nudelman E, Tsuchiya S, Hakomori S. Repetitive A epitope (type 3 chain A) defined by blood group A1-specific monoclonal antibody TH-1: chemical basis of qualitative A1 and A2 distinction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Feb;82(4):1199–203.
13. Chiaroni J, Ferrera V, Dettori I, Roubinet F. Groupes sanguins érythrocytaires. *EMC - Hématologie.* 2005 Jun;2(2):53–112.
14. Economidou J, Hughes-Jones NC, Gardner B. Quantitative measurements concerning A and B antigen sites. *Vox Sang.* 1967 May;12(5):321–8.

15. Williams MA, Voak D. Studies with ferritin-labelled Dolichos biflorus lectin on the numbers and distribution of A sites on A 1 and A 2 erythrocytes, and on the nature of its specificity and enhancement by enzymes. *Br J Haematol.* 1972 Oct;23(4):427–41.
16. Patenaude SI, Seto NOL, Borisova SN, Szpacenko A, Marcus SL, Palcic MM, et al. The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nat Struct Biol.* 2002 Sep;9(9):685–90.
17. Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature.* 1990 May 17;345(6272):229–33.
18. Yamamoto F, Marken J, Tsuji T, White T, Clausen H, Hakomori S. Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc alpha 1----2Gal alpha 1----3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J Biol Chem.* 1990 Jan 15;265(2):1146–51.
19. Yamamoto F, McNeill PD, Hakomori S. Human histo-blood group A2 transferase coded by A2 allele, one of the A subtypes, is characterized by a single base deletion in the coding sequence, which results in an additional domain at the carboxyl terminal. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Aug 31;187(1):366–74.
20. Lemieux RU. Haworth Memorial Lecture. Human blood groups and carbohydrate chemistry. *Chem Soc Rev.* 1978;7(4):423.
21. Oriol R, Danilovs J, Hawkins BR. A new genetic model proposing that the Se gene is a structural gene closely linked to the H gene. *Am J Hum Genet.* 1981 May;33(3):421–31.
22. Kumazaki T, Yoshida A. Biochemical evidence that secretor gene, Se, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Jul;81(13):4193–7.
23. Le Pendu J, Cartron JP, Lemieux RU, Oriol R. The presence of at least two different H-blood-group-related beta-D-gal alpha-2-L-fucosyltransferases in human serum and the genetics of blood group H substances. *Am J Hum Genet.* 1985 Jul;37(4):749–60.
24. Sarnesto A, Köhlin T, Thurin J, Blaszczyk-Thurin M. Purification of H gene-encoded beta-galactoside alpha 1----2 fucosyltransferase from human serum. *J Biol Chem.* 1990 Sep 5;265(25):15067–75.
25. Sarnesto A, Köhlin T, Hindsgaul O, Thurin J, Blaszczyk-Thurin M. Purification of the secretor-type beta-galactoside alpha 1----2-fucosyltransferase from human serum. *J Biol Chem.* 1992 Feb 5;267(4):2737–44.
26. Larsen RD, Ernst LK, Nair RP, Lowe JB. Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Sep;87(17):6674–8.
27. Le Pendu J, Oriol R, Juszczak G, Liberge G, Rouger P, Salmon C, et al. alpha-2-L-fucosyltransferase activity in sera of individuals with H-deficient red cells and normal H antigen in secretions. *Vox Sang.* 1983;44(6):360–5.

28. Le Pendu J, Lemieux RU, Lambert F, Dalix AM, Oriol R. Distribution of H type 1 and H type 2 antigenic determinants in human sera and saliva. *Am J Hum Genet.* 1982 May;34(3):402–15.
29. Liu Y, Fujitani N, Koda Y, Soejima M, Kimura H. Presence of H type 3/4 chains of ABO histo-blood group system in serous cells of human submandibular gland and regulation of their expression by the secretor gene (FUT2). *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 1999 Jul;47(7):889–94.
30. Ball SP, Tongue N, Gibaud A, Le Pendu J, Mollicone R, Gérard G, et al. The human chromosome 19 linkage group FUT1 (H), FUT2 (SE), LE, LU, PEPD, C3, APOC2, D19S7 and D19S9. *Ann Hum Genet.* 1991 Jul;55(Pt 3):225–33.
31. Reguigne-Arnould I, Couillin P, Mollicone R, Fauré S, Fletcher A, Kelly RJ, et al. Relative positions of two clusters of human alpha-L-fucosyltransferases in 19q (FUT1-FUT2) and 19p (FUT6-FUT3-FUT5) within the microsatellite genetic map of chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet.* 1995;71(2):158–62.
32. Rajan VP, Larsen RD, Ajmera S, Ernst LK, Lowe JB. A cloned human DNA restriction fragment determines expression of a GDP-L-fucose: beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase in transfected cells. Evidence for isolation and transfer of the human H blood group locus. *J Biol Chem.* 1989 Jul 5;264(19):11158–67.
33. Kelly RJ, Ernst LK, Larsen RD, Bryant JG, Robinson JS, Lowe JB. Molecular basis for H blood group deficiency in Bombay (Oh) and para-Bombay individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jun 21;91(13):5843–7.
34. Koda Y, Soejima M, Kimura H. Structure and expression of H-type GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase gene (FUT1). Two transcription start sites and alternative splicing generate several forms of FUT1 mRNA. *J Biol Chem.* 1997 Mar 14;272(11):7501–5.
35. Koda Y, Soejima M, Kimura H. Changing transcription start sites in H-type alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT1) during differentiation of the human erythroid lineage. *Eur J Biochem FEBS.* 1998 Sep 1;256(2):379–87.
36. Rouquier S, Lowe JB, Kelly RJ, Fertitta AL, Lennon GG, Giorgi D. Molecular cloning of a human genomic region containing the H blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene and two H locus-related DNA restriction fragments. Isolation of a candidate for the human Secretor blood group locus. *J Biol Chem.* 1995 Mar 3;270(9):4632–9.
37. Kelly RJ, Rouquier S, Giorgi D, Lennon GG, Lowe JB. Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J Biol Chem.* 1995 Mar 3;270(9):4640–9.
38. Grollman EF, Kobata A, Ginsburg V. An enzymatic basis for Lewis blood types in man. *J Clin Invest.* 1969 Aug;48(8):1489–94.

39. Marcus DM, Cass LE. Glycosphingolipids with Lewis blood group activity: uptake by human erythrocytes. *Science*. 1969 May 2;164(3879):553–5.
40. Hammar L, Månsson S, Rohr T, Chester MA, Ginsburg V, Lundblad A, et al. Lewis phenotype of erythrocytes and Leb-active glycolipid in serum of pregnant women. *Vox Sang*. 1981 Jan;40(1):27–33.
41. Henry S, Oriol R, Samuelsson B. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang*. 1995;69(3):166–82.
42. Henry SM, Benny AG, Woodfield DG. Investigation of Lewis phenotypes in Polynesians: evidence of a weak secretor phenotype. *Vox Sang*. 1990;58(1):61–6.
43. Kudo T, Iwasaki H, Nishihara S, Shinya N, Ando T, Narimatsu I, et al. Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. II. Secretor gene inactivation by a novel single missense mutation A385T in Japanese nonsecretor individuals. *J Biol Chem*. 1996 Apr 19;271(16):9830–7.
44. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. Lewis Blood Group System. In: *The Blood Group Antigen FactsBook* [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2015 Aug 31]. p. 347–59. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124158498000090>
45. Bhende YM, Deshpande CK, Bhatia HM, Sanger R, Race RR, Morgan WTJ, et al. A “new” blood group character related to the ABO system. *Lancet Lond Engl*. 1952 May 3;1(6714):903–4.
46. Koda Y, Soejima M, Johnson PH, Smart E, Kimura H. Missense mutation of FUT1 and deletion of FUT2 are responsible for Indian Bombay phenotype of ABO blood group system. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Sep 8;238(1):21–5.
47. Bhatia HM, Sathe MS. Incidence of “Bombay” (Oh) phenotype and weaker variants of A and B antigen in Bombay (India). *Vox Sang*. 1974;27(6):524–32.
48. Dipta TF, Hossain AZ. The Bombay blood group: are we out of risk? *Mymensingh Med J MMJ*. 2011 Jul;20(3):536–40.
49. Wagner FF, Flegel WA. Polymorphism of the h allele and the population frequency of sporadic nonfunctional alleles. *Transfusion (Paris)*. 1997 Mar;37(3):284–90.
50. Wagner T, Vadon M, Staudacher E, Schmarda A, Gassner C, Helmberg W, et al. A new h allele detected in Europe has a missense mutation in alpha(1,2)-fucosyltransferase motif II. *Transfusion (Paris)*. 2001 Jan;41(1):31–8.
51. Storry JR, Johannesson JS, Poole J, Strindberg J, Rodrigues MJ, Yahalom V, et al. Identification of six new alleles at the FUT1 and FUT2 loci in ethnically diverse individuals with Bombay and Para-Bombay phenotypes. *Transfusion (Paris)*. 2006 Dec;46(12):2149–55.
52. Wagner FF, Kasulke D, Kerowgan M, Flegel WA. Frequencies of the blood groups ABO, Rhesus, D category VI, Kell, and of clinically relevant high-frequency

