



**HAL**  
open science

# Détermination précoce du génotype RHD foetal à partir du plasma maternel : état de l'art, cahier des charges et méthodologie

Johanna Ernest

## ► To cite this version:

Johanna Ernest. Détermination précoce du génotype RHD foetal à partir du plasma maternel : état de l'art, cahier des charges et méthodologie. Sciences pharmaceutiques. 2013. hal-01733416

**HAL Id: hal-01733416**

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733416v1>

Submitted on 14 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE LORRAINE**

**2013**

Faculté de pharmacie

---

**THESE D'EXERCICE :**

**Détermination précoce du génotype *RHD* fœtal  
à partir du plasma maternel : état de l'art,  
cahier des charges et méthodologie**

soutenue publiquement le 7 octobre 2013

en vue d'obtenir le **Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par **ERNEST Johanna**,

née le 2 décembre 1989 à Mont-Saint-Martin

---

Président du Jury :

Pr. Bertrand Rihn

Professeur à l'université de Lorraine

Juges :

Dr. Christine André-Botté

Praticien hospitalier à l'EFS Lorraine-  
Champagne

Dr. Sylvie Gross

Directrice de l'EFS Lorraine-Champagne

Pr. Claude Vigneron

Professeur émérite à l'université de Lorraine

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE  
FACULTÉ DE PHARMACIE  
Année universitaire 2013-2014**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Bertrand RIHN

**Président de la Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Président de la Commission Prospective Facultaire**

Jean-Yves JOUZEAU

**Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable ERASMUS :**

Francine KEDZIEREWICZ

**Responsable de la filière Officine :**

Francine PAULUS

**Responsables de la filière Industrie :**

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement  
Pharmaceutique Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

**Responsable Pharma Plus**

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**E.N.S.I.C. :**

**Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :**

Raphaël DUVAL

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

## PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY  
Pierre DIXNEUF  
Marie-Madeleine GALTEAU  
Thérèse GIRARD  
Maurice HOFFMANN  
Michel JACQUE  
Lucien LALLOZ  
Pierre LECTARD  
Vincent LOPPINET  
Marcel MIRJOLET  
Maurice PIERFITTE  
Janine SCHWARTZBROD  
Louis SCHWARTZBROD

## ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

Faculté de Pharmacie

## ENSEIGNANTS

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Yves JOUZEAU	80	Bioanalyse du médicament
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique

## MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT  
Gérald CATAU  
Jean-Claude CHEVIN  
Jocelyne COLLOMB  
Bernard DANGIEN  
Marie-Claude FUZELLIER  
Françoise HINZELIN  
Marie-Hélène LIVERTOUX  
Bernard MIGNOT  
Jean-Louis MONAL  
Blandine MOREAU  
Dominique NOTTER  
Christine PERDICAKIS  
Marie-France POCHON  
Anne ROVEL  
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Présentation

Discipline d'enseignement

Béatrice FAIVRE	87 Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI <sup>3</sup>	86 Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85 Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87 Microbiologie
Frédéric JORAND <sup>3</sup>	87 Environnement et Santé
Pierre LABRUDE (retraite 01-11-13)	86 Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	86 Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86 Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87 Biochimie
Pierre LEROY	85 Chimie physique
Philippe MAINCENT	85 Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32 Chimie organique
Patrick MENU	86 Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86 Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87 Biochimie, Biologie moléculaire

### **MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Béatrice DEMORE	81 Pharmacie clinique
Julien PERRIN	82 Hématologie biologique
Marie SOCHA	81 Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique
Nathalie THILLY	81 Santé publique

### **MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87 Parasitologie
Mariette BEAUD	87 Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	86 Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87 Microbiologie
Michel BOISBRUN	86 Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86 Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85 Chimie Physique
Cédric BOURA	86 Physiologie
Igor CLAROT	85 Chimie analytique
Joël COULON	87 Biochimie
Sébastien DADE	85 Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85 Chimie analytique
Roudayna DIAB	85 Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87 Biochimie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85 Biophysique, Acoustique

**ENSEIGNANTS (suite)**

## Discipline d'enseignement

Florence DUMARCAY	86 Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86 Pharmacologie
Adil FAIZ	85 Biophysique, Acoustique
Caroline GAUCHER	85/ 86 Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86 Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86 Chimie organique
Olivier JOUBERT	86 Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85 Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85 Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87 Hématologie
Christophe MERLIN	87 Microbiologie
Maxime MOURER	86 Chimie organique
Coumba NDIAYE	86 Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85 Informatique
Christine PERDICAKIS	86 Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86 Pharmacologie
Virginie PICHON	85 Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85 Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87 Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86 Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87 Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87 Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86 Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87 Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85 Pharmacie galénique

**PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER	86 Sémiologie
--------------------	---------------

**PROFESSEUR AGREGE**

Christophe COCHAUD	11 Anglais
--------------------	------------

<sup>3</sup> En attente de nomination

\* Disciplines du Conseil National des Universités :

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes



# SERMENT DES APOTHICAIRES

**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI  
IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES  
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A  
LEUR AUTEUR ».

## Remerciements

Je n'aurais pu finir ce travail de façon convenable sans le soutien, la disponibilité et les relectures pertinentes de mes directeurs de thèse, le professeur Claude Vigneron et le docteur Christine André-Botté.

Je tiens à remercier monsieur le professeur Bertrand Rihn, qui a eu la bonté d'accepter de présider le Jury lors de ma soutenance de thèse et qui me fait l'honneur d'y assister. C'est lui qui m'a en premier enseigné ce qu'était une PCR et comment elle fonctionnait.

Ma reconnaissance va également à madame le docteur Sylvie Gross, qui me fait l'honneur, malgré un emploi du temps chargé, de bien vouloir assister à ma soutenance en tant que membre du Jury.

Je remercie mes proches, en particulier mes parents et mes grands-parents, pour leur amour et leur soutien tout au long de ma scolarité.

Un grand merci à ma tante, Mélissa, et Gilles, qui ont tous trois eu la gentillesse de me relire, de donner leurs avis, et de me procurer les documents dont j'avais besoin pour écrire.

Je remercie aussi Romain, qui a su me supporter et me rassurer quand le travail me rendait nerveuse et qui m'a été d'un grand secours pour gérer les problèmes d'informatique.

Toutes les personnes qui ont pu m'apporter une aide par leur expertise, leurs encouragements, ou autre, ont également toute ma reconnaissance.

## Liste des abréviations

AIFM	allo-immunisation foeto-maternelle
ARS	agence régionale de santé
ASA	amélioration du service attendu
Ct	cycle seuil
EFS	établissement français du sang
GEU	grossesse extra-utérine
HAS	haute autorité de santé
HbA	hémoglobine adulte
HbF	hémoglobine fœtale
Ig	immunoglobuline
IMG	interruption médicale de grossesse
IVG	interruption volontaire de grossesse
MDS	médicament dérivé du sang
MoM	multiple of median
PCR	polymerase chain reaction
PSC-AMC	pic systolique cérébral de l'artère moyenne cérébrale
PUI	pharmacie à usage intérieur
RAI	recherche d'agglutinines irrégulières
SA	semaine d'aménorrhée
U.I.	unités internationales

## Équivalences

Rhophylac® 200 µg	1000 U.I.
Rhophylac® 300 µg	1500 U.I.

# Table des matières

<b>Introduction</b>	p. 15
<b>Chapitre I - Les particularités de l'antigène RH1</b>	
<b><u>I Le système Rhésus</u></b>	p. 17
1) <i>Introduction</i>	p. 17
2) <i>Génétique</i>	p. 17
3) <i>Organisation moléculaire</i>	p. 18
4) <i>Phénotypes RH dans les différentes populations</i>	p. 21
– La population caucasienne	p. 21
– La population asiatique	p. 23
– La population afro-antillaise	p. 23
– Le cas des <i>RHD</i> variants	p. 24
* Le cas du RH1 partiel	p. 24
* Le cas du RH1 faible	p. 26
* Le cas des RH null	p. 26
5) <i>Nomenclature</i>	p. 27
6) <i>Intérêt du génotype</i>	p. 28
<b><u>II L'allo-immunisation foeto-maternelle anti-RH1</u></b>	p. 28
1) <i>Physiopathologie</i>	p. 28
2) <i>Passage transplacentaire des hématies foetales</i>	p. 29
3) <i>Immunité maternelle</i>	p. 30
4) <i>Conséquences de la MHNN</i>	p. 30
– L'anémie	p. 31
– L'hyperbilirubinémie	p. 31
5) <i>Surveillance de l'anémie fœtale</i>	p. 32

