

## Research



# Caractérisation moléculaire du gène RHD chez les donneurs de sang présentant le phénotype Rh DEL au Centre National de Transfusion Sanguine de Bamako au Mali

Ramatoulaye Diallo, Dramane Diallo,  Amadou Kone,  Tenin Aminatou Coulibaly, Moussa Cissé,  Djarakidja Traore, Sekou Oumar Coulibaly, Daouda Keita, Fatoumata Ouologuem, Zeinabou Samaké, Emmanuel Souraley Kouame, Hamala Coulibaly, Alhassane Ba,  Boubacar Maiga

**Corresponding author:** Boubacar Maiga, Centre National de Transfusion Sanguine, Bamako, Mali. [bmaiga@icermali.org](mailto:bmaiga@icermali.org)

**Received:** 17 Jul 2023 - **Accepted:** 05 Nov 2023 - **Published:** 13 Dec 2023

**Keywords:** Allèle RHD, phénotype DEL, donneurs de sang, adsorption-élution, PCR-SSP, Centre National de Transfusion Sanguine, Mali

**Copyright:** Ramatoulaye Diallo et al. PAMJ - One Health (ISSN: 2707-2800). This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution International 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Cite this article:** Ramatoulaye Diallo et al. Caractérisation moléculaire du gène RHD chez les donneurs de sang présentant le phénotype Rh DEL au Centre National de Transfusion Sanguine de Bamako au Mali. PAMJ - One Health. 2023;12(18). 10.11604/pamj-oh.2023.12.18.41111

**Available online at:** <https://www.one-health.panafrican-med-journal.com/content/article/12/18/full>

## Caractérisation moléculaire du gène RHD chez les donneurs de sang présentant le phénotype Rh DEL au Centre National de Transfusion Sanguine de Bamako au Mali

Molecular characterisation of the RHD gene in blood donors with Rh-DEL phenotype at the National Blood Transfusion Centre in Bamako, Mali

Ramatoulaye Diallo<sup>1,2,3</sup>, Dramane Diallo<sup>2,3</sup>, Amadou Kone<sup>2,3</sup>, Tenin Aminatou Coulibaly<sup>2,3</sup>, Moussa Cissé<sup>1</sup>, Djarakidja Traore<sup>1</sup>, Sekou Oumar Coulibaly<sup>1</sup>, Daouda Keita<sup>2</sup>, Fatoumata Ouologuem<sup>1</sup>, Zeinabou Samaké<sup>2</sup>, Emmanuel Souraley Kouame<sup>2</sup>, Hamala Coulibaly<sup>1</sup>, Alhassane Ba<sup>1</sup>, Boubacar Maiga<sup>3,&</sup>

<sup>1</sup>Centre National de Transfusion Sanguine, Bamako, Mali, <sup>2</sup>Centre Universitaire de Recherche Clinique, Bamako, Mali, <sup>3</sup>Université des Sciences Techniques et Technologies, Bamako, Mali

## \*Auteur correspondant

Boubacar Maiga, Centre National de Transfusion Sanguine, Bamako, Mali

## Résumé

**Introduction:** le Rh DEL est un variant rare du système RH qui s'exprime très faiblement à la surface des hématies. La fréquence du Rh DEL est méconnue au Mali. L'objectif de cette étude était de caractériser le gène RHD par PCR classique et vérifier la présence de l'allèle RHD 1227A chez les donneurs de sang présentant le phénotype DEL au Centre National de Transfusion sanguine de Bamako. **Méthodes:** après une confirmation du Rh DEL par adsorption/élution, l'ADN des participants a été isolé et amplifié par PCR classique en utilisant des amorces spécifiques au gène RHD et l'allèle RHD 1227A. Le logiciel SPSS version 26 a été utilisé pour l'analyse des données. **Résultats:** un total de 365 donneurs de sang RhD négatif du CNTS de Bamako, ont été recrutés dans cette étude. Le sexe masculin était plus fréquent avec 90,4%; la tranche d'âge 26-39 ans était la plus représentée avec une fréquence de 52,9%. La fréquence du phénotype Rh DEL était de 7,1% et le groupe sanguin O était le plus représenté avec 38,6% dans l'ensemble de la population. Le phénotype Ccee représentait 61,5% des phénotypes DEL. La PCR-SSP a montré une amplification des 10 exons du gène RHD avec la présence de l'haplotype (C). L'allèle RHD 1227A était présent chez tous les échantillons Rh DEL. **Conclusion:** le Rh DEL des donneurs de sang au Mali présente l'allèle RHD1227A avec un gène RHD intact.

## English abstract

**Introduction:** DEL phenotype is a rare Rh variant characterized by a very low level of D antigen expression at the surface of red blood cells. The frequency of RH DEL is unknown in Mali. The purpose of this study was to characterize the RHD gene using conventional PCR and to verify the presence of the RHD 1227A allele in blood donors with the DEL phenotype at the National blood transfusion Center in Bamako. **Methods:** after detection of the Rh DEL by adsorption-elution technique, DNA was isolated and amplified by conventional PCR using primers specific for the RHD gene and the RHD 1227A allele. SPSS Statistics Version 26 was used to analyze data. **Results:** a total of 365 RhD-negative blood donors from the CNTS in Bamako were recruited for this study. There was a prevalence in men (90,4%); the age group 26-39 years was the most represented, with a frequency of 52,9%. The frequency of Rh DEL phenotype was 7.1% and blood group O was the most represented (38.6%) in the population as a whole. CCEE phenotype accounted for 61,5% of the DEL phenotypes. PCR-SSP showed amplification of the 10 exons of the RHD gene, with the presence of (C) haplotype. RHD 1227A allele was present in all RH DEL samples. **Conclusion:** RH-DEL phenotype carrying the RHD1227A allele with an intact RHD gene was found in blood donors in Mali.