- antigens in south-western Germany. *Infusionsther Transfusionsmed.* 1995 Oct;22(5):285–90.
53. Gerard G, Vitrac D, Le Pendu J, Muller A, Oriol R. H-deficient blood groups (Bombay) of Reunion Island. *Am J Hum Genet.* 1982 Nov;34(6):937–47.
54. Le Pendu J, Gerard G, Vitrac D, Juszczak G, Liberge G, Rouger P, et al. H-deficient blood groups of Reunion island. II. Differences between Indians (Bombay Phenotype) and whites (Reunion phenotype). *Am J Hum Genet.* 1983 May;35(3):484–96.
55. Le Pendu J, Lambert F, Gérard G, Vitrac D, Mollicone R, Oriol R. On the specificity of human anti-H antibodies. *Vox Sang.* 1986;50(4):223–6.
56. Le Pendu J, Clamagirand-Mulet C, Cartron JP, Gerard G, Vitrac D, Oriol R. H-deficient blood groups of Reunion Island. III. alpha-2-L-fucosyltransferase activity in sera of homozygous and heterozygous individuals. *Am J Hum Genet.* 1983 May;35(3):497–507.
57. Fernandez-Mateos P, Cailleau A, Henry S, Costache M, Elmgren A, Svensson L, et al. Point mutations and deletion responsible for the Bombay H null and the Reunion H weak blood groups. *Vox Sang.* 1998;75(1):37–46.
58. Levine P, Uhlir M, White J. Ah, an incomplete suppression of A resembling Oh. *Vox Sang.* 1961 Sep;6:561–7.
59. Solomon JM, Waggoner R, Leyshon WC. A QUANTITATIVE IMMUNOGENETIC STUDY OF GENE SUPPRESSION INVOLVING A1 AND H ANTIGENS OF THE ERYTHROCYTE WITHOUT AFFECTING SECRETED BLOOD GROUP SUBSTANCES. THE ABH PHENOTYPES AHM AND OHM. *Blood.* 1965 Apr;25:470–85.
60. Lanset S. Une famille comportant les phenotypes Bombay: O_h^{AB} et O_h^B . *Transfusion (Paris).* 1966;9(3):255–63.
61. Beranová G, Prodanov P, Hrubisko M, Smálik S. A new variant in the ABO blood group system: Bh. *Vox Sang.* 1969 Jun;16(6):449–56.
62. Hrubisko M, Laluha J, Mergancová O, Zákovicová S. New variants in the ABOH blood group system due to interaction of recessive genes controlling the formation of H antigen in erythrocytes: the “Bombay”-like phenotypes OHm, OBHm and OABHm. *Vox Sang.* 1970 Aug;19(2):113–22.
63. Rodier L, Lopez M, Liberge G, Badet J, Gerbal A, Salmon C. Anti-h absorbed by, and eluted from Oh (Bombay) red blood cells. *Biomed Publiée Pour AAICIG.* 1974 Jul;21(7):312–6.
64. Salmon C, Rouger P, Rodier L, Liberge G, Juszczak G, Cartron JP, et al. Different H deficient phenotypes present in one kindred. *Rev Fr Transfus.* 1980 Jul;23(3):251–8.
65. Race RR, Sanger R. *Blood groups in man.* 6th ed. Oxford: Philadelphia: Blackwell Scientific Publications ; distributed by J. B. Lippincott; 1975. 659 p.

-
66. Liang W, Xu H, Liu Y, Zhou S, Deng D, Yang L, et al. Molecular genetic analysis of para-Bombay phenotype in Chinese persons: a novel *FUT1* allele is identified: LIANG ET AL. *Transfusion (Paris)*. 2015 Jun;55(6pt2):1588–1588.
67. The International Society of Blood Transfusion Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology Working Party. <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/> (last accessed 6 September 2015).
68. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463–7.
69. Dunnen JT den, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat*. 2000;15(1):7–12.
70. Blumenfeld OO, Patnaik SK. Allelic genes of blood group antigens: a source of human mutations and cSNPs documented in the Blood Group Antigen Gene Mutation Database. *Hum Mutat*. 2004 Jan;23(1):8–16.
71. Abstracts. *Vox Sang*. 2015 Jun;109:1–379.
72. Yu LC, Yang YH, Broadberry RE, Chen YH, Lin M. Heterogeneity of the human H blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene among para-Bombay individuals. *Vox Sang*. 1997;72(1):36–40.
73. Kaneko M, Nishihara S, Shinya N, Kudo T, Iwasaki H, Seno T, et al. Wide variety of point mutations in the H gene of Bombay and para-Bombay individuals that inactivate H enzyme. *Blood*. 1997 Jul 15;90(2):839–49.
74. Scientific Section. *Transfusion (Paris)*. 2004 Aug 26;44:1A – 141A.
75. Poster Abstracts. *Vox Sang*. 2013 Jun;105:65–299.
76. Guo Z, Xiang D, Zhu Z, Wang J, Zhang J, Liu X, et al. [Analysis on *FUT1* and *FUT2* gene of 10 para-Bombay individuals in China]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin J Med Genet*. 2004 Oct;21(5):417–21.
77. Yan L, Zhu F, Xu X, Hong X, Lv Q. Molecular basis for para-Bombay phenotypes in Chinese persons, including a novel nonfunctional *FUT1* allele. *Transfusion (Paris)*. 2005 May;45(5):725–30.
78. Posters. *Vox Sang*. 2011 Dec;101:39–134.
79. Mulet C, Cartron JP, Badet J, Salmon C. Activity of 2-alpha-L-fucosyltransferase in human sera and red cell membranes. A study of common ABH blood donors, rare “Bombay” and “Parabombay” individuals. *FEBS Lett*. 1977 Dec 1;84(1):74–8.
80. Morgan WTJ, Watkins WM. The detection of a product of the blood group O gene and the relationship of the so-called O-substance to the agglutinates A and B. *Br J Exp Pathol*. 1948 Apr;29(2):159–73.

81. Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*. 1986 Jan 31;44(2):283–92.
82. Scientific Section. *Transfusion (Paris)*. 2011 Sep;51:1A – 236A.
83. Peyrard T. Use of genomics for decision-making in transfusion medicine: laboratory practice. *ISBT Science Series*. 2013 Jun;8(1):11-15.
84. Peyrard T, Rouger P. La sécurité transfusionnelle et obstétricale des sujets présentant un groupe sanguin érythrocytaire rare. *Hématologie*. 2010 Mar;(2):143–55.

ANNEXES

Annexe 1.1 : Séquence codante du gène *FUT1* (NM_000148)

aggactcaggctctccctacctcagccccaggagtctaaacctt**taacttcctcttccctgggact**aaggagtgctgca
cccaggcgctcccttaccacacatccctcctcagcctcccctcctcagcctcagagcatttgctaattgcctttcctcc
cctgcagcc**ATGTGGCTCCGGAGCCATCGTCAGCTCTGCCTGGCCTTCCTGCTAGT**
CTGTGTCCTCTCTGTAATCTTCTTCCATATCCATCAAGACAGCTTCCACAT
GGCCTAGGCCTGTGCATCCTGTGTCCAGACCGCCGCTGGTGACACCCCCAG
TGGCCATCTTCTGCCTGCCGGGTACTGCGATGGGCCCAACGCCTCCTCTTCC
TGTCCCAGCACCCCTGCTTCCCTCTCCGGCACCTGGACTGTCTACCCCAATGG
CCGGTTTGGTA**ATCAGATGGGACAGTATGCCAC**GCTGCTGGCTCTGGCCCAGC
TCAACGGCCGCGGGCCTTTATCCTGCCTGCCATGCATGCCGCCCTGGCCCCG
GTATTCCGCATCACCCCTGCCCGTGTGGCCCCAGAAGTGGACAGCCGCACGC
CGTGGCGGGAGCTGCAGCTTACGACTGGATGTCGGAGGAGTACGCGGACTT
GAGAGATCCTTCTGAAGCTCTCTGGCTTCCCCTGCTCTTGGACTTTCTTCCA
CCATCTCCGGGAACAGATCCGCAGAGAGTTCACCCTGCACGACCACCTTCGG
GAAGAGGCGCAGAGTGTGCTGGGTGAGCTCCGCCTGGGCCGCACAGGGGAC
CGCCCGC**GCACCTTGTGCGCGTCC**ACGTGCGCCGTGGGGACTATCTGCAGG
TTATGCCTCAGCGCTGGAAGGGTGTGGTGGGCGACAGCGCCTACCTCCGGCA
GGCCATGGACTGGTTCCGGGCACGGCACGAAGCCCCCGTTTTTCGTGGTCACC
AGCAACGGCATGGAGTGGTGTAAAGAAAACATCGACACCTCCCAGGGCGATG
TGACGTTTGCTGGCGATGGACAGGAGGCTACACCGTGGAAAGACTTTGCCCTG
CTCACACAGTGCAACCACACCATTATGACCATTGGCACCTTCGGCTTCTGGGC
TGCCTACCTGGCTGGCGGAGACTGTCTACCTGGCCAACTTCACCCTGCCAG
ACTCTGAGTTCCTGAAGATCTTTAAGCCGGAGGCGGCCTTCTGCCCGAGTGG
GTGGGCATTAATGCAGACTTGTCTCCACTCTGGACATTGGCTAAGCCTTGA*gagc*
cagggagactttctgaagtagcctgatcttctagagccagcagtagctggcttcagaggcctggcatctctggagaa
*gcttggtgttctgaagcaaatgggtgccgatccaga*gtgattctagttgggagagttggagagaagggggacgt
ttctggaactgtctgaatattctagaactagcaaaacatcttctctgatggctggcaggcagttctagaagcc

La séquence codante est indiquée en majuscule et en caractères gras. L'intron 3 du gène est en minuscule et le 3'UTR en minuscule et italique. Les amorces d'amplification sont surlignées en jaune. Les amorces internes de séquençage (sens) sont surlignées en vert.