6) <u>Prise en charge thérapeutique</u>	p. 35
<b><u>III Epidémiologie</u></b>	p. 35
<b>Chapitre II - La prévention en France</b>	
<b><u>I Principe</u></b>	p. 39
<b><u>II Une prévention historique : la prévention ciblée</u></b>	p. 39
<b><u>III Outils diagnostics de l'allo-immunisation Rhésus</u></b>	p. 40
1) <u>Le test de Kleihauer</u>	p. 40
2) <u>Les RAI</u>	p. 42
– Dépistage	p. 42
– Identification	p. 43
<b><u>IV Une nouvelle ère : prévention systématique et ciblée</u></b>	p. 44
1) <u>Principe et avantages</u>	p. 44
– Epidémiologie	p. 45
– Economie	p. 46
– Ethique	p. 49
2) <u>Prévention systématique et/ou génotypage foetal</u>	p. 49
<b><u>V Recommandations pour la pratique clinique</u></b>	p. 49
1) <u>Prophylaxie au premier trimestre de grossesse</u>	p. 51
2) <u>Prophylaxie au deuxième trimestre de grossesse</u>	p. 51
3) <u>Prophylaxie au troisième trimestre de grossesse</u>	p. 52
4) <u>Recommandations lors de l'accouchement</u>	p. 53
<b>Chapitre III - Le Rhophylac® : un médicament dérivé du sang</b>	
<b><u>I Qu'est-ce-que le Rhophylac® ?</u></b>	p. 55
<b><u>II Mode d'obtention</u></b>	p. 55
1) <u>Fabrication</u>	p. 55
2) <u>Système d'assurance de la qualité</u>	p. 58
<b><u>III Mode d'action</u></b>	p. 58

<b><u>IV Avantages et inconvénients</u></b>	p. 59
<b><u>V Traçabilité</u></b>	p. 60
1) <i><u>A l'hôpital</u></i>	p. 61
– Le médecin	p. 61
– L'infirmière	p. 61
– Le pharmacien	p. 62
2) <i><u>En ville</u></i>	p. 63
<b><u>VI Les immunoglobulines monoclonales : solution d'avenir ?</u></b>	p. 64
<b>Chapitre IV – Place d'un diagnostic anténatal</b>	
<b><u>I Historique à partir du liquide amniotique</u></b>	p. 66
1) <i><u>Principe</u></i>	p. 66
2) <i><u>Limites</u></i>	p. 67
<b><u>II Nouveau à partir d'un simple prélèvement sanguin maternel</u></b>	p. 68
1) <i><u>Les prémices</u></i>	p. 68
2) <i><u>Le génotypage RHD foetal</u></i>	p. 69
– Principe	p. 69
• Free DNA fetal kit rhesus D	p. 69
• Polymerase chain reaction	p. 71
– Intérêt	p. 73
– Limites	p. 74
– Evaluation	p. 75
3) <i><u>Conclusion</u></i>	p. 83
4) <i><u>Mise en place du génotypage à l'EFS Lorraine- Champagne : choix d'un protocole</u></i>	p. 84
– Les locaux	p. 84
– Le matériel	p. 85
• Composition et fonctionnement du LightCycler®	

	p. 85
– Méthode	p. 87
– Interprétation des résultats	p. 90
– Validation du protocole	p. 92
• L'extraction	p. 92
• L'amplification	p. 94
• Stabilité de l'ADN extrait de plasma	p. 95
<b>Conclusion</b>	p. 97
<b>Index des figures</b>	p. 98
<b>Index des tableaux</b>	p. 99
<b>Bibliographie</b>	p. 100



## **Introduction**

Aujourd'hui, les cas de maladie hémolytique du nouveau-né sont devenus exceptionnels car la prévention mise en œuvre, consistant en l'administration d'Ig G anti-RH1, s'avère très efficace. Cette prophylaxie et le suivi immunologique par les RAI des grossesses de femmes RH-1 constituent actuellement les piliers de la prise en charge.

Néanmoins, le fait de proposer systématiquement une prophylaxie rare et coûteuse à des femmes dont le RH du fœtus reste inconnu semble peu judicieux, dans la mesure où certaines d'entre elles n'en ont aucun besoin.

La découverte, en 1997, d'ADN fœtal libre circulant dans le plasma maternel a rendu possible une détermination anténatale du *RHD* fœtal par une méthode simple et non invasive : le génotypage à partir du plasma maternel.

De ces constatations découlent le présent travail, qui s'intéresse essentiellement à la question de la mise en œuvre du génotypage fœtal du *RHD*, notamment en termes de matériel, réactifs, choix et validation d'un protocole, contrôles de qualité, problèmes éthiques liés à l'extension prévisible du génotypage fœtal à d'autres cibles...

En fin de thèse, la partie « Mise en place du génotypage à l'EFS Lorraine-Champagne : choix d'un protocole » rapporte les premiers essais de la mise en œuvre du génotypage par le laboratoire d'immuno-hématologie de l'EFS Lorraine-Champagne.

# **Chapitre I – Les particularités de l'antigène RH1**

# I Le système Rhésus

## 1) Introduction

Il existe chez l'Homme plus de 30 systèmes de groupes sanguins ; parmi eux, le système Rhésus est l'un des plus polymorphes et certainement l'un des plus immunogène.

Pour l'histoire, il a été découvert dans les années 40 par son implication dans les transfusions incompatibles et dans l'incompatibilité foeto-maternelle responsable de la maladie hémolytique périnatale.

## 2) Génétique

Le locus *RH* des individus RH1 est composé des gènes homologues *RHD* et *RHCE* qui ont 96 % d'identité ; les deux sont étroitement liés sur le chromosome 1 et possèdent une structure génomique similaire avec 10 exons répartis sur 75 kb.

Ces deux gènes sont disposés dans des orientations opposées, tête-bêche, ce qui facilite les réarrangements du matériel génique à l'origine de variants et d'hybrides. Ils sont séparés par une région de 30kb contenant le gène *SMP1*, qui code un membre de la famille des 18kDa « *small membrane proteins* ». Par ailleurs, le gène *RHD* est entouré de deux séquences répétées présentant une homologie de 98,6 % et appelées « boîtes Rhésus 5' et 3' ».

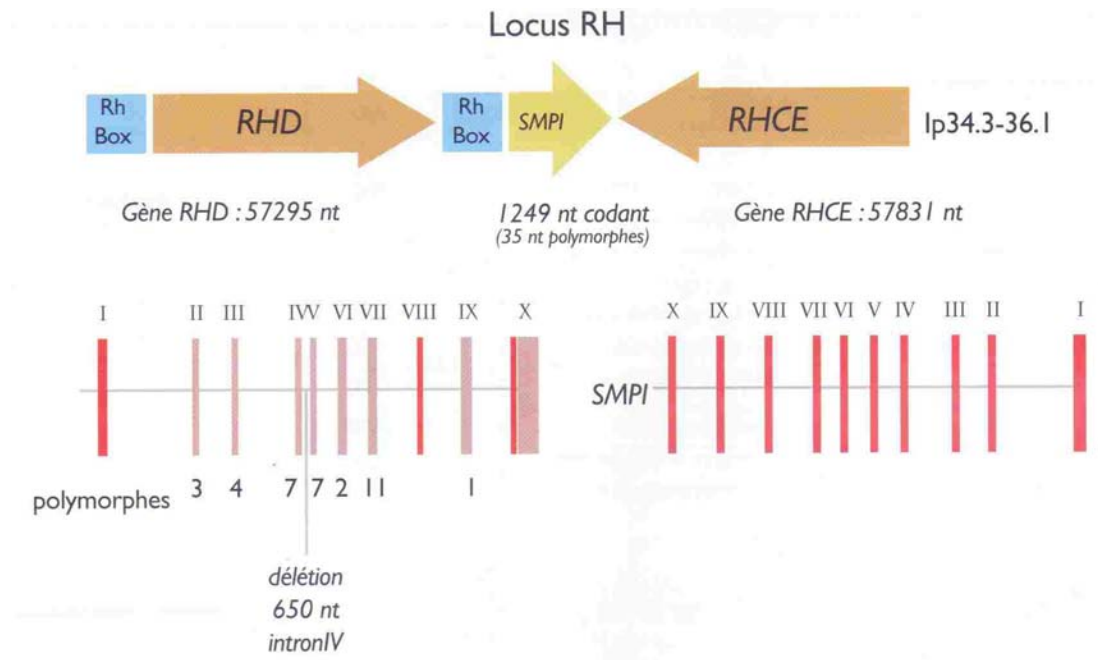


Figure 1: Organisation classique du locus RH pour des individus caucasiens RH1 (Morzine, 2007)

### 3) Organisation moléculaire

Plus de 55 antigènes RH ont été définis à ce jour dont les principaux sont au nombre de 5 : D, C/c, et E/e soit respectivement RH1, RH2, RH4, RH3, RH5. Les gènes *RHD* et *RHCE* codent respectivement les protéines D et CE qui sont des protéines palmitoylées de 417 acides aminés différant par 35 substitutions d'acides aminés. Ces protéines ont une masse moléculaire comprise entre 30 et 32 kD. Elles possèdent 12 domaines transmembranaires et leurs extrémités N et C terminales sont intracytoplasmiques. Pour chaque cellule de la lignée erythroïde, des progéniteurs CFU-E aux hématies matures, elles sont exprimées à raison de 100 à 200 000 copies par cellule. Avec RHAG (Rh associated glycoprotein), ICAM4 (intracellular adhesion molecule 4), CD47, et la glycophorine B, les protéines RH (D et/ou CE) forment un 'complexe RH', dans la membrane du globule rouge.