**Key words:** RHD allele, DEL phenotype, blood donors, adsorption-elution, PCR-SSP, Centre National de Transfusion Sanguine, Mali

## Introduction

La sécurité transfusionnelle vise à répondre d'une part à la demande quantitative par la disponibilité des produits sanguins, et d'autre part à la demande qualitative, en évitant la transmission d'infections par le sang et les réactions immunologiques. Cette sécurité représente le principal défi auquel est confrontée tout centre de transfusion sanguine. L'allo-immunisation anti-érythrocytaire et les accidents immuno-

hémolytiques de la transfusion sont dus aux polymorphismes des antigènes de groupes sanguins érythrocytaires, qui diffèrent d'un individu à l'autre [1]. Les systèmes les plus importants dans la transfusion sanguine sont le système ABO, suivi du système Rhésus D [2].

Le système des groupes sanguins Rhésus joue un rôle important en raison de son polymorphisme élevé et de sa forte immunogénicité [3]. Il comprend plus de 50 antigènes codés par deux gènes hautement homologues, les gènes RHD (RHESUS D) et RHCE (RHESUS CE) qui sont formés de 10 exons chacun [4]. Le haut degré d'homologie et l'orientation opposée de ces 2 gènes favorisent des altérations génétiques du gène RHD qui influencent différemment les attributs et l'expression de l'épitope RhD, entraînant divers variants avec des réponses immunitaires potentiellement distinctes [5]. Le phénotype DEL est caractérisé par une très faible expression de RhD à la surface des globules rouges impossible à détecter par la sérologie conventionnelle et nécessite l'utilisation de la technique d'adsorption/élution, d'où le nom DEL pour D-elute [6].

Chez les européens, environ 15% des personnes sont rhésus D négatives parmi lesquelles l'incidence du phénotype Rh DEL varie de 0,18% à 0,88% [7]. L'allèle Rh DEL le plus courant est le RHD (M295I), avec une fréquence de 1/272 chez les donneurs RhD négatifs [8]. Cependant aucun rapport d'immunisation sur cet allèle n'est disponible en notre connaissance [9]. Contrairement aux asiatiques où le groupe sanguin rhésus D négatif est de 0,1% à 0,5%, environ 10% à 30% sont de phénotype Rh DEL [10]. Ce phénotype Rh DEL a une fréquence de 1/110 dans la population chinoise [11] et de 1/9091 dans la population allemande [12]. Des rapports sur l'immunisation primaire et secondaire anti-D due au Rh DEL incriminant l'allèle (RHD 1227G>A) a été signalé dans plusieurs études [9,13]. La prévalence des variants de RhD faibles était de 0,7%, 4,5% et 6,45% respectivement décrite en Uganda [14], en Égypte [15] et au Ghana [16] mais aucune donnée

n'a été rapportée sur la fréquence du variant phénotype Rh DEL. Cependant, au Maroc, une étude donne une prévalence Rh DEL de 0,94% [17].

Actuellement parmi les donneurs de sang RhD négatifs au CNTS de Bamako; la fréquence du Rh DEL est méconnue. Cependant, lorsque des malades RhD négatifs reçoivent du sang RhD positif, jusqu'à 80% d'entre eux génèrent un allo anticorps [18]. L'investigation biologique des réactions hémolytiques par la recherche d'agglutinines irrégulières à l'Hôpital Sominé Dolo de Mopti a révélé une prédominance de l'allo-immunisation anti-Rhésus D avec une proportion de 31,6 [19]. Partant de ses faits une meilleure connaissance des variants du RHD principalement du Rh DEL s'impose afin de diminuer les risques d'allo-immunisation anti-Rhésus D chez les patients en attente de transfusion sanguine. Nous formulons l'hypothèse que tous les rhésus RhD négatifs au Centre National de Transfusion Sanguine du Mali ne sont pas de vrais RhD négatifs, ils peuvent être Rh DEL.

L'objectif principal était de caractériser le gène RHD par la méthode moléculaire (PCR-SSP) dans la population des donneurs de sang RhD négatifs au Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) de Bamako. Les objectifs spécifiques: déterminer les caractéristiques sociodémographiques des donneurs RhD négatifs au Centre National de Transfusion Sanguin (CNTS) de Bamako pendant la période de Janvier à Juin 2020; déterminer la prévalence du phénotype Rh DEL chez les donneurs de sang de rhésus négatifs au CNTS de Bamako par la technique d'adsorption-élution; déterminer la fréquence du phénotype RhCE chez les donneurs Rh DEL par la technique sur plaque; rechercher la présence de l'allèle RHD 1227A par PCR chez les donneurs Rh DEL.

## Méthodes

### Plan d'étude

Cette étude consistait à rechercher la fréquence du phénotype Rh DEL et à vérifier par PCR-SSP la présence des exons du gène *RHD* et l'allèle *RHD 1227A* sur les Rh DEL.

### Cadre de l'étude

Cette étude s'est réalisée grâce à la collaboration du Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) et le Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC). Le CNTS a servi de lieu pour la collecte des échantillons et les analyses sérologiques tandis que l'UCRC a servi de cadre pour la réalisation des tests moléculaires. L'étude s'est déroulée sur une période de 3 ans allant de janvier 2020 à Décembre 2022. Planification et présentation du protocole devant le Comité d'éthique: janvier-juin 2020; collecte des échantillons et les tests sérologiques: juillet 2020-décembre 2021; tests moléculaires: juillet 2021-juin 2022; saisie et analyse des données: janvier-juin 2022; rédaction: juillet-décembre 2022.

### Participants

Il s'agissait d'une étude transversale sur les donneurs de sang rhésus D négatif se présentant au centre national de transfusion sanguine de Bamako (CNTS) pendant la période de l'étude. Nous avons inclus dans cette étude, les sujets de la population d'étude qui remplissaient les critères suivants: 1) être âgés de 18-60ans; 2) avoir un poids supérieur ou égal à 55kg; 3) être qualifié par la sélection médicale au don de sang; 4) avoir donné son accord sur le consentement libre et éclairé. Les donneurs n'ayant pas consenti à participer à l'étude n'ont pas été inclus. Une fiche d'enquête préétablie avec un des questionnaires ont servi pour la collecte des données.

### Variables

Le sexe, l'âge, le groupe sanguin ABO RhD, le phénotype RhCE et le phénotype Rh DEL.