Annexe 1.2 : Séquence codante du gène *FUT2* (NM_000511)

gtataaacacacttgagatacatgcctgtgcacataggcaagtatgtgccaagtatttacacacctgaagtagaagca
 cacacacaccacactatg**cctgcacaccaccgcatg**gccacggtcaccagcgccccgggcctccatctcccagct
 aacgtgtcccgttttctcccctgacagcc**ATGCTGGTCGTT**CAGATGCCTTTCTCCTTTCCCAT
GGCCACTTCATCCTCTTTGTCTTTACGGTTTCCACTATATTTACGTTCAGCAG
CGGCTAGCGAAGATTCAAGCCATGTGGGAGTTACCGGTGCAGATACCAGTGCT
AGCCTCAACATCAAAGGCACTGGGACCCAGCCAGCTCAGGGGGATGTGGACG
ATCAATGCAATAGGCCGCCTGGGAACCAGATGGGCGAGTACGCCACACTGTA
CGCCC**TGGCCAAGATGAACGGGC**GGCCCCGCTTCATCCCGGCCAGATGCAC
 AGCACCTGGCCCCCATCTTCAGAATCACCTGCCGGTGCTGCACAGCGCCA
 CGGCCAGCAGGATCCCCTGGCAGAACTACCACCTGAACGACTGGATGGAGGA
 GGAATACCGCCACATCCCGGGGGAGTACGTCCGCTTCACCGGCTACCCCTGCT
 CCTGGACCTTCTACCACCACCTCCGCCAGGAGATCCTCCAGGAGTTCACCCCTG
 CACGACCACGTGCGGGAGGAGGCCCAGAAGTTCCTGCGGGGCCTGCAGGTG
 AACGGGAGCCGGCCGGGCACCTTTGTAGGGGTCCATGTTGCGCCGAGGGGACT
 ATGTCCATGTCATGCCAAAAGTGTGGAAGGGGGTGGTGGCCGACCGGCGATA
 CCTACAGCAGGCCCTGGACTGGTTCCGAGCTCGCTACAGCTCCCTCATCTTCG
 TGGTCACCAGTAATGGCATGGCCTGGTGTGCGGGAGAACATTGACACCTCCAC
 GGTGATGTGGTGTGGTGGCGATGGCATTGAGGGCTCACCTGCCAAAGATTT
 TGCTCTACTCACACAGTGTAACCACACCATCATGACCATTGGGACGTTCCGGGAT
 CTGGGCCGCATACCTCACGGGCGGAGACACCATCTACCTGGCCAATTACACCC
 TCCCGACTCCCCTTTCTCAAATCTTTAAGCCAGAGGCAGCCTTCCTGCCG
 GAGTGGACAGGGATTGCCGCAGACCTGTCCCCCTTACTCAAGCACTAA*tgctggc*
ccattcttgagacctttctccttctctgcctccctcaagatgagtgcccgggcatgagaagcacatgggtccatgagca
ggaccatctcttctgtgaa*gatgcggtgggctgcaagtaacagaaatctcagtgaacagtggcctggcgtggg*

La séquence codante est indiquée en majuscule et en caractères gras. L'intron 1 du gène est en minuscule et le 3'UTR en minuscule et italique. Les amorces d'amplification sont surlignées en jaune. L'amorce interne de séquençage (sens) est surlignée en vert.

Annexe 2 : Résultats SNPCheck pour *FUT1* et *FUT2*

SNPCheck Results

Overview

Name	Primer 1	Matching/ Mismatching bases	Primer 2	Matching/ Mismatching bases	Chr.	Amplified Region	Result	SNPs
FUT1-F1_and_FUT1-R3	TAACTTCCTCTTTCCCTG GGACT	23/0	TCTGGATACGGGCACCC ATT	20/0	19	1349 bp 49253317.. 49254665	All Filtered Out * 2 filtered	rs56400950 rs20102011 1

Reference Genome Build: 37.1

Source Database/s:ESP 6500
dbSNP 138
1kg 1.3

Max. Amplicon Size: 5000

Check completed: Fri, Nov 21 10:35:30 GMT

SNPCheck version: 3.2.1

PDF Generated: Fri, Nov 21 10:36:08 GMT

Binding region variants filtered out if matching any of the following criteria:
 Not validated by any of: cluster, frequency, submitter, double hit, HapMap, 1000 Genomes
 Classified as: no variation
 Longer than 10bps

SNPCheck Results

Overview

Name	Primer 1	Matching/ Mismatching bases	Primer 2	Matching/ Mismatching bases	Chr.	Amplified Region	Result	SNPs
FUT2-F1_and_FUT2-R3	CCTGCACACCACCGCAT G	18/0	TTCACAGAAGAGAGATG GGTCC	22/0	19	1229 bp 49206127.. 49207355	No SNPs Found	

Reference Genome Build: 37.1

Source Database/s:ESP 6500
dbSNP 138
1kg 1.3

Max. Amplicon Size: 5000


Check completed: Fri, Nov 21 10:40:06 GMT

SNPCheck version: 3.2.1


PDF Generated: Fri, Nov 21 10:41:09 GMT

Binding region variants filtered out if matching any of the following criteria:
 Not validated by any of: cluster, frequency, submitter, double hit, HapMap, 1000 Genomes
 Classified as: no variation
 Longer than 10bps

Annexe 3.1 : Fiche d'analyse du séquençage de *FUT1*

 CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE POUR LES GROUPES SANGUINS	FICHE D'ENREGISTREMENT	Référence : FQ/IHS/...
	ANALYSE DE SÉQUENCE : <i>FUT1</i>	Service émetteur : Immuno-hématologie spécialisée/Biologie moléculaire Date : 12/01/2015 Version : A Page 1 sur 1
Personnel concerné : biologistes, internes, cadres et techniciens du laboratoire de biologie moléculaire du Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins.		
NOM et prénom du sujet : Date de naissance :		Source d'ADN :
N° de dossier :		Date d'amplification : Date de réaction de séquence :
Gène : <i>FUT1</i> Séquence de référence : NM_000148.3		
Technicien : Date de passage sur le séquenceur :		Séquence lue par : Date :
POLYMORPHISMES FRÉQUENTS	COMMENTAIRES	
<u>Intron 3</u> c.-2-33A>T <input type="checkbox"/> A/A <input type="checkbox"/> A/T <input type="checkbox"/> T/T rs838137	Phénotype LE du sujet : Analyses complémentaires :	
<u>Exon 4</u> c.35C>T <input type="checkbox"/> C/C <input type="checkbox"/> C/T <input type="checkbox"/> T/T rs2071699		
c.822C>A <input type="checkbox"/> C/C <input type="checkbox"/> C/A <input type="checkbox"/> A/A rs838138		
<u>3' UTR</u> c.*52G>A <input type="checkbox"/> G/G <input type="checkbox"/> G/A <input type="checkbox"/> A/A rs4015		
Autres variations :		
RÉSULTAT : Site : Exon : Intron : Type : c. Conséquence : p. État hétérozygote <input type="checkbox"/> ou homogène <input type="checkbox"/>	INTERPRÉTATION : <input type="checkbox"/> Phénotype H:1 prédit. <input type="checkbox"/> Variation(s) prédisant un phénotype H:-1 compte tenu du statut non sécréteur. <input type="checkbox"/> Variation(s) prédisant une altération majeure de la protéine <i>FUT1</i> , mais phénotype H non prédictible compte tenu du statut sécréteur ou inconnu. <input type="checkbox"/> Variation(s) prédisant un phénotype H:W1. <input type="checkbox"/> Variations de signification inconnue, phénotype H non prédictible. <input type="checkbox"/> Autre :	
<i>Réservé au biologiste :</i>	<i>Analyse(s) complémentaire(s) à prévoir :</i>	<i>Date de compte-rendu :</i>

Annexe 3.2 : Fiche d'analyse du séquençage de *FUT2*

 CENTRE NATIONAL DE REFERENCE POUR LES GROUPES SANGUINS	FICHE D'ENREGISTREMENT	Référence : FQ/IHS/...
	ANALYSE DE SÉQUENCE : <i>FUT2</i>	Service émetteur : Immuno-hématologie spécialisée/Biologie moléculaire Date : 22/12/2014 Version : A Page 1 sur 1
Personnel concerné : biologistes, internes, cadres et techniciens du laboratoire de biologie moléculaire du Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins.		
NOM et prénom du sujet : Date de naissance :	Source d'ADN :	
N° de dossier :	Date d'amplification : Date de réaction de séquence :	
Gène : <i>FUT2</i> Séquence de référence : NM_000511.5		
Technicien : Date de passage sur le séquenceur :	Séquence lue par : Date :	
POLYMORPHISMES FRÉQUENTS	COMMENTAIRES	
<u>Intron 1</u> c.-2-67G>C <input type="checkbox"/> G/G <input type="checkbox"/> G/C <input type="checkbox"/> C/C rs516316 c.-2-40C>T <input type="checkbox"/> C/C <input type="checkbox"/> C/T <input type="checkbox"/> T/T rs516246 <u>Exon 2</u> c.73A>G <input type="checkbox"/> A/A <input type="checkbox"/> A/G <input type="checkbox"/> G/G rs1800021 c.204A>G <input type="checkbox"/> A/A <input type="checkbox"/> A/G <input type="checkbox"/> G/G rs492602 c.249C>T <input type="checkbox"/> C/C <input type="checkbox"/> C/T <input type="checkbox"/> T/T rs681343 c.335C>T <input type="checkbox"/> C/C <input type="checkbox"/> C/T <input type="checkbox"/> T/T rs200157007 c.390C>T <input type="checkbox"/> C/C <input type="checkbox"/> C/T <input type="checkbox"/> T/T rs281377 c.418A>T <input type="checkbox"/> A/A <input type="checkbox"/> A/T <input type="checkbox"/> T/T rs1047781 <i>Statut sécréteur faible des asiatiques.</i> c.461G>A <input type="checkbox"/> G/G <input type="checkbox"/> G/A <input type="checkbox"/> A/A rs601338 <i>Statut non-sécréteur des caucasiens et africains.</i> c.513C>T <input type="checkbox"/> C/C <input type="checkbox"/> C/T <input type="checkbox"/> T/T rs1800027 c.514G>A <input type="checkbox"/> G/G <input type="checkbox"/> G/A <input type="checkbox"/> A/A rs1800025 c.772G>A <input type="checkbox"/> G/G <input type="checkbox"/> G/A <input type="checkbox"/> A/A rs602662 c.993A>G <input type="checkbox"/> A/A <input type="checkbox"/> A/G <input type="checkbox"/> G/G rs485186 <u>3' UTR</u> c.*10A>G <input type="checkbox"/> A/A <input type="checkbox"/> A/G <input type="checkbox"/> G/G rs485073 c.*12T>C <input type="checkbox"/> T/T <input type="checkbox"/> T/C <input type="checkbox"/> C/C rs603985 Autres variations :	Analyses complémentaires :	
RÉSULTAT : Site : Exon : Intron : Type : c. Conséquence : p. État hétérozygote <input type="checkbox"/> ou homogyne <input type="checkbox"/>		
Réservé au biologiste :	Analyse(s) complémentaire(s) à prévoir :	Date de compte-rendu :