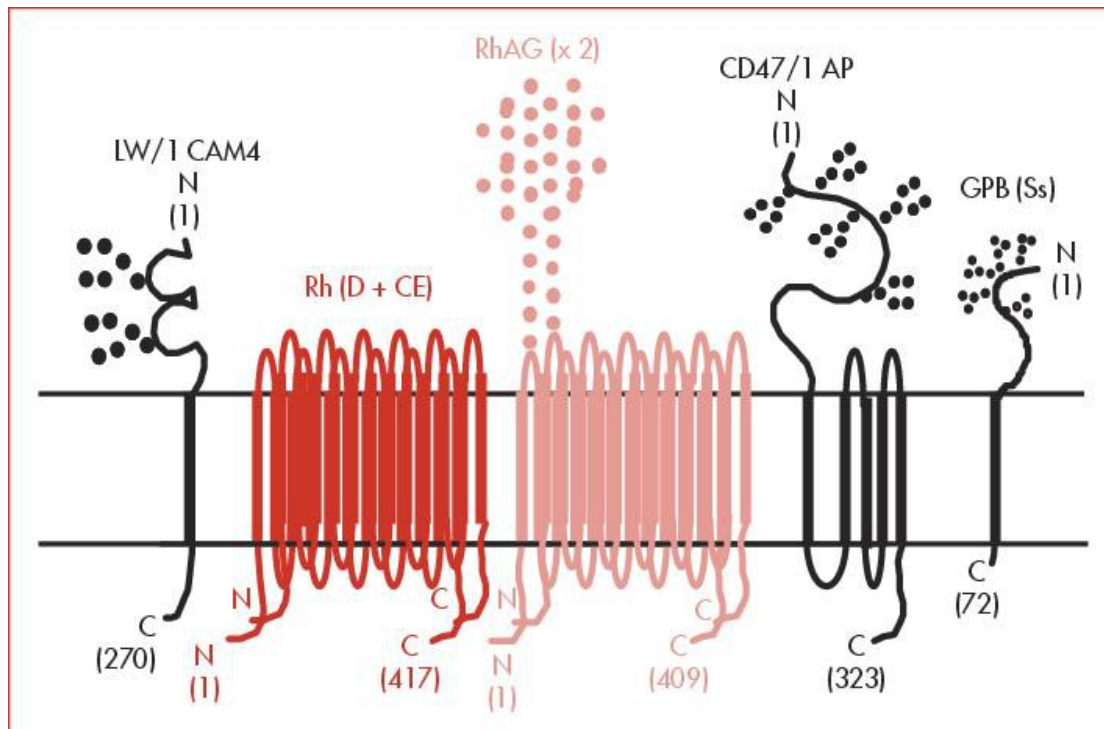


Figure 2: Les antigènes RH sont présents dans la membrane du globule rouge au sein d'un complexe dont le cœur est un tétramère composé de deux molécules RH (D et/ou CE) et de deux molécules RHAG. Les protéines CD47, LW et GPB sont attachées à ce complexe par des liaisons non covalentes. (Cartron et Colin, 1997)

Le complexe RH serait lui-même associé à l'échangeur d'anion de la bande 3. Grâce à ses interactions avec les protéines adaptatrices 4.2 et ankyrine, il contribue à la stabilité et au maintien des propriétés mécaniques de la membrane erythrocytaire. Ainsi les déficits en protéines Rh ou RhAG, ankyrine ou protéine 4.2 sont tous associés à des sphérocytoses héréditaires. Par ailleurs, la forme biconcave du globule rouge tout comme ses hautes capacités de déformabilité sont dues à un réseau flexible et élastique de protéines sous-jacent à la bicouche lipidique et dépendant de la spectrine appelé squelette membranaire. Ce squelette est constitué de tétramères de spectrine  $\alpha$  et  $\beta$  (forme majeure dans le globule rouge), d'actine et de protéine 4.1, ainsi que de protéines dites « adaptatrices » sur lesquelles viennent se fixer les protéines membranaires comme l'ankyrine ou la protéine 4.2, la p55, la tropomyosine, la myosine, la tropomoduline... La protéine 4.1 interagit avec la protéine p55 et la glycophorine C tandis que l'ankyrine fait de même avec la protéine 4.2 et le domaine N-terminal de la bande 3. Le maintien des propriétés mécaniques et de la stabilité de la membrane du globule rouge repose sur l'intégrité des interactions protéiques horizontales et verticales : l'auto-association des hétérodimères de spectrine (formée de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ ) est responsable des interactions horizontales cruciales pour la stabilité du squelette. Les interactions verticales sont également essentielles pour la maintenance des propriétés mécaniques et la stabilité de la membrane erythrocytaire.

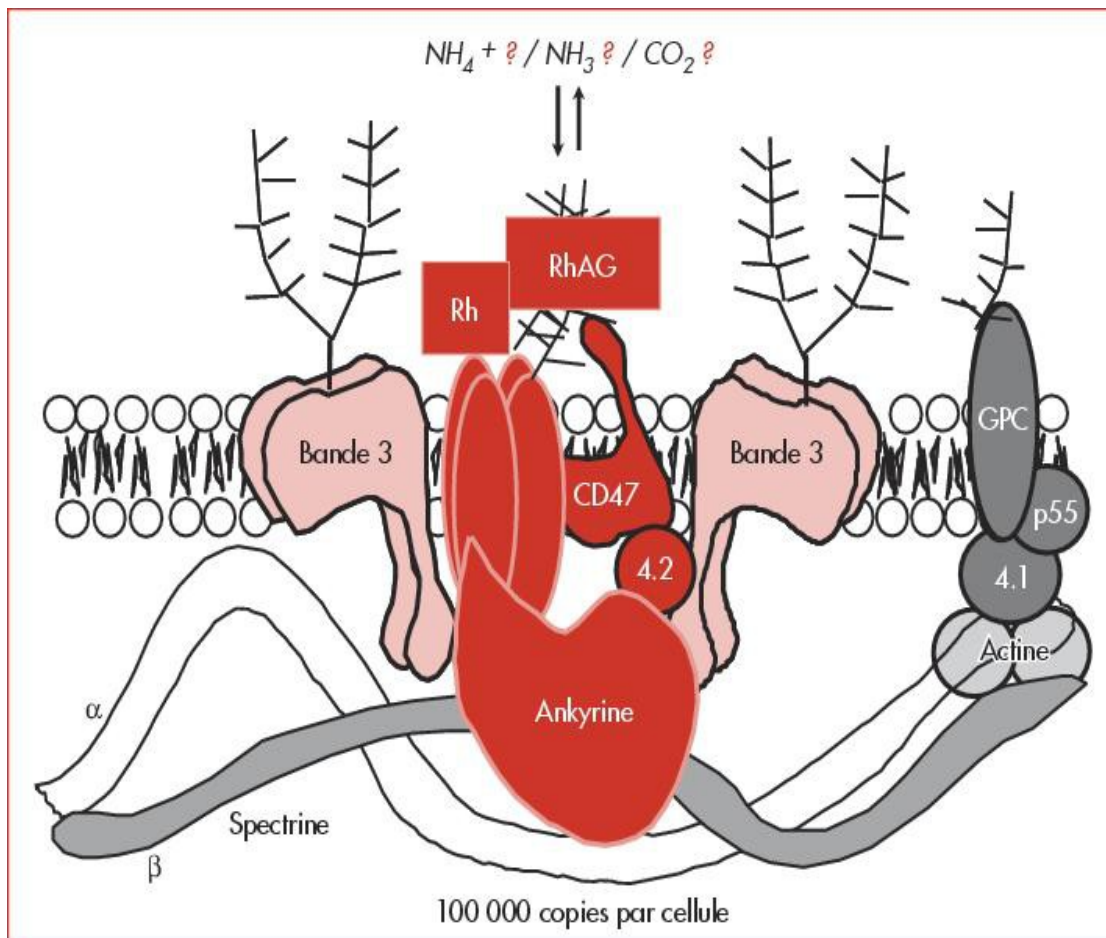


Figure 3: Le macrocomplexe RH/Bande 3/ankyrine. Le complexe RH constitue, avec les complexes Bande 3/ankyrine/protéine 4.2 et GPC/protéine 4.1/p55, un nouveau site majeur d'ancrage du squelette érythroïde à la bicouche lipidique membranaire. Dans le modèle proposé, le complexe RH et l'échangeur d'anion Bande 3 sont associés l'un et l'autre avec le squelette dépendant de la spectrine au travers de leur interaction commune avec l'ankyrine et la protéine 4.2 (Nicolas et coll., 2003)

La glycoprotéine RHAG a une masse moléculaire de 50kD et possède 36 % d'identité avec les protéines RH. Elle montre une organisation similaire en 12 domaines transmembranaires et elle aussi n'est exprimée qu'en surface des cellules érythroïdes. Le gène *RHAG* qui code pour elle est situé sur le chromosome 6. Sa structure et son organisation sont analogues à celles des gènes *RH*. Les gènes *RH* et *RHAG* définissent ainsi une petite famille génétique mais la vitesse d'évolution plus lente du gène *RHAG* et sa meilleure conservation suggèrent une fonction biologique plus importante.

Enfin pour ce qui est de l'affirmation que ce complexe RH serait lié à la bande 3, cela a été mis en évidence par le fait de l'observation d'une réduction sévère de l'expression des protéines du complexe RH secondaire au déficit primaire en bande 3.