### Source de données

Les données ont été collectées saisies sur Microsoft Excel version 2016. Les échantillons de sang qui ont servi à la réalisation de l'étude étaient collectés dans des tubes EDTA au moment du prélèvement de la poche de sang total.

### Biais

Afin d'éviter tout type de biais, la fiche d'enquête a été prétesté et approuvé par le comité scientifique du CNTS. Les techniciens ont été formé sur l'application correcte des procédures. Le questionnaire était adapté afin d'éviter le double enrôlement des donneurs de sang.

### Échantillonnage

En fixant la précision à 1% et l'intervalle de confiance à 95% ( $\alpha=5\%$ ), sachant que dans une étude réalisée au Maroc la fréquence était de 0,94% en 2014 [17].

$n = \frac{Z^2 PQ}{i^2 P}$ : proportion attendue dans la population (à partir d'une étude pilote); Z: valeur dépendante du risque d'erreur  $\alpha$  choisi ( $Z=1,96$  pour  $\alpha=5\%$ ); i: la précision voulue; n: taille de l'échantillon. La taille de l'échantillon  $n=360$  donneurs de sang RhD négatif.

### Considérations éthiques

La pertinence scientifique du travail a été approuvée par le comité scientifique et technique du centre national de transfusion sanguine et l'étude a été approuvée par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie/ Faculté de Pharmacie du Mali sous le numéro d'approbation N° 2021/58/CE/USTTB.

## Tests sérologiques

Les analyses sérologiques ont concerné :

**Le test de groupage ABO Rh sur plaque opaline:** le groupage sanguin Rhésus consiste à rechercher l'antigène D sur une goutte de sang avec un anticorps Anti-D spécifique. Le groupage sanguin ABO est une technique qui consiste à rechercher l'antigène à la surface des globules rouges (méthode de Beth-Vincent) et à rechercher l'anticorps dans le sérum (méthode de Simonin-Michon) [2]. Ces deux méthodes sont complémentaires.

**Test de confirmation du Rhésus:** cette méthode consiste à laver trois fois les hématies soupçonnées être négatifs avec de l'eau physiologique et les mettre en suspension à 5% dans l'eau physiologique (une goutte d'hématie pour 19 gouttes d'eau physiologique). Mettre trois à quatre gouttes de cette suspension préparée dans un tube à hémolyse et ajouter une goutte d'anti-D puis agiter et la mettre en incubation dans un bain marie à 37°C pendant 45 minutes à 1 heure. Après incubation, laver trois fois avec de l'eau physiologique, ajouter 1 goutte d'antiglobuline et centrifuger à 1000 tours/min et faire la lecture à l'œil nu ou au microscope à l'objectif 10 [2]. Présence agglutination: Rh positif; Absence d'agglutination: Rh négatif.

**Test d'adsorption/élution:** après confirmation du statut RhD négatif par la méthode sérologique, la méthode d'adsorption/élution consistait à incuber 200 mL de globules rouges pendant 1 heure à 37°C avec 200 mL d'anticorps monoclonaux IgG anti-D. Les cellules étaient ensuite lavées au moins six fois et l'éluat préparé par incubation à 56°C. Les éluats (ou surnageants du dernier lavage) ont été utilisés pour le test de Coombs indirect contre les hématies du panel d'identification RhD positifs et RhD négatif. La technique d'agglutination sur colonne qui était utilisée consistait à mettre 25 mL d'éluat et 50 mL de 1% des hématies du panel dans le LISS (milieu de basse force ionique) modifié dans la carte LISS/Coombs, puis l'incuber à

37°C pendant 15 minutes, centrifugé à 1030 tours/minute pendant 10 minutes, et lire l'agglutination [17]. L'interprétation des résultats: 1) présence agglutination: Rh positif; 2) Absence d'agglutination: Rh négatif.

## Méthode de phénotypage Rh CE sur plaque opaline

Le typage RhCE correspondait à la recherche des antigènes C(Rh2) E (Rh3) c (Rh4) et e (Rh5) à la surface des hématies grâce à des anticorps spécifiques à ces antigènes.

## Tests moléculaires

**Extraction du matériel génétique:** les échantillons positifs au test adsorption/élution ont été collectés pour extraire l'ADN à partir du kit d'extraction Qiagen QIAamp DNA Mini à partir du sang total prélevé sur un tube EDTA en même temps que le prélèvement de la poche de sang et conservé à -20°C. L'ADN était élué dans un volume final de 100 µl de tampon d'élution (AE) en suivant les instructions du fabricant. L'ADN extrait a ensuite été dosé pour déterminer la concentration avec le NANODROP ONE C. L'ADN a été conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

**Amplification par PCR du gène RHD:** les 10 exons du gène *RHD* et l'allèle *RHD 1227A* ont été amplifiés par PCR classique en utilisant le kit One Tag 2X master mix de BioLabs. La température d'hybridation de chaque couple d'amorces était adaptée au programme d'amplification, pour l'exon 1 et l'exon 5 (30 cycles de 94°C pendant 20 secondes et 45°C pendant 30s pour l'hybridation). Celle des exons 2, 4, 6, 8, 9, 10 et *RHD 1227A* était de 50°C pendant 30 secondes et pour l'exon 3 et 7 s'était de 53°C pendant 30 secondes.

## Électrophorèse et visualisation des bandes sur gel d'agarose

**Préparation du gel d'agarose:** un gel d'agarose à 1% a été préparé en pesant un gramme (1g) d'agarose qui a été dissout dans 100 ml de tampon

Tris acétate EDTA (TAE), ce mélange a été porté à ébullition grâce à un four micro-onde pendant 1-2 minutes afin d'obtenir un mélange homogène. Ce mélange était ensuite versé dans un moule contenant des peignes. Ceci est ensuite retiré du gel refroidit laissant place à des puits dans lesquels sont logés les échantillons (les produits PCR) pour l'électrophorèse.