Annexe 4 : Résultats du séquençage des gènes *FUT1* et *FUT2*

Identification	Sexe	Ethnie	Phénotype H initial	Phénotype Lewis	Séquence <i>FUT1</i>	Séquence <i>FUT2</i>	
689	DER.	M	EO	H:-1	LE:1,-2	Echec d'extraction d'ADN génomique.	nt
690	HOJ.	M	LR	H:-1	LE:1,-2	Frère de HOM. Sujet exclu.	nt
755	ANM.	F	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[725T>G];[(725T>G)] p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Absence d'amplification
921	HOM.	F	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)] p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
938	BEB.	F	AN	H:-1	LE:1,-2	c.[658C>T];[(c.658C>T)] p.[Arg220Cys];[(Arg220Cys)]	Allèle nul <i>FUT2</i> "caucasien" à l'état homozygote
952	MUY.	M	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)] p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
953	MAF.	F	AN	H:-1	LE:1,-2	Echec d'extraction d'ADN génomique.	nt
957	JUP.	M	EO	H:-1	LE:1,-2	c.[1A>C];[788dupA] p.[Met1?];[Asn263Lysfs]	Allèle nul <i>FUT2</i> "caucasien" à l'état homozygote
982	TUB.	F	EO	H:-1	LE:1,-2	c.[934T>G];[(934T>G)] p.[Phe312Val];[(Phe312Val)]	Allèle nul <i>FUT2</i> "caucasien" à l'état homozygote
983	SCT.	F	EO	H:-1	LE:1,-2	c.[1A>C];[(1A>C)] p.[Met1?];[(Met1?)]	Allèle nul <i>FUT2</i> "caucasien" à l'état homozygote
992	BOG.	F	EO	H:-1	LE:-1,2	c.[695G>A];[826C>T] p.[Trp232Ter];[Gln276Ter]	Un allèle <i>FUT2</i> fonctionnel sauvage et un allèle nul "caucasien"
1016	PAP.	M	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)] p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
1021	MAM.	F	LR	H:-1	nt	Soeur de MAB. Sujet exclu.	nt
1330	SEM.	F	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)] p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
1332	VAB.	M	EO	H:-1	LE:1,-2	c.[528T>A;695G>A];[528 p.[His176Gln;Trp232Ter];[(His176Gln;Trp232Ter)]	Allèle nul <i>FUT2</i> "caucasien" à l'état homozygote
1355	BEF.	M	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)] p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
1445	KAE	F	ASS	H:-1	LE:-1,-2	Allèle <i>FUT1</i> sauvage homozygote	nt
1451	TAT.	M	CA	H:-1	LE:-1,2	c.[881_882delTT];[(881_ p.[Phe294Cysfs];[(Phe294Cysfs)]	Allèles <i>FUT2</i> fonctionnels (avec SNP p.[Arg250Gln];[(Arg250Gln)])
1502	SUJ.	F	SL	H:-1	LE:1,-2	c.[725T>G];[(725T>G)] p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Absence d'amplification
1509	THJ.	F	LR	H:-1	LE:-1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)] p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
1611	SEJ.	F	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)] p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
1947	CHM.	F	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)] p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
2105	LEJ.	M	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(725T>G)] p.[His117Tyr];[Leu242Arg]	nt
2387	RAS.	M	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[725T>G];[(725T>G)] p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Absence d'amplification

Suite de l'annexe 4 :

2479	LAM.	F	IM	H:-1	LE:-1,-2	c.[725T>G];[(725T>G)]	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Absence d'amplification
2683	CHM.	F	NC	H:-1	LE:-1,2	c.[886delC];[(886delC)]	p.[Leu296Cysfs];[(Leu296Cysfs)]	Allèle <i>FUT2</i> sauvage à l'état homozygote
2714	FIM.	F	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
2758	COX.	F	IN	H:-1	LE:-1,-2	c.[725T>G];[(725T>G)]	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Absence d'amplification
2807	RIP.	F	LR	H:-1	LE:-1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
2891	BAA.	M	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[725T>G];[(725T>G)]	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Absence d'amplification
3184	SEM.	F	LR	H:-1	LE:-1,-2	<i>Soeur de ANM. Sujet exclu.</i>		nt
3335	UCC.	M	TQ	H:-1	LE:-1,2	c.[826C>T];[(826C>T)]	p.[Gln276Ter];[(Gln276Ter)]	Allèle <i>FUT2</i> sauvage à l'état homozygote
3374	TEL.	M	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
3375	DIJ.	M	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
3573	MOP.	M	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(725T>G)]	p.[His117Tyr];[Leu242Arg]	nt
3866	LOM.	F	CA	H:-1	LE:-1,2	<i>Echec d'extraction d'ADN génomique.</i>		nt
4281	SOK.	F	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[725T>G];[(725T>G)]	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Absence d'amplification
4679	MAH.	F	IN	H:-1	LE:-1,-2	c.[396_398del];[725T>G]	p.[Pro133del];[Leu242Arg]	Allèle <i>FUT2</i> sauvage à l'état <u>hémizy</u> gote
4957	UCE.	M	TQ	H:-1	LE:-1,2	<i>Frère de UCC. Sujet exclu.</i>		nt
4958	UCR.	M	TQ	H:-1	LE:-1,2	<i>Frère de UCC. Sujet exclu.</i>		nt
4959	JAG.	M	EO	H:-1	LE:1,-2	c.[776T>A];[(c.776T>A)]	p.[Val259Glu];[(p.Val259Glu)]	Allèle nul <i>FUT2</i> "caucasien" à l'état homozygote
5367	DID.	M	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
6077	ZEM.	F	AN	H:-1	LE:1,-2	c.[658C>T];[(c.658C>T)]	p.[Arg220Cys];[(Arg220Cys)]	Allèle nul <i>FUT2</i> "caucasien" à l'état homozygote
6832	LEE.	F	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
12304	DUM.	F	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
12704	ZAM.	F	LR	H:-1	LE:-1,2	c.[349C>T];[c.551_552delAG]	p.[His117Tyr];[Glu184Valfs]	Un allèle <i>FUT2</i> fonctionnel sauvage et un allèle nul "caucasien"
12928	BAR.	M	LR	H:-1	LE:1,-2	<i>Frère de BAA. Sujet exclu.</i>		nt
13007	MAB.	M	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(725T>G)]	p.[His117Tyr];[Leu242Arg]	nt
13709	ANR.	F	IN	H:-1	nt	c.[725T>G];[(725T>G)]	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Absence d'amplification
21338	FIS.	F	IN	H:-1	LE:1,-2	c.[725T>G];[(725T>G)]	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Absence d'amplification
22612	PEM.	F	CH	H:-1	LE:-1,2	c.[551_552delAG];[881_882delTT]	p.[Glu184Valfs];[Phe294Cysfs]	Allèles <i>FUT2</i> fonctionnels dont un avec SNP p.Arg250Gln
23008	PAR.	F	IN	H:-1	LE:1,-2	c.[725T>G];[(725T>G)]	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Absence d'amplification
23443	SAT.	F	Iran	H:-1	LE:1,-2	c.[422G>A];[(422G>A)]	p.[Trp141Ter];[(Trp141Ter)]	Allèle nul <i>FUT2</i> "caucasien" à l'état homozygote
23473	DIH.	M	ASS	H:-1	LE:1,-2	c.[966dupT];[(966dupT)]	p.[Val323Cysfs];[(Val323Cysfs)]	Allèle nul <i>FUT2</i> "caucasien" à l'état homozygote

Suite de l'annexe 4 :

24370	BOM.	F	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
26007	SOB.	M	CH	H:-1	LE:-1,2	<i>Frère de PEM. Sujet exclu.</i>		nt
26016	MEA.	F	EO	H:-1	LE:-1,2	c.[323G>T];[776T>A]	p.[Arg108Leu];[Val259Glu]	Un allèle <i>FUT2</i> fonctionnel sauvage et un allèle nul "caucasien"
29267	DED.	M	LR	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
29293	GAK.	F	IN	H:-1	LE:1,-2	c.[725T>G];[(725T>G)]	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Absence d'amplification
30389	SIV.	M	SL	H:-1	LE:1,-2	c.[725T>G];[(725T>G)]	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Absence d'amplification
30559	PIR.	M	EO	H:-1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
31847	NEK.	F	IN	H:-1	LE:1,-2	c.[725T>G];[(725T>G)]	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Absence d'amplification
732	MEF.	F	AN	H:W1	LE:-1,-2	c.[424C>T];[(c.424C>T)]	p.[Arg142Trp];[(Arg142Trp)]	Allèle nul <i>FUT2</i> "caucasien" à l'état homozygote
954	JOE.	M	EO	H:W1	LE:1,-2	c.[934T>G];[(934T>G)]	p.[Phe312Val];[(Phe312Val)]	Allèle nul <i>FUT2</i> "caucasien" à l'état homozygote
964	NOG.	F	NC	H:W1	LE:1,-2	<i>Echec d'extraction d'ADN génomique.</i>		nt
971	DOA.	F	EO	H:W1	LE:1,-2	c.[293C>T];[(293C>T)]	p.[Thr98Met];[(Thr98Met)]	Allèle nul <i>FUT2</i> "caucasien" à l'état homozygote
976	LER.	M	EO	H:W1	LE:-1,-2	Allèle <i>FUT1</i> sauvage homozygote		nt
977	LEA.	F	EO	H:W1	LE:-1,2	<i>Mère de LER. Sujet exclu.</i>		nt
1006	MAJ.	M	LR	H:W1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
1446	AZB.	F	NC	H:W1	LE:-1,2	Allèle <i>FUT1</i> sauvage homozygote		nt
2136	BOD.	M	ASS	H:W1	LE:-1,-2	Allèle <i>FUT1</i> sauvage homozygote		nt
2234	DAR.	F	AN	H:W1	LE:-1,2	Allèle <i>FUT1</i> sauvage homozygote		nt
2303	ELA.	F	AN	H:W1	LE:-1,-2	<i>Sœur de DAR. Sujet exclu.</i>		nt
2894	LEG.	F	LR	H:W1	LE:-1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
3574	GIC.	F	LR	H:W1	LE:-1,-2	<i>Sœur de FIM. Sujet exclu.</i>		nt
13827	CAS.	F	LR	H:W1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
20378	GUU.	M	TQ	H:W1	LE:-1,2	c.[826C>T];[(826C>T)]	p.[Gln276Ter];[(Gln276Ter)]	Allèle <i>FUT2</i> sauvage à l'état homozygote
21572	GUM.	F	LR	H:W1	LE:-1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
22663	HOM.	F	EO	H:W1	LE:1,-2	c.[528T>A;695G>A];[c.1022C>T]	p.[His176Gln;Trp232Ter];[p.Pro341Leu]	Allèle nul <i>FUT2</i> "caucasien" à l'état homozygote
23478	TAN.	F	TH	H:W1	LE:-1,-2	c.[328G>A];[658C>T]	p.[Ala110Thr];[Arg220Cys]	Allèle <i>FUT2</i> sauvage à l'état homozygote
23754	GOM	F	LR	H:W1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(725T>G)]	p.[His117Tyr];[Leu242Arg]	nt
25764	CAM.	F	LR	H:W1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(725T>G)]	p.[His117Tyr];[Leu242Arg]	nt
28375	CLP.	F	LR	H:W1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt
29481	ZAS.	M	LR	H:W1	LE:-1,2	<i>Frère de ZAM. Sujet exclu.</i>		nt
31389	RIC.	F	LR	H:W1	LE:1,-2	c.[349C>T];[(349C>T)]	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	nt