Les expériences menées par Le Van Kim et coll. [1] ont permis de préciser qu'en plus de ses membres érythroïdes RH et RHAG, la famille des protéines RH compte deux

membres non erythroïdes RHBG et RHCG, exprimés essentiellement dans des organes impliqués dans la production et l'excrétion d'ammonium comme le foie et le rein. Des études ont montré qu'en effet, les protéines RHAG, BG et CG peuvent fonctionner comme des transporteurs d'ammonium, sous forme  $\text{NH}_4^+$  comme  $\text{NH}_3$ , afin de participer à l'élimination de la charge acide quotidienne générée par l'organisme. Ce point reste néanmoins à éclaircir car si les expériences menées par Westhoff et coll. [2] tendent à prouver que ce transport serait bidirectionnel et fonctionnerait comme un échangeur électroneutre  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$ , d'autres études, au contraire, suggèrent que les protéines RH serviraient de canal permettant le transport facilité de  $\text{NH}_3$  plutôt que de transporteur de  $\text{NH}_4^+$ . En outre, l'ammonium pouvant agir comme un médiateur régulant l'activité de différents transporteurs ou échangeurs, il a donc été proposé que cette cascade de signalisation confèrait aux protéines RH une fonction supplémentaire de récepteurs sensibles à l'ammonium.

#### 4) Phénotypes RH dans les différentes populations

##### *- La population caucasienne*

En proportion, c'est le phénotype RH1 qui est le plus fréquent avec 85 % de la population, le phénotype RH-1, lui, n'en représente que 15 %.

Pour les individus caucasiens RH-1, le locus de ce gène ne comporte, dans la majorité des cas, que le gène RHCE.

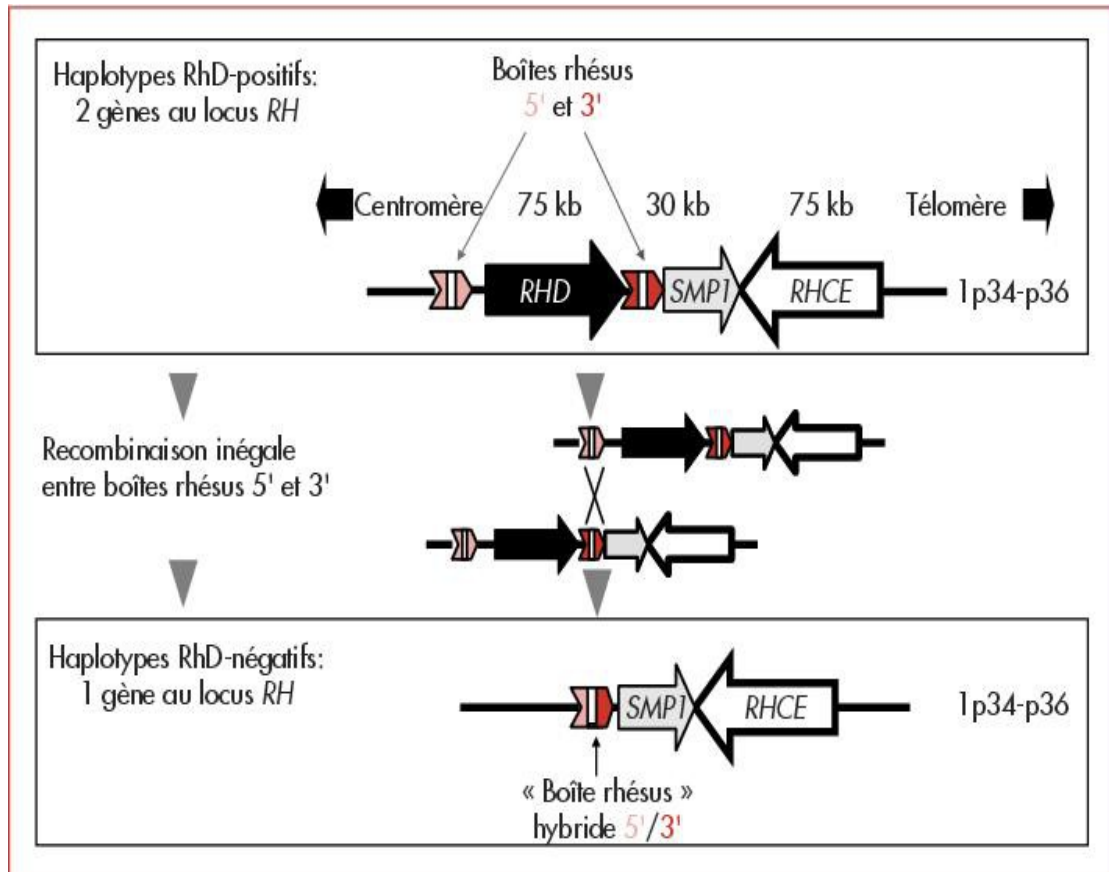


Figure 4: Polymorphisme RH1/RH-1 dans la population caucasienne. (Wagner et coll., 2005)

Mais plus rarement, le locus *RH* d'individus RH-1 peut être composé des deux gènes *RHD* et *RHCE*, le gène *RHD* est alors silencieux. Cela correspond soit à des recombinaisons entre les gènes *RHD* et *RHCE*, produisant des gènes hybrides, soit à des mutations non-sens, des insertions ou des délétions qui interrompent le cadre de lecture et donnent un gène *RHD* silencieux (comme le gène *RHD psi*).



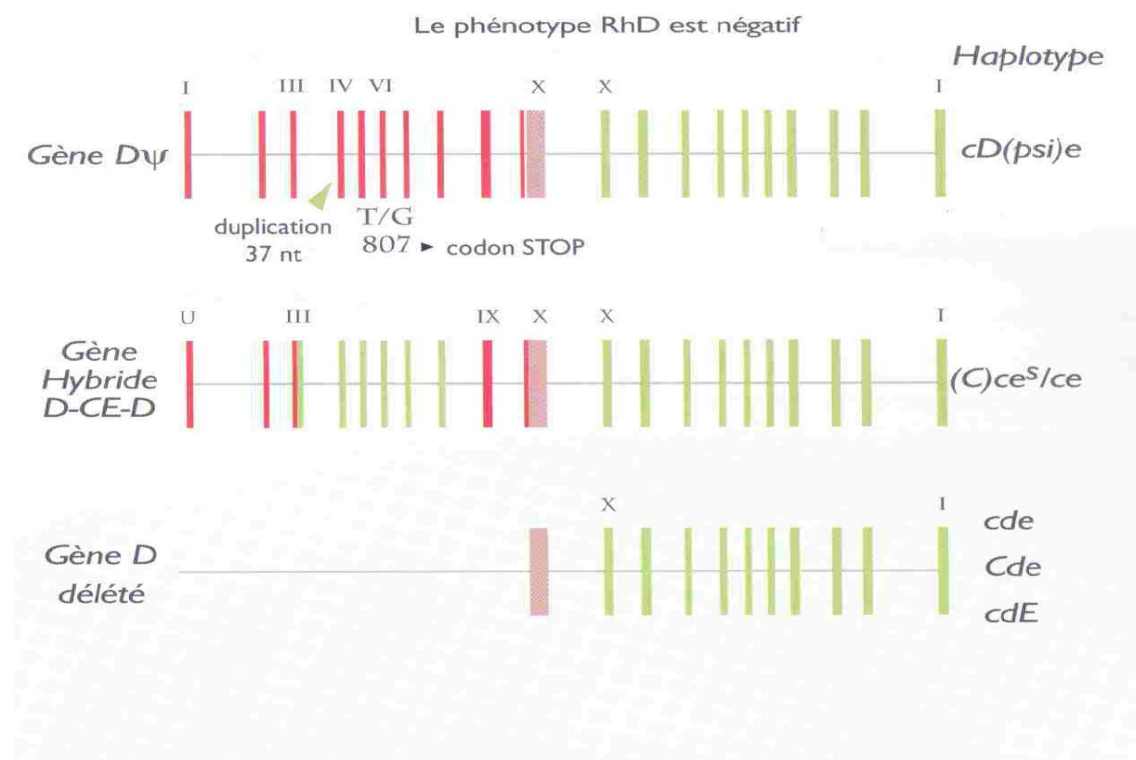


Figure 5: Autres génotypes possibles donnant un phénotype RH-1 (Morzine, 2007)

#### - La population asiatique

Dans la population asiatique, la fréquence du phénotype RH-1 n'est que de 0,1 %. Les asiatiques sont de fait beaucoup moins concernés par le problème de l'allo-immunisation. Comme chez les caucasiens, un phénotype RH1 ou RH-1 dépend ici directement de la présence ou de l'absence du gène *RHD*. Là encore, des *RHD* silencieux sont possibles quoique rares.

#### - La population afro-antillaise

Pour ce qui est de cette population en revanche, le phénotype RH-1 ne survient que dans 5 % des cas et il est le plus souvent dû non pas à l'absence du gène *RHD* mais à la présence d'un pseudogène *RHD psi*, qui contient une duplication de 37 pb au niveau de l'intron 3 et de l'exon 4, interrompant le cadre de lecture, ainsi qu'une série de mutations non-sens dans les exons 5 et 6. On estime que 30 à 60 % des femmes RH-1 d'origine africaine sont porteuses du gène *RHD psi*.