**Électrophorèse:** le tampon TAE est utilisé comme solution de migration dans la cuve, le gel doit être tout juste recouvert (environ 1mm au-dessus du gel). Le GelRed s'intercale dans l'ADN double brin puis émet une fluorescence lorsqu'il est excité par la lumière UV et le Loading Dye qui est un colorant de chargement de l'ADN. Les deux réactifs sont utilisés pour loger les produits PCR dans les différents puits. Soit 4ul de gel red + 2ul loading dye + 5ul de produit PCR (amplicons). Un marqueur de taille de 100 pb (paire de base) a été logé pour mesurer la taille des bandes obtenues. Les molécules d'ADN chargées négativement sont ensuite soumises à un champ électrique avec 160 volts et 400 mA (milli ampère).

### Interprétation des résultats

Les amplicons (produits PCR) ont été visualisés et photographiés à l'aide du système de documentation sur gel ENDURO TM GDS TOUCH II. La taille des bandes d'intérêts est: Exon1: 228pb; Exon2: 1476pb; Exon3: 219 pb; Exon4: 379pb; Exon5: 1458 pb; Exon6: 274pb; Exon7: 411 pb; Exon8: 709 pb; Exon9: 190pb; Exon10: 390pb; *RHD1227A*:109pb). Un contrôle négatif (CN) était utilisé pour contrôler l'amplification. Le marqueur de taille moléculaire (M) était de 100pb.

### Analyses statistiques

Le logiciel Statistical Package for Social Sciences SPSS version 26 a été utilisé pour l'analyse des données. La prévalence était estimée avec un intervalle de confiance de 95%. Le Chi2Pearson et le Test exact Fischer ont été utilisés pour déterminer les relations entre le phénotype Rh DEL et les différentes variables.

## Résultats

Le nombre initial des échantillons était de 365 donneurs de sang RhD négatifs du Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) de Bamako. Le but de l'étude était de caractériser sur le plan moléculaire le phénotype Rh DEL et déterminer la présence de l'allèle *RHD1227A*. Parmi les 365 RhD négatifs, 26 étaient Rh DEL positifs dont 18 ont été soumis aux différents tests moléculaires, 8 échantillons Rh DEL avaient des ADN dégradés et les donneurs de sang n'étaient pas disposés à redonner leur sang car ils étaient dans des zones dangereuses et très éloignés de Bamako.

### Caractéristiques sociodémographiques des donneurs RhD négatifs

La majorité des donneurs de sang reçu pendant la période d'échantillonnage provenait de régions très variées du Mali. Les primo donneurs étaient nombreux car les dons étaient compensatoires pour aider les parents. Le sexe masculin était majoritaire sur l'ensemble des échantillons soit 90,4% (330/365) contre 9,6% (35/365) pour le sexe féminin. Le sexe féminin était très peu représenté chez les donneurs Rh DEL 3,8% (1/26). La tranche d'âge 26 à 39 ans prédominait avec 53,2% (193/365). Cette même tranche d'âge représentait 46,2% (12/26) des donneurs de sang Rh DEL. En termes de groupage ABO, le groupe sanguin O était le groupe sanguin le plus courant chez l'ensemble des donneurs avec 39,9% (143/365) suivi du groupe sanguin B 31,1% (113/365), du groupe A 23,7% (86/365) et enfin du groupe sanguin AB 5,2% (19/365) (Tableau 1).

### Fréquence des phénotypes RhCE chez les RhD négatifs et Rh DEL

Afin de déterminer les associations entre le phénotype Rh DEL et RhD négatif avec les autres antigènes du système Rh, le phénotypage pour les antigènes Rh C, c, E et e ont été réalisés chez les 365 donneurs de sang. Le phénotype Ccee était majoritaire chez les donneurs présentant le phénotype Rh DEL 61,5% (16/26) tandis que le

phénotype ccee était le plus représenté chez les donneurs RhD négatif 89,9% (281/339) (Tableau 2).

## **Prévalence du phénotype Rh DEL chez les donneurs de sang RhD négatifs**

Parmi les 365 donneurs de sang initialement RhD négatifs, 7,1% soit (26/365) étaient positifs au test d'adsorption/élution donc Rh DEL positifs. La majorité étaient de vrais RhD négatifs 92,9% soit (339/365).

## **Présence de l'allèle *RHD 1227A* par PCR chez les donneurs Rh DEL**

Nous avons testé 69,23% (18/26) des échantillons Rh DEL à la PCR-SSP du gène *RHD*. Nous avons remarqué la présence du gène *RHD* intact chez tous les échantillons. La Figure 1 montre une amplification des 10 exons (E) du gène *RHD* encadrés. Une autre PCR-SSP à l'allèle *RHD1227A* a montré une amplification claire chez tous les échantillons (Figure 2). Ce qui prouve la présence de la mutation responsable du Rh DEL chez ces donneurs de sang.

## **Discussion**

Le but de ce travail était de caractériser le gène *RHD* chez les donneurs de sang rhésus D négatif présentant le phénotype Rh DEL au Centre National de Transfusion Sanguine de Bamako (CNTS). Il s'agissait d'une étude prospective qui s'est déroulée sur une période allant janvier 2020 à décembre 2023. Au total, 365 donneurs RhD négatif éligibles au don ont été colligés. Aucun donneur n'a fait l'objet d'un double enrôlement.

### **Limites de l'étude**

Initialement, ces travaux de recherche portaient sur la caractérisation moléculaire de tous les donneurs de sang RhD négatif se présentant au CNTS de Bamako pendant la période de l'étude. Cette caractérisation moléculaire incluait les tests PCR et les tests de séquençage pour avoir des

connaissances sur la diversité génétique des groupes sanguins érythrocytaires spécifiquement du système RHD au Mali afin de dégager à terme une stratégie pertinente de typage des patients et des donneurs. Cependant, on était confronté à des difficultés d'ordre budgétaire et sécuritaires. Ce qui explique le fait que tous les échantillons n'ont pas pu être soumis aux tests PCR. Malgré cela, nous avons pu caractériser certains donneurs Rh DEL positif, et les résultats obtenus pourront être utiles afin de dégager des stratégies aidant à diminuer les risques d'allo-immunisation du RhD chez les patients en attente de transfusion. Il y aura un impact positif principalement chez les femmes en âge de procréer et diminuera le taux de maladie hémolytique du fœtus ou du nouveau-né.