AN : Afrique du Nord ; ASS : Afrique sub-saharienne ; CA : Cambodge ; CH : Chine ; EO : Europe de l'Ouest ; IM : Île Maurice ; IN : Inde ; LR : La Réunion ; SL : Sri Lanka ; TH : Thaïlande ; TQ : Turquie ; NC : Non connu ; nt : Non testé.

Annexe 6 : Phénotype ABO des sujets séquencés pour *FUT1*

Identification	Phénotype H prédit après séquençage	Phénotype Lewis	Statut sécréteur prédit après séquençage	Phénotype ABO	Technique de mise en évidence du phénotype ABO
732 MEF.	H:W1	LE:-1,-2	Non sécréteur	O	EG
921 HOM.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	O	EG
952 MUY.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	B	ND
954 JOE.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	AB	FE, AS
957 JUP.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	O	FE
971 DOA.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	A	EG (1+), FE, AS
982 TUB.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	B	FE, AS
983 SCT.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	O	FE, AS
992 BOG.	H:W1	LE:-1,2	Sécréteur	A	FE (faible)
1006 MAJ.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	A	EG
1016 PAP.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	A	EG
1330 SEM.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	B	EG
1355 BEF.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	A	EG
1451 TAT.	H:W1	LE:-1,2	Sécréteur	A	FE
1509 THJ.	H:W1	LE:-1,-2	NT	A	EG, FE
1611 SEJ.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	B	ND
1947 CHM.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	O	FE
2105 LEJ.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	AB	EG
2683 CHM.	H:W1	LE:-1,2	Sécréteur	O	ND
2714 FIM.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	B	EG
2807 RIP.	H:W1	LE:-1,-2	NT	O	FE
2894 LEG.	H:W1	LE:-1,-2	NT	A	FE
3335 UCC.	H:W1	LE:-1,2	Sécréteur	B	BM, FE
3374 TEL.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	O	EG
3375 DIJ.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	A	EG
3573 MOP.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	O	EG
4679 MAH.	H:W1	LE:-1,-2	Sécréteur	O	EG
5367 DID.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	B	FE
6832 LEE.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	A	EG
12304 DUM.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	A	FE
12704 ZAM.	H:W1	LE:-1,2	Sécréteur	A	FE
13007 MAB.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	O	FE
13827 CAS.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	A	EG
20378 GUU.	H:W1	LE:-1,2	Sécréteur	A	FE (très faible)
21572 GUM.	H:W1	LE:-1,-2	NT	A	EG
22612 PEM.	H:W1	LE:-1,2	Sécréteur	AB	BM (FE négative)
22663 HOM.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	A	EG (4+)
23478 TAN.	H:W1	LE:-1,-2	Sécréteur	A	EG (2+)
23754 GOM.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	B	EG (2+)
24370 BOM.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	O	EG
25764 CAM.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	A	EG (1+), FE
26016 MEA.	H:W1	LE:-1,2	Sécréteur	O	FE
28375 CLP.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	A	EG
29267 DED.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	O	EG
30559 PIR.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	O	EG
31389 RIC.	H:W1	LE:1,-2	Non sécréteur	O	EG
976 LER.	H:1	LE:-1,-2	NT	A	EG
1445 KAE	H:1	LE:-1,-2	NT	B	EG
1446 AZB.	H:1	LE:-1,2	Sécréteur	B	EG
2136 BOD.	H:1	LE:-1,-2	NT	B	EG
2234 DAR.	H:1	LE:-1,2	Sécréteur	B	EG

Les sujets de phénotype prédit « Réunion » (*FUT1*:c.349C>T homozygote) sont indiqués en bleu.
AS : Activité sérique ; BM : Biologie moléculaire ; EG : Épreuve globulaire ; FE : Fixation-élution ;
ND : Non déterminé ; NT : Non testé.

Annexe 7 : Antécédents de RAI des sujets séquencés pour *FUT1*

Identification	Sexe	Phénotype H préité après séquencage	Phénotype ABO	Phénotype Lewis	Statut sécréteur préité après séquencage	RAI des dossiers immuno- hématologiques
755 ANM.	F	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 puissant
938 BEB.	F	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 faible +/- composante anti-H111
1332 VAB.	M	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1
1502 SUJ.	F	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 puissant
2387 RAS.	M	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 puissant
2479 LAM.	F	H:-1	NA	LE:-1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 puissant
2758 COX.	F	H:-1	NA	LE:-1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 puissant (et anti-LE2)
2891 BAA.	M	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 puissant
4281 SOK.	F	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 puissant (et anti-LE2)
4959 JAG.	M	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1
6077 ZEM.	F	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1
13709 ANR.	F	H:-1	NA	nt	Non sécréteur	Anti-H1 puissant
21338 FIS.	F	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 puissant (et anti-LE2)
23008 PAR.	F	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 puissant
23443 SAT.	F	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 faible +/- composante anti-H111
23473 DIH.	M	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1
29293 GAK.	F	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 puissant (et anti-LE2)
30389 SIV.	M	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 puissant
31847 NEK.	F	H:-1	NA	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 puissant (et anti-LE2)
732 MEF.	F	H:W1	O	LE:-1,-2	Non sécréteur	Négative
921 HOM.	F	H:W1	O	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 IgM (pan-agglutination 2-3+ en toute technique)
952 MUY.	M	H:W1	B	LE:1,-2	Non sécréteur	ND
954 JOE.	M	H:W1	AB	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H111 faible
957 JUP.	M	H:W1	O	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 (pan-agglutination 3+ en toute technique)
971 DOA.	F	H:W1	A	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 faible
982 TUB.	F	H:W1	B	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H111 faible
983 SCT.	F	H:W1	O	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 faible
992 BOG.	F	H:W1	A	LE:-1,2	Sécréteur	Anti-H1 ou anti-H111 très faible
1006 MAJ.	M	H:W1	A	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 très faible
1016 PAP.	M	H:W1	A	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 faible +/- composante anti-H111
1330 SEM.	F	H:W1	B	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 ou anti-H111 faible
1355 BEF.	M	H:W1	A	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 (pan-agglutination 4+ en toute technique)
1451 TAT.	M	H:W1	A	LE:-1,2	Sécréteur	Anti-H1 ou anti-H111 faible
1509 THJ.	F	H:W1	A	LE:-1,-2	NT	Anti-H1 faible
1611 SEJ.	F	H:W1	B	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 (pan-agglutination 3+ en toute technique)
1947 CHM.	F	H:W1	O	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 ou anti-H111 faible, probable IgM
2105 LEJ.	M	H:W1	AB	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 (pan-agglutination 3+ en toute technique)
2683 CHM.	F	H:W1	O	LE:-1,2	Sécréteur	ND
2714 FIM.	F	H:W1	B	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1, probable IgM
2807 RIP.	F	H:W1	O	LE:-1,-2	NT	Anti-H1 (pan-agglutination 2+ en toute technique)

Suite de l'annexe 7 :

2894	LEG.	F	H:W1	A	LE:-1,-2	NT	Négative (mais pas de TIA sur gel poly)
3335	UCC.	M	H:W1	B	LE:-1,2	Sécréteur	Anti-H111 faible
3374	TEL.	M	H:W1	O	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 faible, probable IgM
3375	DIJ.	M	H:W1	A	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 faible
3573	MOP.	M	H:W1	O	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1, probable IgM
4679	MAH.	F	H:W1	O	LE:-1,-2	Sécréteur	Anti-H1
5367	DID.	M	H:W1	B	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 très faible
6832	LEE.	F	H:W1	A	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1, probable IgM
12304	DUM.	F	H:W1	A	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 faible
12704	ZAM.	F	H:W1	A	LE:-1,2	Sécréteur	Anti-H1 ou anti-H111 très faible, ou RAI
13007	MAB.	M	H:W1	O	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 ou anti-H111 faible, probable IgM
13827	CAS.	F	H:W1	A	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 ou anti-H111 faible, probable IgM
20378	GUU.	F	H:W1	A	LE:-1,2	Sécréteur	Anti-H1 ou anti-H111 très faible
21572	GUM.	F	H:W1	A	LE:-1,-2	NT	Anti-H1, probable IgM
22612	PEM.	F	H:W1	AB	LE:-1,2	Sécréteur	Anti-H111 faible
22663	HOM.	F	H:W1	A	LE:1,-2	Non sécréteur	Négative
23478	TAN.	F	H:W1	A	LE:-1,-2	Sécréteur	Anti-H1, IgM
23754	GOM	F	H:W1	B	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1, IgM
24370	BOM.	F	H:W1	O	LE:1,-2	Non sécréteur	Négative
25764	CAM.	F	H:W1	A	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 (pan-agglutination 3+ en toute technique)
26016	MEA.	F	H:W1	O	LE:-1,2	Sécréteur	Négative
28375	CLP.	F	H:W1	A	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1, probable IgM
29267	DED.	M	H:W1	O	LE:1,-2	Non sécréteur	Négative
30559	PIR.	M	H:W1	O	LE:1,-2	Non sécréteur	Anti-H1 (pan-agglutination 3+ en toute technique)
31389	RIC.	F	H:W1	O	LE:1,-2	Non sécréteur	Négative
976	LER.	M	H:1	A	LE:-1,-2	NT	Négative
1445	KAE	F	H:1	B	LE:-1,-2	NT	Anti-H1 ou anti-H111 faible
1446	AZB.	F	H:1	B	LE:-1,2	Sécréteur	Anti-H111
2136	BOD.	M	H:1	B	LE:-1,-2	NT	Anti-H111
2234	DAR.	F	H:1	B	LE:-1,2	Sécréteur	Négative

Les sujets de phénotype « Réunion » (*FUT1:c.349C>T* homozygote) sont indiqués en bleu.