- Le cas des RHD variants

On distingue les variants dits RH « faibles » qui ne développent pratiquement pas d'immunisation anti-RH1 et les variants dits « partiels » qui résultent en RH1 incomplets et risquant de développer une immunisation anti-RH1.

- Les RH1 partiels

Les individus possédant ce phénotype sont susceptibles de développer une immunisation anti-RH1.

Les phénotypes RH1 partiels sont habituellement associés à des changements d'acides aminés situés sur les boucles extracellulaires du RH1 des hématies, on en dénombre à peu près 70. Leur identification et classification en sérologie est difficile (réactifs peu ou non disponibles, expression faible du RH1) et la biologie moléculaire est de fait beaucoup plus indiquée pour cette tâche. On nomme les différents variants avec des chiffres romains (DVI, DVII...) ou des lettres majuscules (DNR...).

La majorité des gènes mutés sont de type hybride, pour lesquels une ou des portions du gène RHD a été remplacée par une ou des portions du gène RHCE.

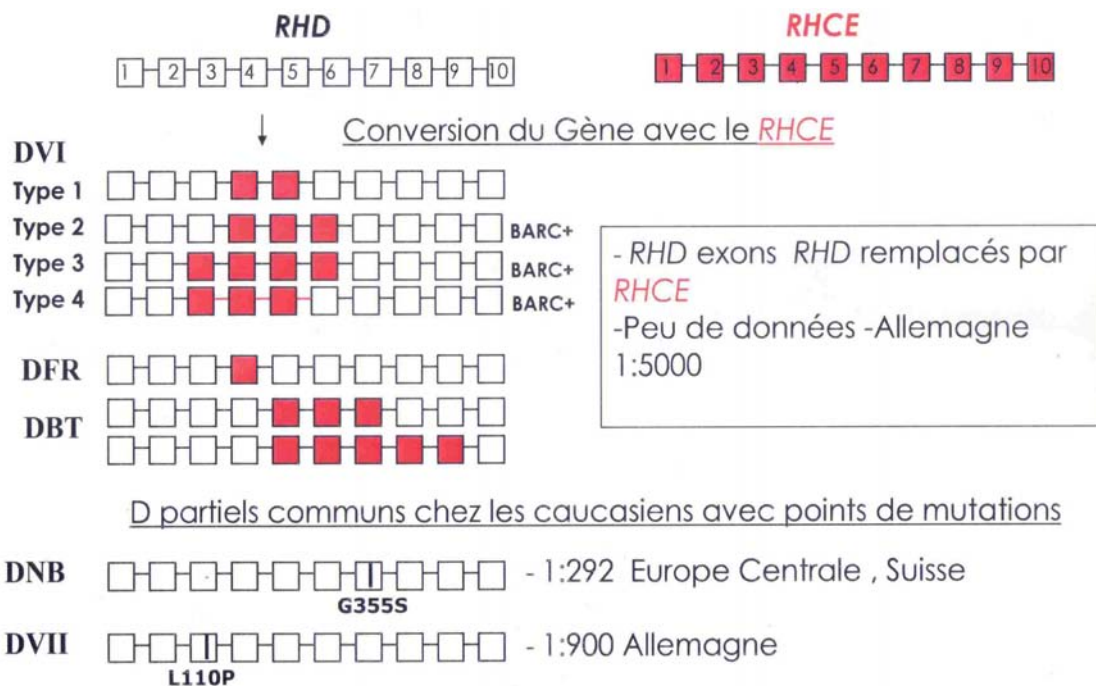


Figure 6: RH1 partiels chez les caucasiens qui sont à risque d'anti-RH1 ( Westhoff et coll.,2004)

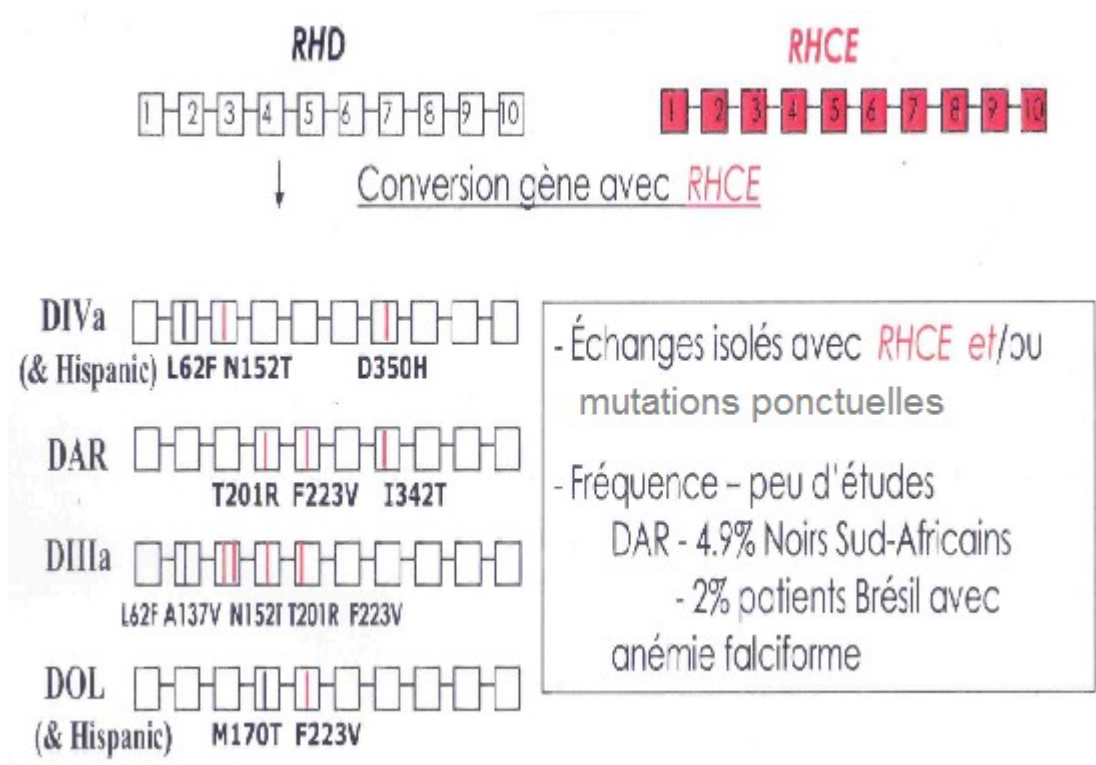


Figure 7: RH1 partiels chez les afro-antillais qui sont à risque d'anti-RH1 (Whesthoff et coll., 2004)

- *Le cas du RH1 faible*

Le RH1 faible a été décrit par Stratton en 1946, il a été noté D<sup>u</sup>.

Il existe 73 Types RH1 faible. La nomenclature veut qu'on les appelle « Type » ... suivi d'un numéro allant de 1 à 73. Les Types 1,2,3 représentent approximativement 90 % des cas en Europe.

Les RH1 types avec expression faible seraient secondaires à des mutations du gène *RHD* qui causent des changements d'acides aminés qu'on pense être intramembranaires ou intracellulaires.

Avec eux, les tests indirects à l'antiglobuline se révèlent positifs et les réactions se font selon les caractéristiques des réactifs anti-RH1 utilisés.

Cependant, certains phénotypes RH1 Type faible peuvent développer un anti-RH1, c'est le cas des Type 4, Type 4.2, Type 11 et Type 15 notamment.

La fréquence d'apparition du RH1 faible se répartit comme suit :

Auteur	Pays	Année	Fréquence
Hopkins	Ecosse	1967	0,56%
Garretta	France	1974	0,66%
Beck	Etats-Unis	1990	0,20%
Jenkins	Etats-Unis	2004	0,40%
Flegel	Allemagne	2006	0,40%

*Tableau 1: Fréquences du phénotype RH1 faible*

- *Le cas des RH null*

Certains individus sont dits « RH null » car dépourvus de tout antigène RH : RH1, RH2, et RH3, ainsi que de plusieurs autres protéines membranaires. Cela reste néanmoins très rare - une cinquantaine de cas décrits - et les individus présentent alors une anémie hémolytique de sévérité variable, une réduction de la durée de vie des érythrocytes, une sphérocytose et une fragilité osmotique anormale doublée d'une perméabilité accrue aux cations. Les hématies RH null présentent, entre autres, une diminution du cholestérol membranaire et une organisation anormale des phospholipides membranaires. C'est d'ailleurs l'existence de ces anomalies qui a suggéré que les antigènes RH pourraient jouer un rôle important dans le maintien de la stabilité de la membrane du globule rouge. D'un point de vue génétique, les individus RH null se divisent en deux groupes : ceux porteurs d'une mutation du chromosome 1, donnant une protéine RH anormale, et ceux porteurs d'une mutation

du chromosome 6 qui codent une anomalie de la protéine RHAG.

En effet, des expériences de co-immunoprécipitation à l'aide d'anticorps anti-RH1 ont démontré qu'en plus des protéines RH, d'autres protéines comme RHAG, ICAM4, CD47, ou la glycophorine B sont toujours absentes ou beaucoup moins exprimées chez les individus RH null.