La détection sérologique des phénotypes Rh DEL a été réalisée par adsorption/élution chez 365 donneurs de sang RhD négatif du Centre National de Transfusion Sanguine de Bamako. La prévalence du Rh DEL était de 7,1% dans la population étudiée. Ce résultat est nettement supérieur à la fréquence observée au Maroc 0,94% [17] et en Europe 0,88% [20] ce qui indique des caractéristiques différentes avec la population marocaine et caucasienne. De plus, il est nettement inférieur à celui de la population chinoise qui est de 24,85% [10]. Cette prédominance peut s'expliquer par le fait que le Rh DEL est connu pour être très répandu chez les Asiatiques [21].

Les donneurs de sang de sexe masculin représentaient 90,4% de notre étude. Comme dans les études précédentes sur les donneurs de sang, le sexe masculin reste majoritaire avec 92% par Kabila en 2019 [22], 73% par Ballo L.P en 2017 [23] et 85% par Traore en 2017 [24]. Nous notons que la grande majorité des donneurs de sang du RhD négatif sont des hommes dont l'âge varie entre 26 et 39 ans. Ce même constat avait été fait avec 39% par Traoré Y L en 2017 [24]. Nous avons observé que les campagnes de sensibilisation au don de sang sont beaucoup plus orientées vers les jeunes. En effet, cette

sensibilisation se fait généralement sur le lieu de travail, lors de conférences ou de journées scientifiques et culturelles. Cette approche permet au CNTS d'avoir un maximum de donneurs volontaires réguliers qui réalisent rapidement l'importance du don de sang. La faible participation des femmes au don de sang peut être due aux nombreuses obligations sociales combinées à son état physiologique (menstruation, grossesse, allaitement).

Le groupe sanguin O est le plus fréquent sur l'ensemble des donneurs avec 38,6% (Tableau 1). Ce résultat est confirmé par des études antérieures chez les donneurs de sang au Mali, qui placent le groupe sanguin O comme le groupe sanguin prédominant au Mali [22,23,25]. Des études ont montré que le groupe sanguin O est clairement différent des autres groupes sanguins parce que les personnes qui en sont porteuses sont moins susceptibles au paludisme grave [26]. Le Mali est une zone endémique pour cette maladie, et la prévalence du groupe O pourrait être le résultat d'une sélection naturelle du meilleur gène transmis à la descendance [27].

Le groupe sanguin O était également prévalent chez les donneurs Rh DEL avec 42,25%, le p value = 0,798 en utilisant le Chi<sup>2</sup> de Pearson. Une étude sur la détection sérologique du Rh DEL sur les donneurs de sang de Yangon en Chine donne une prévalence élevée du groupe sanguin O avec un p value = 0,444 [1]. Les tests statistiques de ces deux études sont tous supérieurs à 0,05. Ce qui prouve qu'il n'y a statistiquement pas de relation entre le phénotype Rh DEL et le système ABO. Les antigènes Rh et ABO sont dérivés de différents chromosomes, il n'était pas surprenant qu'il n'y ait pas d'association significative entre les deux systèmes.

Sur tous les échantillons, trois phénotypes ont été visualisés : ccee, Ccee et ccEe. (Tableau 2). Le phénotype ccee était plus représenté chez les individus RhD négatifs, ce qui est cohérent avec les études précédentes au CNTS qui placent le phénotype ccee comme un phénotype

couramment rencontré chez les donneurs de sang du Mali [25,28]. Cependant, le phénotype Ccee était prédominant chez les personnes Rh DEL 61,5%, p value=0,02 < 0,05. Il y a statistiquement une relation entre le phénotype DEL et le phénotype C. Ce résultat est confirmé par plusieurs études. Au Maroc, 100% des échantillons Rh DEL étaient C+ [17]. Il a été rapporté que le phénotype Rh DEL est associé à Rh C ou Rh E [29]. A Taiwan, le phénotype Ccee est le plus répandu chez les RH DEL (83%) et le phénotype ccee chez les RHD-(87,6%) [11]. Les Japonais ont détecté 3 phénotypes dans leur population de donneurs RH DEL, CCee, CcEe et CcEE [30]. De plus, le phénotype ccee, qui représentait 38,47 % (10/26) dans notre population Rh DEL, a également été observé chez des donneurs de sang Rh DEL dans les populations allemandes et autrichiennes [12,31].

La littérature sur la base moléculaire des phénotypes Rh- chez les africains est confuse car le RH DEL n'a pas été distingué dans les études. Nous avons non seulement confirmé que tous les individus RH DEL sont porteurs d'un gène *RHD* grossièrement intact comme cela a été constaté dans des études antérieures [21,30] mais nous avons également confirmé la présence de l'allèle *RHD 1227A* chez les individus RH DEL. Ishikawa *et al.* au Japon ont rapporté que les donneurs RhD négatif portant l'antigène Rh C étaient à 90% des Rh DEL avec l'allèle *RHD 1227A* [32]. Dans le groupe *RH DEL*, le phénotype le plus répandu était Ccee. Ce résultat est en accord avec celui de Shao *et al*, qui ont trouvé que l'occurrence préférentielle du gène *RHD* intact avec l'antigène D- dans l'haplotype Ce et l'observation fréquente du phénotype RH DEL sont fortement associées à l'allèle *RHD 1227A* [21]. Une proportion considérable d'échantillons apparemment antigéniques D- chez les personnes asiatiques portant le gène *RHD* intact ont présenté le phénotype Rh DEL [33].

Körmöcz *et al.* ont suggéré que les phénotypes DEL pouvaient être subdivisés en deux groupes: le phénotype Rh DEL complet où la majorité des

épitopes D sont conservés, comme le *RHD1227A*, et le phénotype Rh DEL partiel avec une perte caractéristique de quelques épitopes D causée par les gènes hybrides *RHD-CE-D* [7]. Des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier le mécanisme moléculaire sous-jacent. Bien que le DEL soit le phénotype D-positif le plus faible, le risque potentiel que les concentrés de globules rouges Rh DEL puissent provoquer une réaction transfusionnelle ne peut être totalement exclu [33]. Il a été rapporté que certains receveurs avec un phénotype D négatif ont développé des anticorps anti-D après une transfusion de concentré de globule rouge DEL [7,13].