Les sujets de phénotype « Bombay » (*FUT1:c.725T>G* homozygote) sont indiqués en vert.

NA : non applicable ; NT : non testé.

Annexe 8 : Résultats de l'étude de l'expression d'antigène H

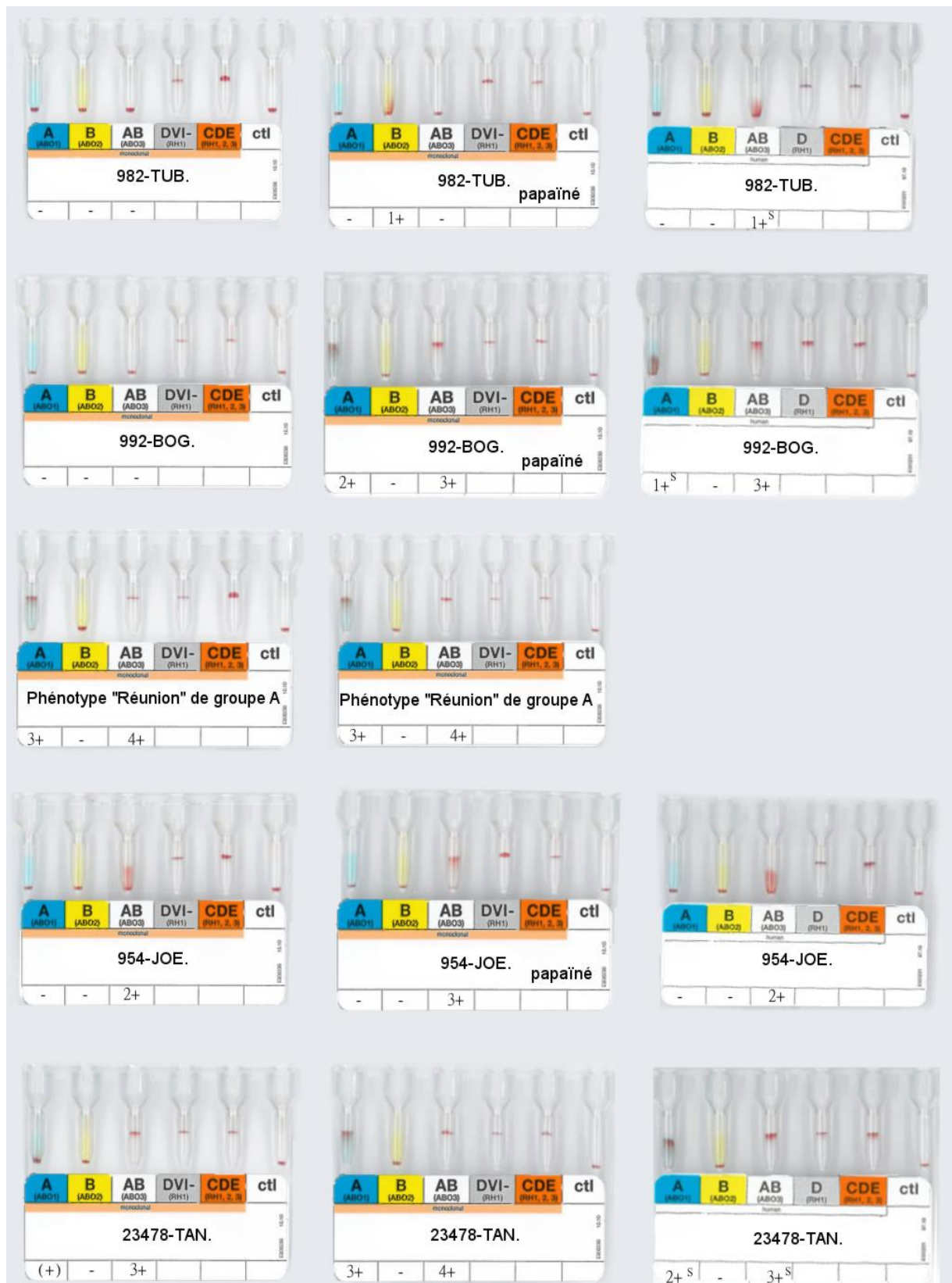
Échantillons	Phénotype ABO	Phénotype Lewis	Séquence FUT1	Enzyme FUT1 (H)		Statut sécréteur prédit après séquençage	Phénotype H prédit après séquençage	Plasma issu de 2387-RAS.		Plasma issu de 2479-LAM.		Plasma issu de 3184-SEM.	
				Version allèle 1	Version allèle 2			Hématies natives	Hématies papainées	Hématies natives	Hématies papainées	Hématies natives	Hématies papainées
Hématie témoin O; LE:1,-2	O	LE:1,-2	RAS	Fonctionnelle		Non sécréteur	H:1	256 (88)	NT	≥ 2048 (≥ 111)	NT	≥ 2048 (≥ 125)	NT
938-BEB. (témoin négatif)	NA	LE:1,-2	p.[Arg220Cys];[(Arg220Cys)]	Inactive		Non sécréteur	H:-1	Négatif	NT	Négatif	Négatif	Négatif	NT
1332-VAB. (témoin négatif)	NA	LE:1,-2	p.[His176Gln;Trp232Ter];[(His176Gln;Trp232Ter)]	Inactive		Non sécréteur	H:-1	Négatif	NT	Négatif	Négatif	Négatif	NT
4959-JAG. (témoin négatif)	NA	LE:1,-2	p.[Val259Glu];[(p.Val259Glu)]	Inactive		Non sécréteur	H:-1	Négatif	NT	Négatif	Négatif	Négatif	NT
Sujet "Réunion", de groupe O	O	LE:1,-2	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Partiellement active		Non sécréteur	H:W1	NT	64 (64)	256 (82)	≥ 512 (≥ 98)	32 (54)	32 (NT)
Sujet "Réunion" demi dose, de groupe O	O	LE:1,-2	p.[His117Tyr];[Leu242Arg]	Partiellement active	Inactive	Non sécréteur	H:W1	NT	16 (44)	≥ 16 (≥ 40)	NT	4 (19)	NT
983-SCT.	O	LE:1,-2	p.[Met1?];[(Met1?)]	Mutation faux-sens de signification inconnue		Non sécréteur	H:W1	NT	NT	16 (41)	NT	4 (22)	8 (38)
957-JUP.	O	LE:1,-2	p.[Met1?];[p.Asn263Lysfs]	Mutation faux-sens de signification inconnue	Inactive	Non sécréteur	H:W1	0 (2)	1 (8)	2 (15)	≥ 4 (≥ 27)	0 (2)	2 (13)
2683-CHM.	O	LE:-1,2	p.[Leu296Cysfs];[(Leu296Cysfs)]	Inactive		Sécréteur (homozygote)	H:W1	Négatif	4 (23)	1 (7)	≥ 8 (NT)	2 (11)	NT
4679-MAH.	O	LE:-1,-2	p.[Pro133del];[Leu242Arg]	Mutation faux-sens de signification inconnue	Inactive	Sécréteur (hémizygote)	H:W1	≥ 1 (≥ 5)	4 (27)	1 (8)	≥ 8 (NT)	0 (2)	≥ 16 (≥ 45)
26016-MEA.	O	LE:-1,2	p.[Arg108Leu];[Val259Glu]	Mutation faux-sens de signification inconnue	Inactive	Sécréteur (hétérozygote)	H:W1	Négatif	2 (17)	1 (5)	NT	1 (7)	≥ 4 (≥ 30)

Suite de l'annexe 8 :

Échantillons	Phénotype ABO	Phénotype Lewis	Séquence <i>FUT1</i>	Enzyme <i>FUT1</i> (H)		Statut sécréteur prédit après séquençage	Phénotype H prédit après séquençage	Plasma issu de 2387-RAS.		Plasma issu de 2479-LAM.		Plasma issu de 3184-SEM.	
				Version allèle 1	Version allèle 2			Hématies natives	Hématies papainées	Hématies natives	Hématies papainées	Hématies natives	Hématies papainées
954-JOE.	AB	LE:1,-2	p.[Phe312Val];[(Phe312Val)]	Mutation faux-sens de signification inconnue		Non sécréteur	H:W1	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	0 (2)	≥ 1 (≥ 8)
982-TUB.	B	LE:1,-2	p.[Phe312Val];[(Phe312Val)]	Mutation faux-sens de signification inconnue		Non sécréteur	H:W1	Négatif	NT	Négatif	NT	Négatif	Négatif
992-BOG.	A	LE:-1,2	p.[Trp232Ter];[Gln276Ter]	Inactive		Sécréteur (hétérozygote)	H:W1	Négatif	2 (14)	Négatif	2 (10)	Négatif	NT
1451-TAT.	A	LE:-1,2	p.[Phe294Cysfs];[(Phe294Cysfs)]	Inactive		Sécréteur (homozygote)	H:W1	Négatif	NT	Négatif	≥ 1 (≥ 8)	NT	NT
3335-UCC.	B	LE:-1,2	p.[Gln276Ter];[(Gln276Ter)]	Inactive		Sécréteur (homozygote)	H:W1	Négatif	4 (25)	Négatif	≥ 1 (≥ 8)	Négatif	NT
20378-GUU	A	LE:-1,2	p.[Gln276Ter];[(Gln276Ter)]	Inactive		Sécréteur (homozygote)	H:W1	Négatif	NT	Négatif	NT	NT	NT
22612-PEM.	AB	LE:-1,2	p.[Glu184Valfs];[Phe294Cysfs]	Inactive		Sécréteur (homozygote)	H:W1	Négatif	4 (30)	Négatif	NT	2 (15)	NT
23478-TAN.	A	LE:-1,-2	p.[Ala110Thr];[Arg220Cys]	Décrite comme partiellement active	Inactive	Sécréteur (homozygote)	H:W1	Négatif	2 (11)	Négatif	NT	NT	NT
12704-ZAM.	A	LE:-1,2	p.[His117Tyr];[Glu184Valfs]	Partiellement active	Inactive	Sécréteur (hétérozygote)	H:W1	Négatif	NT	≥ 2 (≥ 17)	NT	NT	NT

Les mutations nouvellement décrites sont indiquées en rouge. La seconde partie du tableau concerne les sujets H-déficients non-O.
NA : Non applicable ; NT : Non testé.