Enfin, c'est l'analyse moléculaire de l'ADN des individus RH null qui a permis de démontrer que les mutations portent uniquement sur les loci *RH* et *RHAG* mais jamais sur les autres gènes codant les protéines LW, CD47 et GBP. Comme cela a été évoqué plus haut, les protéines RH sont présentes dans la membrane des hématies sous forme d'un complexe protéique dont le cœur serait formé des protéines RH et RHAG et de plusieurs chaînes protéiques accessoires, moins abondantes en quantité. Les protéines RH et RHAG apparaissent donc comme indispensables à la formation (assemblage, transport) du complexe membranaire RH à la surface des hématies et à l'intégrité structurale de la membrane. La protéine RHAG a en outre un rôle crucial en tant que chaperon moléculaire de l'ensemble du complexe RH et sert de facteur de régulation post-transcriptionnelle de l'expression membranaire des protéines RH.

### 5) Nomenclature

Le système Rhésus comporte actuellement plus de 52 antigènes, qui sont répertoriés dans le tableau n°2 :

001	002	003	004	005	006	007	008	009	010	011	012
D	C	E	C	E	F	CE	C <sup>w</sup>	C <sup>x</sup>	V	EW	G
013	014	015	016	017	018	019	020	021	022	023	024
...	...	...	...	Hr <sub>5</sub>	Hr	hr <sup>s</sup>	VS	C <sup>o</sup>	CE	D <sup>w</sup>	...
025	026	027	028	029	030	031	032	033	034	035	036
...	c-like	cE	hr <sup>t</sup>	Rh29	Go <sup>a</sup>	hr <sup>3</sup>	Rh32	Rh33	Hr <sup>h</sup>	Rh35	Be <sup>o</sup>
037	038	039	040	041	042	043	044	045	046	047	048
Evans	...	Rh39	Tar	Rh41	Rh42	Crawford	Nou	Riv	Sec	Dav	JAL
049	050	051	052	053	054	055	056	057	058	059	
STEM	FPTT	MAR	BARC	JAHK	DAK	LOCR	CENR	CEST	CELO	CEAG	

Tableau 2: Classification ISBT des antigènes du groupe Rhésus (ISBT)

## 6) Intérêt du génotype

L'établissement du génotype permet donc de déterminer la présence ou non du gène *RHD*. Son absence conduit forcément à un phénotype non RH1. En revanche, sa présence, notamment dans les populations africaines ou afro-antillaises, ne suffit pas à la déduction immédiate du phénotype RH1. Il convient de s'assurer que le gène *RHD* est fonctionnel, donc de rechercher les variants les plus fréquents avant d'en déduire le phénotype RH1. Les conséquences cliniques et sérologiques de ces variants de l'antigène RH1 sont multiples et complexes à analyser en routine. En raison de l'absence d'une parfaite corrélation entre le phénotype RH et le génotype *RH*, des résultats faussement positifs sont à craindre, avec des conséquences sur la prise en charge de la mère et du fœtus. Cependant un résultat faussement positif du *RHD* fœtal conduirait simplement à une prévention par excès. Plus grave, un résultat faussement négatif rassurerait à tort. Il empêcherait ainsi le suivi de grossesse attentif réservé aux mères porteuses de fœtus RH1 et les priverait de prévention de l'allo-immunisation, ce qui est inadmissible.

## **II L'allo-immunisation foeto-maternelle anti-RH1**

### 1) Physiopathologie

L'allo-immunisation foeto-maternelle liée à l'antigène RH1, ou AIFM, peut survenir lorsqu'une femme RH-1 porte un fœtus RH1 ; c'est-à-dire dont le père est RH1 lui aussi et qu'il peut transmettre le gène *RHD* à son enfant. En effet, le père transmettra de façon certaine le gène s'il est homozygote et aura une chance sur deux de le faire s'il est hétérozygote. Cependant, le seul phénotype du père ne permet pas, contrairement à ce qui se passe pour les autres systèmes, de déduire son statut d'homo- ou d'hétérozygote pour le gène *RHD*. La mère peut alors produire des anticorps dirigés contre les hématies du fœtus si celles-ci passent dans le sang maternel. Le facteur étiologique essentiel, en dehors de la transfusion, est le passage de sang fœtal dans la circulation maternelle.

Autrement dit, l'allo-immunisation se caractérise par la production d'anticorps maternels dirigés contre les éléments figurés du sang fœtal : ceci pour tout antigène érythrocytaire ou plaquettaire mature chez le fœtus.

Plusieurs facteurs dépendant des antigènes et des anticorps sont nécessaires pour développer une AIFM : l'antigène d'abord doit être mature précocement, immunogène, et provoquer la production d'Ig G chez la mère. L'anticorps, quant à lui, doit pouvoir passer la barrière placentaire (Ig G) et être affîn et hémolysant.

La maturation précoce des antigènes fœtaux est un facteur de risque supplémentaire d'immunisation précoce et surtout de destruction précoce des cellules fœtales.

Ce phénomène est sans risque direct sur la santé de la mère mais peut perturber son avenir transfusionnel en la rendant incompatible à la réception de certains produits sanguins. Il en résulte pour le fœtus ou le nouveau-né une affection grave appelée maladie hémolytique du nouveau-né ou MHNN, pathologie périnatale. L'hémolyse sévère peut alors se poursuivre jusqu'à 6 mois après la naissance ce qui correspond à la durée de vie des immunoglobulines maternelles passées chez le fœtus.

La MHNN constitue la principale cause d'anémie hémolytique sévère pour les nouveaux-nés, et elle est principalement due à l'allo-immunisation anti-RH1 - soit 70 % des cas dépistés à la naissance et 90 % des cas traités in utero - ; les autres étant dus essentiellement à l'antigène RH4 du système Rhésus ou au système Kell. En l'absence de traitement transfusionnel in utero, la MHNN sévère peut conduire dans 15 % des cas à une mort fœtale.

Lors d'une première grossesse, la production d'immunoglobulines par la mère est le plus souvent sans grandes conséquences pour l'enfant car les anticorps, de type Ig M, sont habituellement produits en fin de grossesse, trop tard pour affecter le fœtus. En revanche, lors d'une grossesse suivante, les anticorps, dont des Ig G, sont présents dès le début. Le système immunitaire de la mère a conservé en mémoire les informations sur l'antigène et va réagir au contact des globules rouges du nouveau fœtus. Dès lors, il va produire des anticorps de type Ig G anti-RH1 rapidement et en grand nombre, qui reconnaîtront précocement les antigènes fœtaux puis ceux du nouveau-né.

## 2) Passage transplacentaire des hématies fœtales

Les antigènes Rhésus étant matures précocement (7 semaines d'aménorrhée), le passage transplacentaire peut être immunisant dès le premier trimestre de grossesse.

Au premier trimestre, la principale cause à ce passage d'hématies fœtales dans la circulation maternelle est la fausse couche spontanée ; cela peut aussi venir d'une interruption médicale (IMG) ou volontaire (IVG) de grossesse quelle que soit la méthode utilisée, d'une grossesse extra-utérine (GEU), d'une grossesse molaire, de métrorragies, d'une choriocentèse ou amniocentèse, d'une réduction embryonnaire ou enfin d'un cerclage.

Pendant les deux derniers trimestres de grossesse, il y a un risque important de passage d'hématies fœtales en cas d'interruption médicale de grossesse, de fausse couche spontanée tardive, de mort fœtale in utero, de versions par manœuvres externes, de traumatismes abdominaux ou pelviens, d'intervention chirurgicale abdominale ou pelvienne, et lors de l'accouchement. On observe également un risque modéré de passage d'hématies en cas de métrorragies, cerclage du col utérin et menace d'accouchement prématuré. Le test de Kleihauer et/ou la cytométrie en flux permettent d'observer et de quantifier l'importance de cette hémorragie foeto-

maternelle, également nommée HFM, permettant ainsi d'adapter la dose de Rhophylac® à administrer. Cela se fait selon les recommandations du CNGOF (tableau n° 8, page 52).

### 3) Immunité maternelle

Pour rappel, la réponse immunitaire s'organise en deux temps : tout d'abord la réponse primaire au moment du premier contact avec l'immunogène, ici l'antigène RH1. Une synthèse d'anticorps s'observe dans les 15 à 20 jours suivant la stimulation. Au cours de cette stimulation, les cellules gardent en mémoire le phénomène d'immunisation. Les anticorps lors d'une réponse primaire sont au départ constitués d'Ig M. Survient ensuite une commutation isotypique ou *switch*. Il s'agit d'une recombinaison non homologue dans les gènes, qui fait que le lymphocyte B ne produit plus des Ig M mais des Ig E, G et A. Cela peut exceptionnellement se produire dans le mois qui suit l'exposition à l'antigène, mais, habituellement, le délai est de 8 à 9 semaines et parfois même 6 mois. C'est ainsi que, sauf en de rares exceptions comme lors d'immunisations très précoces, il n'existe pas de maladie hémolytique très tôt dans la grossesse chez une femme primipare.