## Conclusion

Au terme de cette étude descriptive transversale conduite chez 365 donneurs de sang du CNTS soupçonnés Rhésus D négatif, nous pouvons conclure que : le phénotype Rh Del est présent chez les donneurs de sang RhD négatif avec une fréquence de 7,1%. Il n'y a aucune association entre le phénotype Rh DEL et le système ABO par contre on note une forte association avec l'antigène RhC. Nous avons observé un gène *RHD* manifestement intact avec la présence de l'allèle *RHD 1227A*.

### Etat des connaissances sur le sujet

- *Le phénotype Rh DEL est caractérisé par une extrême faiblesse d'expression de l'antigène D à la surface des globules rouges;*
- *La fréquence du phénotype Rh DEL est méconnue au Mali.*

### Contribution de notre étude à la connaissance

- *Connaissance de la fréquence du phénotype Rh DEL dans la population des donneurs de sang au Mali;*
- *Connaissance des caractéristiques moléculaire du phénotype Rh DEL du Malien.*

## Conflits d'intérêts

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts.

## Contributions des auteurs

Ramatoulaye Diallo chercheur principal, responsable de l'étude, présente le protocole au comité scientifique et technique et au comité d'éthique, organise la collecte des échantillons, les analyses au laboratoire, la gestion des résultats et la rédaction de l'article. Dramane Diallo, Tenin Aminatou Coulibaly, Moussa Cissé, Djarakidja Traore, Sekou Oumar Coulibaly, Daouda Keita, Fatoumata Ouologuem, Zeinabou Samaké, Emmanuel Souraley Kouame, Hamala Coulibaly, techniciens, sont impliqués dans les analyses au laboratoire et la rédaction de l'article. Alhassane Ba et Amadou Kone, chercheurs associés supervisent les travaux dans les laboratoires et aident à la rédaction de l'article. Boubacar Maiga directeur de recherche supervise et coordonne le projet de recherche. Tous les auteurs ont lu et approuvé la version finale du manuscrit.

## Remerciements

Nous remercions l'ensemble du personnel du Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) et du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC).

## Tableaux et figures

**Tableau 1:** répartition des donneurs RhD- et Rh DEL+ en fonction des groupes sanguins ABO

**Tableau 2:** répartition des donneurs RhD- et Rh DEL+ en fonction du phénotype Rh CE

**Figure 1:** résultats de l'analyse par Polymerase Chain Reaction-specific Sequence Primer (PCR-SSP)

**Figure 2:** représentation de l'allèle *RHD 1227A* chez tous les donneurs Rh DEL+

## Références

1. Wah ST, Chi SN, Kyaing KK, Khin AA, Aung T. Serological Detection of Rh-Del Phenotype among Rh-Negative Blood Donors at National Blood Center, Yangon, Myanmar. *Adv Hematol*. 2020 Feb 18;2020: 3482124. **PubMed** | **Google Scholar**
2. Jacques C, Francis R, Pascal B. Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. John Libbey Eurotext. 2011. France. **Google Scholar**
3. Ying Y, Zhang J, Hong X, Xu X, He J, Zhu F. The Significance of RHD Genotyping and Characteristic Analysis in Chinese RhD Variant Individuals. *Front Immunol*. 2021 Nov 12;12: 755661. **PubMed** | **Google Scholar**
4. Daniels G, Castilho L, Flegel WA, Fletcher A, Garratty G, Levene C, *et al*. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Blood Cell Surface Antigens. International Society of Blood Transfusion Committee on terminology for red blood cell surface antigens: Macao report. *Vox Sang*. 2009 Feb;96(2): 153-6. **PubMed**
5. Kulkarni S, Parchure DS, Gopalkrishnan V, Madkaikar M. Screening for DEL phenotype in RhD negative Indians. *J Clin Lab Anal*. 2018 Mar;32(3): e22288. **PubMed** | **Google Scholar**
6. Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfusion and Apheresis Science*. 2011;44(1): 81-91. **PubMed** | **Google Scholar**
7. Körmöczi GF, Gassner C, Shao CP, Uchikawa M, Legler TJ. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion*. 2005 Oct;45(10): 1561-7. **PubMed** | **Google Scholar**
8. Dajak S, Krstic JL, Körmöczi G, Dogic V, Burilovic V. Characteristics and frequency of DEL phenotype detected by indirect antiglobulin test in Dalmatia county of Croatia. *Transfus Apher Sci*. 2014 Apr;50(2): 210-3. **PubMed** | **Google Scholar**
9. Yang HS, Lee MY, Park TS, Cho SY, Lee HJ, Lim G, *et al*. Primary anti-D alloimmunization induced by "Asian type" RHD (c.1227G>A) DEL red cell transfusion. *Ann Lab Med*. 2015 Sep;35(5): 554-6. **PubMed** | **Google Scholar**
10. Li Q, Hou L, Guo ZH, Ye LY, Yue DQ, Zhu ZY. Molecular basis of the RHD gene in blood donors with DEL phenotypes in Shanghai. *Vox Sang*. 2009 Aug;97(2): 139-46. **PubMed** | **Google Scholar**
11. Chen JC, Lin TM, Chen YL, Wang YH, Jin YT, Yue CT. RHD 1227A is an important genetic marker for RhD(e<sup>-</sup>) individuals. *Am J Clin Pathol*. 2004 Aug;122(2): 193-8. **PubMed** | **Google Scholar**
12. Wagner FF. RHD PCR of D-Negative Blood Donors. *Transfus Med Hemother*. 2013 Jun;40(3): 172-81. **PubMed**
13. Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. *Transfusion*. 2005 Oct;45(10): 1581-4. **PubMed** | **Google Scholar**
14. Ojok P, Oyet C, Webbo F, Mwambi B, Taremwa IM. Prevalence of RhD variants among blood donors at Gulu Regional Blood Bank, Gulu, Northern Uganda. *J Blood Med*. 2017 Sep 15;8: 151-154. **PubMed** | **Google Scholar**
15. Hussein E, Teruya J. Weak D types in the Egyptian population. *Am J Clin Pathol*. 2013 Jun;139(6): 806-11. **PubMed** | **Google Scholar**
16. Opoku-Okrah C, Amidu N, Amoah-Sakyi S. Detection of Weak D (Du) Phenotype among Rh-D Negative Males and Females in Kumasi, Ghana. *Journal of Science and Technology*. 2008;28(3): 34-40. **Google Scholar**