Annexe 9 : Photographies des cassettes de microfiltration ABO



Suite de l'annexe 9 :



Annexe 10 : Récapitulatif final pour les échantillons séquencés

Identifiant	Origine	Séquence <i>FUT1</i>	Enzyme <i>FUT1</i> (H)	Statut sécréteur prédit	Phéno type H prédit	Phéno type ABO	Données rétrospectives de RAI
GROUPE 1 : échantillons de phénotype "Bombay" : H:-1 (non sécréteurs) présentant la mutation indienne de <i>FUT1:c.725T>G</i> à l'état homozygote associée à une délétion du gène <i>FUT2</i> (n = 13)							
Ces sujets n'expriment pas du tout de substance H. Ils possèdent en outre un anti-H1 puissant, de titre élevé, capable d'agglutiner en TIA les hématies de phénotype "Réunion". Un anti-LE2 semble fréquemment associé.							
755 ANM.	La Réunion	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 puissant
1502 SUJ.	Sri Lanka	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 puissant
2387 RAS.	La Réunion (Tamoul)	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 puissant
2479 LAM.	Île Maurice	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 puissant
2758 COX.	Inde	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 puissant (et anti-LE2)
2891 BAA.	La Réunion	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 puissant
4281 SOK.	La Réunion (Tamoul)	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 puissant (et anti-LE2)
13709 ANR.	Inde	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 puissant
21338 FIS.	Inde	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 puissant (et anti-LE2)
23008 PAR.	Inde	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 puissant
29293 GAK.	Inde	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 puissant (et anti-LE2)
30389 SV.	Sri Lanka	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 puissant
31847 NEK.	Inde	p.[Leu242Arg];[(Leu242Arg)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 puissant (et anti-LE2)

GROUPE 2 : échantillons H:-1 (non sécréteurs) présentant des haplotypes <i>FUT1</i> / <i>FUT2</i> nuis différents des "vrais Bombay" (n = 6)							
Ces sujets sans origine indienne présentent un phénotype H:-1 identique aux "vrais Bombay" (mais mutations différentes). Un anti-H1 est présent dans leur sérum, mais il est étonnamment beaucoup moins puissant que celui des "vrais Bombay" et n'agglutine pas les hématies de phénotype "Réunion" en TIA.							
938 BEB.	Afrique du Nord	p.[Arg220Cys];[(Arg220Cys)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 faible +/- composante anti-H111
1332 VAB.	Europe de l'Ouest	p.[His176Gln;Trp232Ter];[(His176Gln;Trp232Ter)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1
4959 JAG.	Europe de l'Ouest	p.[Val259Glu];[(p.Val259Glu)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1
6077 ZEM.	Afrique du Nord	p.[Arg220Cys];[(Arg220Cys)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1
23443 SAT.	Iran	p.[Trp141Ter];[(Trp141Ter)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1 faible +/- composante anti-H111
23473 DIH.	Afrique subsaharienne	p.[Val323Cysfs];[(Val323Cysfs)]	Inactive	Non sécréteur	H:-1	NA	Anti-H1

Identifiant	Origine	Séquence FUT1	Enzyme FUT1 (H)	Statut sécréteur prédit	Phéno type H prédit	Phéno type ABO	Données rétrospectives de RAI	
GROUPE 3 : échantillons de phénotype "Réunion" : H:W1, non sécréteurs, présentant la mutation de foyer réunionnais de FUT1:c.349C>T à l'état homozygote associée à l'allèle FUT2 nul "caucasien" (n = 24)								
Ces sujets expriment une quantité diminuée de substance H du fait d'une enzyme FUT1 altérée. Néanmoins, cette quantité de substance H est relativement élevée par rapport aux autres sujets H-déficients. Leurs antigènes ABO sont souvent bien exprimés et détectables en épreuve globulaire. Généralement, l'anti-H1 de ces sujets n'est pas puissant et n'agglutine jamais en TIA les hématies H:W1.								
921	HOM.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	O	Anti-H1 IgM (pan-agglutination 2-3+ en toute technique)
952	MUY.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	B	ND
1006	MAJ.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	A	Anti-H1 très faible
1016	PAP.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	A	Anti-H1 faible +/- composante anti-H11
1330	SEM.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	B	Anti-H1 ou anti-H111 faible
1355	BEF.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	A	Anti-H1 (pan-agglutination 4+ en toute technique)
1509	THJ.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	A	Anti-H1 faible
1611	SEJ.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	B	Anti-H1 (pan-agglutination 3+ en toute technique)
1947	CHM.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	O	Anti-H1 ou anti-H111 faible, probable IgM
2714	FIM.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	B	Anti-H1, probable IgM
2807	RIP.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	O	Anti-H1 (pan-agglutination 2+ en toute technique)
2894	LEG.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	A	Négative (mais pas de TIA sur gel poly)
3374	TEL.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	O	Anti-H1 faible, probable IgM
3375	DJ.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	A	Anti-H1 faible
5367	DID.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	B	Anti-H1 très faible
6832	LEE.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	A	Anti-H1, probable IgM
12304	DUM.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	A	Anti-H1 faible
13827	CAS.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	A	Anti-H1 ou anti-H111 faible, probable IgM
21572	GUM.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	A	Anti-H1, probable IgM
24370	BOM.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	O	Négative
28375	CLP.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	A	Anti-H1, probable IgM
29267	DED.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	O	Négative
30559	PIR.	Europe de l'Ouest	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	O	Anti-H1 (pan-agglutination 3+ en toute technique)
31389	RIC.	La Réunion	p.[His117Tyr];[(His117Tyr)]	Affaiblissement modéré de l'activité	Non sécréteur	H:W1	O	Négative

Suite de l'annexe 10 :

Identifiant	Origine	Séquence <i>FUT1</i>	Enzyme <i>FUT1</i> (H)		Statut sécréteur prédit	Phéno type H prédit	Phéno type ABO	Données rétrospectives de RAI
GROUPE 4 : échantillons H:W1, non-sécréteurs, présentant un haplotype "Bombay" (inactivation de <i>FUT1</i>, délétion de <i>FUT2</i>) et un haplotype "Réunion" (diminution de l'activité de <i>FUT1</i>, inactivation de <i>FUT2</i>) (n = 5)								
Ces sujets expriment une quantité de substance H moins importante que les sujets de phénotype "Réunion" car ils possèdent un seul allèle altéré de <i>FUT1</i> (effet-dose). Leur anti-H1 semble similaire à celui des sujets de phénotype "Réunion".								
2105 LEJ.	La Réunion	p.[His117Tyr];[Leu242Arg]	Affaiblissement modéré de l'activité	Inactive	Non sécréteur	H:W1	AB	Anti-H1 (pan-agglutination 3+ en toute technique)
3573 MOP.	La Réunion	p.[His117Tyr];[Leu242Arg]	Affaiblissement modéré de l'activité	Inactive	Non sécréteur	H:W1	O	Anti-H1, probable IgM
13007 MAB.	La Réunion	p.[His117Tyr];[Leu242Arg]	Affaiblissement modéré de l'activité	Inactive	Non sécréteur	H:W1	O	Anti-H1 ou anti-H111 faible, probable IgM
23754 GOM.	La Réunion	p.[His117Tyr];[Leu242Arg]	Affaiblissement modéré de l'activité	Inactive	Non sécréteur	H:W1	B	Anti-H1, IgM
25764 CAM.	La Réunion	p.[His117Tyr];[Leu242Arg]	Affaiblissement modéré de l'activité	Inactive	Non sécréteur	H:W1	A	Anti-H1 (pan-agglutination 3+ en toute technique)