En opposition, la réponse secondaire se met en place lors d'un nouveau contact avec l'antigène après une première rencontre. Les cellules immunocompétentes peuvent synthétiser rapidement les anticorps qui sont principalement des Ig G et A en 24 à 48 heures. C'est cette réponse secondaire rapide et intense qui peut déclencher l'immunisation. A noter que, s'il existe une incompatibilité ABO associée, l'importance de l'immunisation diminuerait légèrement du fait de la destruction rapide des hématies fœtales par les anticorps ABO naturels de la mère, sans pour autant annihiler.

### 4) Conséquences de la MHNN

Après leur passage de la barrière placentaire, les immunoglobulines maternelles passées dans la circulation fœtale se fixent sur les hématies fœtales, qui seront ensuite détruites par les macrophages du foie et de la rate du fœtus. L'hémolyse des globules rouges va être à l'origine d'une anémie chez ce dernier ainsi que d'une augmentation d'un produit de dégradation de l'hémoglobine : la bilirubine, sans conséquence pour le fœtus compte tenu de la détoxification placentaire de la bilirubine. A cela s'ajoute aussi une inhibition de l'érythropoïèse fœtale, plus particulièrement en cas d'immunisation anti-KEL1.



### - L'anémie

Dès la douzième semaine d'aménorrhée, l'anémie fœtale peut provoquer hépatosplénomégalie, insuffisance cardiaque, anasarque foeto-placentaire, et même mort fœtale in utero. Si l'enfant naît avec une hépatosplénomégalie, elle peut ensuite perdurer dans les premiers mois de vie.

Précisément, si l'anémie n'est pas corrigée, la diminution de la pression osmotique plasmatique entraîne une fuite d'eau du compartiment vasculaire vers le compartiment interstitiel. Apparaissent alors des épanchements liquidiens des séreuses - péricarde en premier lieu puis péritoine et éventuellement plèvre - et ensuite des œdèmes tissulaires. Un tableau d'anasarque foeto-placentaire est alors constitué. D'abord réversible par correction de l'anémie, l'anasarque dit « fonctionnel » par insuffisance cardiaque sera plus difficilement sensible au traitement au stade ultérieur dit « lésionnel » qui est la conséquence d'une anoxie chronique induisant des lésions et remaniements profonds. En l'absence de thérapeutique, l'issue inéluctable est alors la mort in utero. Normalement, le taux moyen d'hémoglobine chez le fœtus croît de 9g/dL à 20 semaines d'aménorrhée jusqu'à plus de 16g/dL à la naissance.

La sévérité clinique dépend aussi du titre et de l'affinité des anticorps maternels. Par exemple, les Ig G anti-RH1 à 1µg/L ne causent pas d'anémie sévère avant la 32ème semaine d'aménorrhée, mais à 4 µg/L, on note une anémie dès 18 semaines d'aménorrhée.

L'appréciation quantitative des anticorps du système Rhésus peut se faire par titrage ou par dosage pondéral.

### - L'hyperbilirubinémie

L'augmentation de la bilirubine libre dans sa circulation sanguine représente un risque neurologique pour le nouveau-né. Tant qu'il est in utero, cela est sans grande conséquence car la bilirubine est épurée par l'organisme maternel. A la naissance en revanche, l'hyperbilirubinémie s'accroît d'autant plus que la prématurité est importante, car la capacité de glucurono-conjugaison hépatique du nouveau-né n'est que limitée, l'ictère apparaît alors. La prématurité expose aussi à une nocivité accrue dans la mesure où la barrière hématoencéphalique est poreuse, facilitant le passage de la bilirubine et entraînant par là une destruction des noyaux gris centraux. En l'absence de traitement, la capacité de fixation par l'albumine de la bilirubine non conjuguée est débordée. L'excès de bilirubine non liée à l'albumine risque d'entraîner une immaturité hépatique aggravée, un ictère nucléaire ou une encéphalopathie hyperbilirubinémique par action toxique sur les noyaux gris centraux pouvant provoquer le décès ou des séquelles psychomotrices graves. Ce risque est augmenté par la prématurité, le faible poids à la naissance, les infections... Des dosages de la bilirubine non conjuguée dans le sang seront, le cas échéant, réalisés.

## 5) Surveillance de l'anémie fœtale

La surveillance clinico-biologique de l'anémie fœtale se fait en 5 points :

- \_ RAI pour l'identification afin de vérifier l'évolution des spécificités anticorps
- \_ Titrage pouvant être complété par un dosage pondéral des anticorps

Pour les anticorps anti-RH1 et anti-RH4 qui sont les plus dangereux, la répétition du titrage voire du dosage pondéral doit se faire, en cas d'incompatibilité du moins, toutes les 4 semaines après 3 mois de grossesse si le taux initial était modéré, toutes les 2 ou 3 semaines s'il était moyen et tous les 5 à 10 jours après test invasif (amniocentèse...). Les anti-Kell, eux, sont mesurés lors du dosage initial puis tous les mois après 4 mois. La présence d'anticorps anti-RH2 et RH3 constitue, pour sa part, un facteur de gravité certain lors d'une allo-immunisation.

En conclusion, au moment du premier dosage, s'il s'agit d'une situation avec titre de l'anticorps  $< 16$  et un dosage pondéral (DP)  $< 0,8 \mu\text{g/mL}$ , il convient de surveiller attentivement l'évolution des anticorps tous les mois puis tous les 15 jours (au-delà de 20 SA). Mais si la patiente a un titre d'anticorps supérieur à 16 ou un DP  $> 0,8$ , il est alors préférable de la confier à une équipe spécialisée dotée de l'ensemble des moyens humains et techniques appropriés 24h/24 et 7j/7 car la situation peut évoluer rapidement vers une aggravation, surtout lorsqu'il s'agit des anticorps anti-RH1 (D), KEL1 (K) et RH4 (c).

- \_ Echographie morphologique pour repérer des signes d'anasarque (insuffisance cardiaque anoxique)
  - Enregistrement du rythme cardiaque fœtal
  - Mesure par Doppler du flux sanguin dans l'artère cérébrale moyenne

Le Doppler représente un grand progrès apparu au cours de ces 20 dernières années, à condition que la mesure relève de la compétence d'un opérateur bien entraîné à ce type d'exploration car elle est délicate.

Le seuil de diagnostic de l'anémie est à 7g/dL au deuxième trimestre de la grossesse et à 9g/dL au troisième trimestre. Sous ces valeurs apparaît un accroissement du débit cardiaque qui s'accompagne d'anomalies du rythme cardiaque fœtal.

Réaliser cette technique revient en fait à mesurer le pic systolique cérébral de l'artère moyenne cérébrale (PSC-AMC). En effet, au début des années 90 plusieurs équipes ont cherché à analyser ce flux et à établir une corrélation avec l'anémie chez le fœtus. L'artère moyenne cérébrale (AMC) a été retenue du fait de son accessibilité chez le fœtus et des moindres variabilités dans l'établissement des mesures entre équipes. De par les mécanismes mentionnés plus haut, l'installation d'une anémie chez le fœtus se traduit par une diminution de la viscosité sanguine et une augmentation du débit cardiaque fœtal bien mis en évidence par les analyses par Doppler des flux artériels.

Les opérateurs se réfèrent aux valeurs des PSC-AMC établies en fonction de l'âge gestationnel (Courbe de MARI) et calculent chez le fœtus la valeur du PSC-AMC en l'exprimant par rapport à la valeur médiane de la population du même âge gestationnel donné par les références publiées [3]. Ils établissent ainsi le « MoM » ( Multiple of Median) du fœtus. Cette valeur est bien corrélée au taux d'hémoglobine fœtal lui aussi exprimé en multiple de la médiane de l'hémoglobine pour l'âge gestationnel du fœtus.

Cette mesure est très fiable entre 16 et 35 SA et doit être répétée trois fois de façon rapprochée pour en assurer la validité . Classiquement une valeur du PSC-AMC de plus de 1,5 MoM est le reflet d'une anémie dans 86 % des cas.

GA (weeks)	MCA-PSV (cm/s)	
	Median	1.5 MoM
14	19.3	28.9
15	20.2	30.3
16	21.1	31.7
17	22.1	33.2
18	23.2	34.8
19	24.3	36.5
20	25.5	38.2
21	26.7	40.0
22	27.9	41.9
23	29.3	43.9
24	30.7	46.0
25	32.1	48.2
26	33.6	50.4
27	35.2	52.8
28	36.9	55.4
29	38.7	58.0
30	40.5	60.7
31	42.4	63.6
32	44.4	66.6
33	46.5	69.8
34	48.7	73.1
35	51.1	76.6
36	53.5	80.2
37	56.0	84.0
38	58.7	88.0
39	61.5	92.2
40	64.4	96.6

*Figure 8: Écarts entre la valeur normale du PSC-AMC et la valeur seuil de 1,5MoM, en fonction de l'âge gestationnel (Mari G., 2000)*

## 6) Prise en charge thérapeutique

En termes de thérapeutique, la conduite à tenir dépend de l'âge gestationnel.

Avant 17 SA, il est possible de procéder à une transfusion intrapéritonéale, geste délicat à mettre en pratique. Entre 20 et 32-34 SA, il s'agira plutôt d'une transfusion ou d'une exsanguino-transfusion par cordocentèse. Après 32-34 SA, le traitement le plus efficace consiste souvent à provoquer l'accouchement et prendre en charge le nouveau-né dans un service de néonatalogie spécialisé.