17. Kabiri Z, Benajiba M, Hajjout K, Bellaoui H, Dakka N. Analyse sérologique du phénotype Del chez les donneurs de sang Rh D négatif marocains. *Pathol Biol (Paris)*. 2015 Apr;63(2): 111-2. **PubMed** | **Google Scholar**
18. Wang M, Wang BL, Xu W, Fan DD, Peng ML, Pan J, *et al*. Anti-D alloimmunisation in pregnant women with DEL phenotype in China. *Transfus Med*. 2015 Jun;25(3): 163-9. **PubMed** | **Google Scholar**
19. Ouologuem Y. Accidents transfusionnels et anticorps irréguliers à l'hôpital SOMINE DOLO de MOPTI. 2021. Accessed 23 August 2022.
20. Gassner C, Doescher A, Drnovsek TD, Rozman P, Eicher NI, Legler TJ, *et al*. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion*. 2005 Apr;45(4): 527-38. **PubMed** | **Google Scholar**
21. Shao CP, Maas JH, Su YQ, Kähler M, Legler TJ. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D(el) and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang*. 2002 Aug;83(2): 156-61. **PubMed** | **Google Scholar**
22. Kobilala A. **Effet de la consommation de l'eau sur les réactions vagues chez les donneurs de sang au CNTS de Bamako**. 2019. Accessed 25 February 2023.. **PubMed** | **Google Scholar**
23. Ballo PL. Caractéristiques des donneurs de sang et séroprévalence des hépatites C et C au CNTS de BAMAKO. 2018. **Google Scholar**
24. Yacouba Ladj Traore. Profil hémoglobinique chez les donneurs de sang au Centre National de Transfusion Sanguine de Bamako. 2018.
25. Baby M, Fongoro S, Cissé M, Gakou Y, Bathily M, Dembélé AK, *et al*. Fréquence de l'allo-immunisation érythrocytaire chez les malades polytransfusés au centre hospitalo-universitaire du Point G, Bamako, Mali. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2010;17(4): 218-222. **PubMed** | **Google Scholar**
26. Rowe JA, Handel IG, Thera MA, Deans A-M, Lyke KE, Koné A, *et al*. Blood group O protects against severe Plasmodium falciparum malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 30;104(44): 17471-6. **PubMed** | **Google Scholar**
27. Maiga B, Dolo A, Touré O, Dara V, Tapily A, Campino S, *et al*. Human candidate polymorphisms in sympatric ethnic groups differing in malaria susceptibility in Mali. *PLoS One*. 2013 Oct 2;8(10): e75675. **PubMed** | **Google Scholar**
28. Traoré Oumou. Phénotype érythrocytaires dans les systèmes de groupes sanguins immunogènes chez les donneurs de sang à Bamako. Université de Bamako. 2002. Accessed 14 August 2022.
29. Scott SA, Nagl L, Tilley L, Liew YW, Condon J, Flower R, *et al*. The RHD(1227G>A) DEL-associated allele is the most prevalent DEL allele in Australian D- blood donors with C+ and/or E+ phenotypes. *Transfusion*. 2014 Nov;54(11): 2931-40. **PubMed** | **Google Scholar**
30. Fukumori Y, Hori Y, Ohnoki S, Nagao N, Shibata H, Okubo Y, *et al*. Further analysis of Del (D-elute) using polymerase chain reaction (PCR) with RHD gene-specific primers. *Transfus Med*. 1997 Sep;7(3): 227-31. **PubMed** | **Google Scholar**
31. Igel WA, von Zabern I, Wagner FF. Six years' experience performing RHD genotyping to confirm D- red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion*. 2009 Mar;49(3): 465-71. **PubMed** | **Google Scholar**

32. Ishikawa Y, Tsuneyama H, Uchikawa M, Satake M. THE RhDel ALLELE IN THE JAPANESE POPULATION. *Journal of the Japan Society of Blood Transfusion*. 2004;50: 710-713.
33. Gu J, Wang XD, Shao CP, Wang J, Sun AY, Huang LH, *et al.* Molecular basis of DEL phenotype in the Chinese population. *BMC Med Genet*. 2014 May 5;15: 54. **PubMed** | **Google Scholar**