GROUPE 5 : échantillons H:W1, non sécréteurs, présentant au moins un allèle <i>FUT1</i> faiblement fonctionnel différent de l'allèle "Réunion", associé à la mutation non-sens caucasienne de <i>FUT2</i> à l'état homozygote (n = 7)								
Ces sujets sans origine réunionnaise présentent une expression plus ou moins affaiblie de l'antigène H, en fonction de l'importance de l'altération de la protéine <i>FUT1</i> (groupe hétérogène avec diverses mutations). Ils ne produisent pas de H par <i>FUT2</i> , étant non sécréteurs. Leur plasma contient souvent un anticorps peu puissant, à la limite entre l'anti-H1 et l'anti-H111.								
732 MEF.	Afrique du Nord	p.[Arg142Trp];[(Arg142Trp)]	Affaiblissement très mineur de l'activité		Non sécréteur	H:W1	O	Négative
22663 HOM.	Europe de l'Ouest	p.[His176Gln;Trp232Ter];[p.Pro341Leu]	Inactive	Affaiblissement très mineur de l'activité	Non sécréteur	H:W1	A	Négative
971 DOA.	Europe de l'Ouest	p.[Thr98Met];[(Thr98Met)]	Affaiblissement modéré de l'activité		Non sécréteur	H:W1	A	Anti-H1 faible
983 SCT.	Europe de l'Ouest	p.[Met1?];[(Met1?)]	Affaiblissement modéré de l'activité		Non sécréteur	H:W1	O	Anti-H1 faible
954 JOE.	Europe de l'Ouest	p.[Phe312Val];[(Phe312Val)]	Affaiblissement important de l'activité		Non sécréteur	H:W1	AB	Anti-H111 faible
957 JUP.	Europe de l'Ouest	p.[Met1?];[p.Asn263Lysfs]	Affaiblissement modéré de l'activité	Inactive	Non sécréteur	H:W1	O	Anti-H1 (pan-agglutination 3+ en toute technique)
982 TUB.	Europe de l'Ouest	p.[Phe312Val];[(Phe312Val)]	Affaiblissement important de l'activité		Non sécréteur	H:W1	B	Anti-H111 faible

Suite de l'annexe 10 :

Identifiant	Origine	Séquence <i>FUT1</i>	Enzyme <i>FUT1</i> (H)		Statut sécréteur prédit	Phénotype H prédit	Phénotype ABO	Données rétrospectives de RAI
GROUPE 6 : échantillons H:W1 ne possédant pas d'enzyme <i>FUT1</i> (allèles <i>FUT1</i> nuls) mais de phénotype sécréteur (au moins un allèle fonctionnel de <i>FUT2</i>) (n = 6)								
Ces sujets expriment au niveau de leurs hématies une quantité extrêmement réduite de substance H, d'origine tissulaire (enzyme <i>FUT2</i>), adsorbée depuis le plasma. Si ces sujets possèdent une enzyme A ou B alors la quantité de H est encore plus réduite, à la limite de la détectabilité même dans les techniques les plus sensibles. Ils présentent donc un phénotype H:W1 mais d'expression extrêmement faible. L'anticorps naturel associé à ce phénotype semble être un anti-H111 peu puissant.								
992 BOG.	Europe de l'Ouest	p.[Trp232Ter];[Gln276Ter]	Inactive	Inactive	Sécréteur	H:W1	A	Anti-H1 ou anti-H111 très faible
1451 TAT.	Cambodge	p.[Phe294Cysfs];[(Phe294Cysfs)]	Inactive		Sécréteur	H:W1	A	Anti-H1 ou anti-H111 faible
2683 CHM.	<i>inconnu</i>	p.[Leu296Cysfs];[(Leu296Cysfs)]	Inactive		Sécréteur	H:W1	O	ND
3335 UCC.	Turquie	p.[Gln276Ter];[(Gln276Ter)]	Inactive		Sécréteur	H:W1	B	Anti-H111 faible
20378 GUU.	Turquie	p.[Gln276Ter];[(Gln276Ter)]	Inactive		Sécréteur	H:W1	A	Anti-H1 ou anti-H111 très faible
22612 PEM.	Chine	p.[Glu184Valfs];[Phe294Cysfs]	Inactive	Inactive	Sécréteur	H:W1	AB	Anti-H111 faible

GROUPE 7 : échantillons de statut sécréteur, donc H:W1, mais dont au moins un allèle <i>FUT1</i> est de fonctionnalité inconnue (n = 3)								
Ces sujets possèdent au moins un allèle <i>FUT2</i> fonctionnel (sujets sécréteurs) entraînant l'expression faible de substance H adsorbée sur la paroi des hématies. On ne peut donc pas déduire la fonctionnalité des allèles <i>FUT1</i> associés qui n'ont pas bénéficié d'études fonctionnelles dans la littérature. De plus, les allèles <i>FUT1</i> associés présentent des degrés de fonctionnalité divers entraînant des phénotypes hétérogènes. L'anti-H de ces sujets n'est donc pas systématisable mais ces sujets étant sécréteurs, un anticorps anti-H111 peu puissant est attendu.								
4679 MAH.	Inde	p.[Pro133del];[Leu242Arg]	Fonctionnalité inconnue mais probablement faible	Inactive	Sécréteur	H:W1	O	Anti-H1
23478 TAN.	Thaïlande	p.[Ala110Thr];[Arg220Cys]	Fonctionnalité inconnue mais probablement faible	Inactive	Sécréteur	H:W1	A	Anti-H1, IgM
26016 MEA.	Europe de l'Ouest	p.[Arg108Leu];[Val259Glu]	Fonctionnalité inconnue mais probablement faible	Inactive	Sécréteur	H:W1	O	Négative

Suite et fin de l'annexe 10 :

Identifiant	Origine	Séquence <i>FUT1</i>	Enzyme <i>FUT1</i> (H)	Statut sécréteur prédit	Phéno type H prédit	Phénot ype ABO	Données rétrospectives de RAI
GROUPE 8 : échantillon H:W1, sécréteur, présentant un haplotype <i>FUT1</i> "Reunion" et un haplotype <i>FUT1</i> nul / <i>FUT2</i> fonctionnel							
Ce sujet exprime une quantité de substance H moins importante que les sujets de phénotype "Réunion" car il possède un seul allèle altéré de <i>FUT1</i> (effet-dose). Par rapport aux sujets d'haplotypes mixtes "Bombay" / "Réunion", il présente en plus un allèle <i>FUT2</i> fonctionnel (statut sécréteur).							
12704 ZAM.	La Réunion	p.[His117Tyr];[Glu184Valfs]	Affaiblissement modéré de l'activité	Inactive	Sécréteur	H:W1	A Anti-H1 ou anti-H111 très faible, ou RAI négative
GROUPE 9 : échantillons sans anomalie de la séquence codante du gène <i>FUT1</i> (n = 5)							
Sujets classés H-déficients il y a plusieurs dizaines d'années, probablement après avoir été testés avec des réactifs anti-H de faible sensibilité. Parmi eux, 4 sont de groupe B d'origine africaine. Hypothèse d'une enzyme B convertissant particulièrement efficacement la substance H ? Un anti-H111 était ici associé pour les sujets B.							
976 LER.	Europe de l'Ouest	<i>Wild type / Wild type</i>	Fonctionnelle	NT	H:1	A	Négative
1445 KAE	Afrique sub-saharienne	<i>Wild type / Wild type</i>	Fonctionnelle	NT	H:1	B	Anti-H1 ou anti-H111 faible
1446 AZB.	<i>inconnu</i>	<i>Wild type / Wild type</i>	Fonctionnelle	Sécréteur	H:1	B	Anti-H111
2136 BOD.	Afrique sub-saharienne	<i>Wild type / Wild type</i>	Fonctionnelle	NT	H:1	B	Anti-H111
2234 DAR.	Afrique du Nord	<i>Wild type / Wild type</i>	Fonctionnelle	Sécréteur	H:1	B	Négative

Les mutations non référencées par l'ISBT sont indiquées en rouge.
 NA : Non applicable ; ND : Non déterminé ; NT : Non testé

AUTEUR – Nom : LETIZIA

Prénom : Guillaume

Date de Soutenance : Lundi 12 octobre 2015

Titre de la Thèse :

Mise au point du séquençage des gènes *FUT1* et *FUT2* et applications
au Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins :

*Étude de 70 échantillons H-déficients ou "Bombay" référencés dans le registre national des
sujets présentant un phénotype érythrocytaire rare*

Thèse - Médecine - Lille 2015

Cadre de classement : Immuno-hématologie

DES + spécialité : Biologie Médicale – Spécialité : Hématologie.

Mots-clés : transfusion, groupe sanguin rare, H-déficient, Bombay, FUT1, FUT2, H1, sécréteur, CNRGS

Contexte. La transfusion des sujets de phénotype érythrocytaire « Bombay » ou « H-déficient » est rendue difficile par leur rareté et par la présence d'un anticorps naturel régulier anti-H1. Le Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins (CNRGS) a pour mission de participer à la prise en charge des cas de phénotypes sanguins rares qui représentent par leur nombre cumulé un enjeu de santé publique. L'objectif de ce travail était d'étudier génétiquement une cohorte de sujets de phénotype H-déficient référencés dans le registre national pour améliorer leur prise en charge et celle des futurs patients référés au CNRGS.

Méthodes. Mise au point du séquençage des gènes *FUT1* et *FUT2* pour recherche des mutations causant le phénotype H-déficient dans la cohorte. Étude secondaire sérologique chez les sujets de génotype considéré d'intérêt par utilisation de réactifs humains anti-H et de cartes gel-microfiltration ABO, sur hématies natives et traitées par les enzymes. Reclassement du phénotype H des sujets référencés et des concentrés de globules rouges (CGR) congelés à la Banque Nationale de Sang de Phénotype Rare (BNSPR).

Résultats. Soixante-dix échantillons H-déficients ont été séquencés pour *FUT1* parmi les 85 inclus. Des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites expliquant le phénotype ont été retrouvées chez 65 d'entre eux. Neuf de ces mutations n'étaient pas référencées par la Société Internationale de Transfusion Sanguine (ISBT). Ces données ont entraîné le reclassement de phénotypes initialement H:-1 en H:W1 pour 32 sujets du registre national. Parmi eux se trouvaient 15 donneurs actifs totalisant 61 CGR à la BNSPR, diminuant le stock d'unités congelées considérées H:-1 de 88 à 27 tout en augmentant d'un autre côté la sécurité transfusionnelle pour les receveurs H-déficients.

Conclusion. Le CNRGS assure la sécurité transfusionnelle des sujets présentant un phénotype érythrocytaire rare. Grâce à cette étude, la prise en charge diagnostique et transfusionnelle des sujets de phénotype exceptionnel H-déficient a été améliorée. De nouvelles bases moléculaires pour ce phénotype ont également été mises en évidence.

Composition du Jury :

Président : Pr. Sophie SUSEN

Asseseurs : Pr. Jacques CHIARONI, Dr. Julie LECLERC, Dr. Odile FONTAINE

Directeur de thèse : Dr. Thierry PEYRARD