**Tableau 1:** répartition des donneurs RhD- et Rh DEL+ en fonction des groupes sanguins ABO

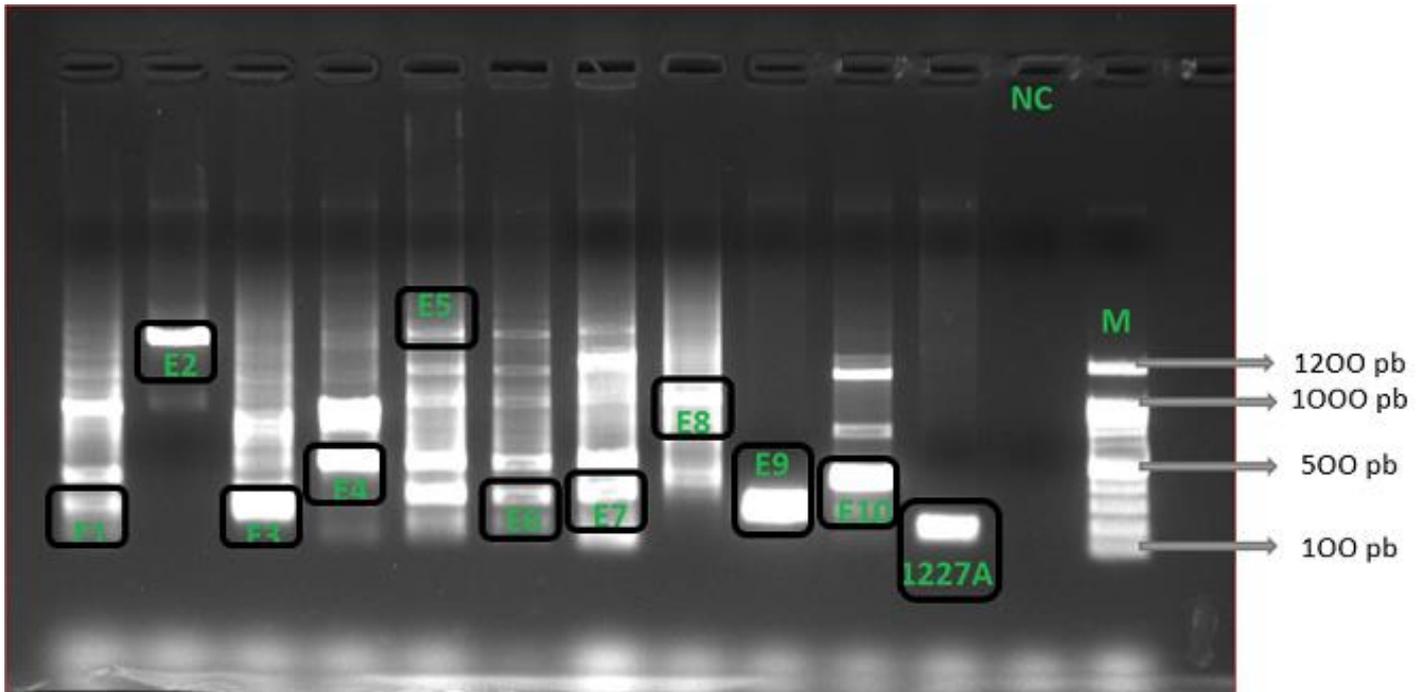
Groupe sanguin	RhD-	Rh DEL+	Total	p Value
O	39,8% (132/339)	42,3% (11/26)	39,9% (143/365)	0,798
B	31,2% (105/339)	30,8% (8/26)	31,1% (113/365)	0,967
A	24% (81/339)	19,2% (5/26)	23,7% (86/365)	0,579
AB	5% (17/339)	7,7% (2/26)	5,2% (19/365)	0,559

Chi<sup>2</sup> de Pearson; en termes de groupage ABO, le groupe sanguin O était le groupe sanguin le plus courant chez l'ensemble des donneurs avec 39,9% (143/365) suivi du groupe sanguin B 31,1% (113/365), du groupe A 23,7% (86/365) et enfin du groupe sanguin AB 5,2% (19/365)

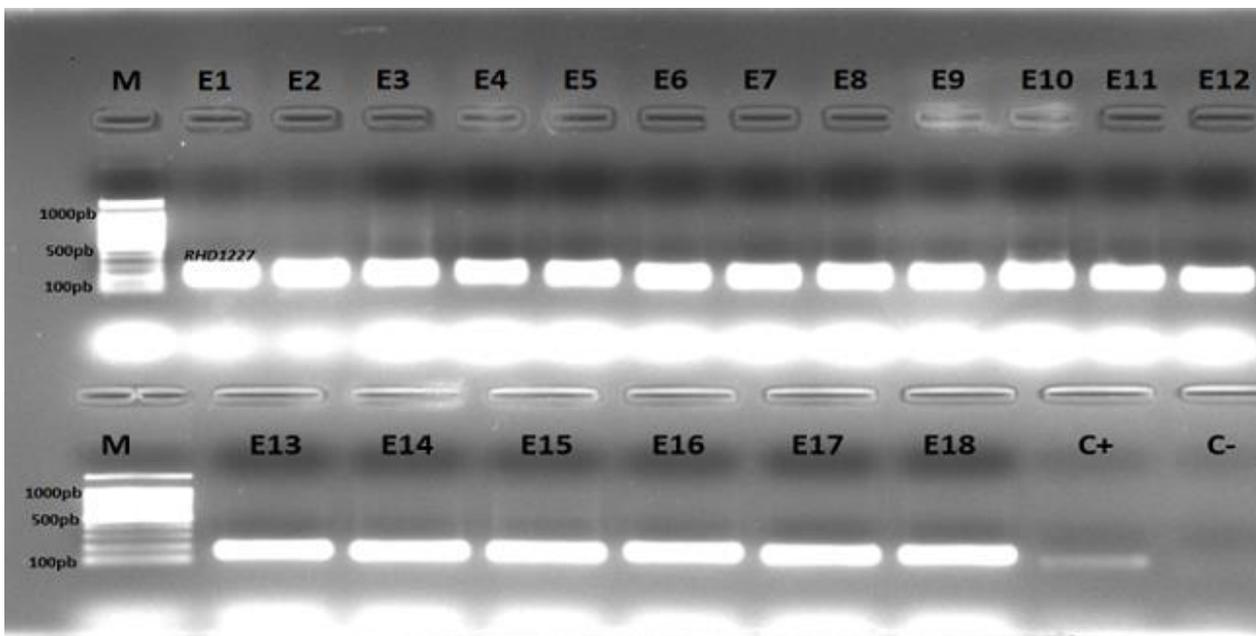
**Tableau 2:** répartition des donneurs RhD- et Rh DEL+ en fonction du phénotype Rh CE

Phénotype Rh CE	RhD-	Rh DEL	Total	p Value
ccee	89,9% (281/339)	38,5% (10/26)	79,7% (291/365)	0,6091
Ccee	15,3% (52/339)	61,5% (16/26)	18,5% (68/365)	0,022
ccEe	1,8% (6/339)	0 (0/26)	1,5% (6/365)	0,991

1: Chi<sup>2</sup> Pearson; 2: Test exact Fischer; le phénotype Ccee était majoritaire chez les donneurs présentant le phénotype Rh DEL 61,5% (16/26) tandis que le phénotype ccee était le plus représenté chez les donneurs RhD négatif 89,9% (281/339)



**Figure 1:** résultats de l'analyse par Polymerase Chain Reaction-specific Sequence Primer (PCR-SSP)



**Figure 2:** représentation de l'allèle RHD 1227A chez tous les donneurs Rh DEL+