Le traitement de recours est alors la transfusion ou l'exsanguino-transfusion néonatale. Depuis l'apparition de la photothérapie intensive, l'utilisation de ces recours est devenue exceptionnelle. Le choix de la thérapeutique de l'ictère est fonction de la bilirubinémie.

Il existe différentes formes cliniques de maladie hémolytique du nouveau-né :

- Les **formes modérées** qu'on retrouve dans 50 % des cas peuvent se manifester par un ictère et le pronostic est bon. L'hémoglobinémie est alors supérieure à 14g/dL.

- Les **formes sérieuses** représentent plus de 25 % des cas, le pronostic est aussi la survie, mais l'enfant peut rencontrer des problèmes d'ictère, d'anémie et de prématurité. L'anémie (7-14g/dL) est alors traitée par transfusion et l'ictère par photothérapie.

- Les **formes graves** représentent moins de 25 % des cas, l'hémoglobinémie est alors inférieure à 7g/dL. La clinique voit l'apparition d'un anasarque qu'il faut traiter par transfusion in utero et le pronostic vital est engagé. 40 % des anasarques se forment entre la 22 et la 33ème semaine d'aménorrhée, 60 % après la 33ème semaine.

## III Epidémiologie

On estime le nombre de grossesses conçues chaque année en France compris entre 1,2 et 1,3 million, incluant les naissances vivantes (828 404 en 2008), les fausses couches spontanées (15 à 20 % des grossesses totales), les grossesses extra utérines (GEU), les interruptions médicales et volontaires de grossesse. Environ 15% de la population française étant de groupe RH-1, on peut évaluer de 150 000 à 165 000 le nombre de femmes RH-1 enceintes chaque année. Par ailleurs, la fréquence du gène *RHD* étant de 0,6, le nombre annuel des femmes RH-1 enceintes de fœtus RH1 serait de l'ordre de 90 000, et seulement 75 000 au-delà de 28 semaines d'aménorrhée à la suite de fausses couches, ITG, IVG, GEU...

	Population de toutes les femmes enceintes		Population des femmes enceintes RhD négatif (15% de la population des femmes enceintes)	
	Hypothèse basse	Hypothèse haute	Hypothèse basse	Hypothèse haute
Grossesses avec nouveau-nés vivants et décédés	825 000	825 000	123 750	123 750
Fausses couches : 15-20% des grossesses totales conçues	189 598	268 598	28 440	40 290
IVG	227 050	227 050	34 057	34 057
IMG	5 775	5 775	866	866
GEU	16 568	16 568	2 485	2 485
<b>Grossesses totales conçues</b>	<b>1 263 991</b>	<b>1 342 991</b>	<b>189 598</b>	<b>201 448</b>
<b>Moyennes des grossesses totales conçues</b>	<b>1 303 491</b>		<b>195 520</b>	

Tableau 3: Comparatif 2009 des grossesses pour les femmes de la population générale et pour les seules femmes RH-1 (Bergantze P., 2010)

L'incidence de l'AIFM en France est de l'ordre de 0,9 cas pour 1 000 naissances, ce qui représente donc 730 à 750 femmes par an avec une forte baisse à noter par rapport à il y a une trentaine d'années.

En effet, il a été mis en évidence dans les années 60 que l'allo-immunisation primaire anti-RH1 due à une grossesse incompatible peut être évitée par une administration d'immunoglobulines anti-RH1 rapidement après l'accouchement.

De même, les nouvelles méthodes de diagnostic ont permis de limiter, voire abolir, le recours à des gestes de diagnostic invasifs comme le groupage par cordocentèse, par exemple.

Au total, environ 25 ans se sont écoulés entre l'identification de la cause et l'introduction d'une méthode préventive pour contrer cette maladie mais c'est chose faite. Aujourd'hui, l'ensemble des améliorations sur les plans préventif - notamment grâce à l'apparition de la prévention ciblée puis de celle ciblée et systématique -, et curatif, a permis de réduire la mortalité de plus de 90 % dans les pays développés mais la vigilance reste de mise.

Pour ces raisons, la connaissance précise du RH fœtal reste donc essentielle chez :

- les femmes RH-1 non immunisées, pour sélectionner celles qui pourraient bénéficier d'une immunoprophylaxie ciblée ou systématique ;

- les femmes RH-1 déjà immunisées vis à vis de RH1, pour identifier les fœtus à risque d'anémie (fœtus RH1) devant faire l'objet d'une surveillance particulière.

Sur les 730 naissances concernées chaque année, les formes graves représenteraient 300 cas. Parmi eux 100 seraient traités in utero tandis que les autres souffriraient de formes plus modérées. La MHNN ferait au final entre 40 et 50 décès chaque année. Pour l'instant, il n'existe pas en France de registre national exhaustif des allo-immunisations anti-RH1 ni de leurs formes graves. Les données dont nous disposons sont donc parcellaires, mais permettent tout de même d'évaluer à quelques dizaines par an le nombre de décès périnataux liés à ce type d'allo-immunisation.

Malgré la prévention instaurée, des cas d'allo-immunisation anti-RH1 surviennent donc encore dont les trois-quarts au cours de l'accouchement, d'une IVG, de fausses couches spontanées ou de grossesse extra-utérine, le plus souvent du fait d'une prévention oubliée ou inadaptée. On estime qu'environ 25 % d'entre elles découlent d'une hémorragie foeto-maternelle sans facteur de risque identifiable, principalement au cours du troisième trimestre, et risquent donc d'échapper à la prévention ciblée. En effet, un passage "spontané" d'hématies fœtales dans la circulation maternelle survient dans 4 % des cas au premier trimestre, 12 % au second et 45 % au troisième trimestre. Il est même de 60 % au moment de l'accouchement. Ces hémorragies silencieuses échappent donc à la prévention ciblée et ont conduit de nombreux pays à adopter une injection systématique supplémentaire d'Ig G anti-RH1 au troisième trimestre de la grossesse. Dans ce sens, Bowman [4] a fait remarquer que l'allo-immunisation imputable à une hémorragie foeto-maternelle massive de post-partum (environ 0,07 % des accouchements) est 20 fois moins fréquente que l'allo-immunisation du troisième trimestre en l'absence d'administration prénatale d'anti-RH1.

## **Chapitre II - La prévention en France**



## **I Principe**

L'idée développée par Stern en 1961 consiste à injecter à des femmes RH-1 dépourvues jusque-là d'anticorps anti-RH1 des gammaglobulines anti-RH1 d'origine humaine chaque fois qu'elles risquent d'avoir été en contact avec des globules rouges RH1. Ceux-ci vont alors être détruits avant l'apparition des anticorps d'allo-immunisation. Une administration de 100µg d'immunoglobulines anti-RH1 en IV neutralise 5mL de sang fœtal, toutefois seules les formes 200µg et 300µg sont aujourd'hui commercialisées en France. Dans la pratique, la quantité de sang fœtal qui est passée chez la mère et donc la dose prophylactique d'anticorps anti-RH1 à administrer peut être évaluée à partir du deuxième trimestre de grossesse par le test de Kleihauer que nous détaillerons plus loin. L'efficacité de la prévention est contrôlée par la disparition des hématies fœtales du sang maternel 24 heures après l'administration des immunoglobulines et par la présence des anticorps anti-RH1 encore présents chez la mère.

## **II Une prévention historique : la prévention ciblée**

Longtemps la seule pratiquée en France, la prévention ciblée a été mise en place il y a une quarantaine d'années et a permis une réduction par un facteur de 6 à 10 des allo-immunisations anti-RH1, toutes gravités confondues. En pratique, seules 0,9 naissances vivantes pour 1 000 sont aujourd'hui concernées contre 6 à 10 avant la mise en place de la prévention. Historiquement, elle s'appliquait d'abord au post-partum, lorsque des femmes RH-1 donnaient naissance à des enfants RH1. Ce n'est que plus tard que les injections ont été étendues aux avortements spontanés ou volontaires, puis aux situations anténatales à risque d'hémorragie foeto-maternelle.

Après l'administration de gammaglobulines anti-RH1, la femme présentera un excès d'anticorps anti-RH1 mais ceux-ci auront un titre bas et seront faiblement réactifs.

Une fois administrés, les gammaglobulines anti-RH1 traversent le placenta et se lient aux érythrocytes fœtaux sans causer d'hémolyse, d'anémie ou d'ictère. Une étude de 2001 menée par Maayan-Metzger et coll. [5] montre d'ailleurs que 20 % des nouveau-nés RH1 nés de mères ayant reçu deux doses prénatales d'Ig G anti-RH1 ont présenté un test direct à l'antiglobuline, anciennement test de Coombs direct érythrocytaire, positif. Leurs dosages d'hémoglobine et de bilirubine n'étaient pas différents de ceux des nouveau-nés RH-1.

### III Outils diagnostics de l'allo-immunisation Rhésus

#### 1) Le test de Kleihauer

Il s'agit d'un test cytochimique sur frottis sanguin fixé à l'éthanol mis au point en 1957 par Enno Kleihauer et Klaus Betke. Le but est d'obtenir une élimination sélective de l'hémoglobine adulte (HbA) sous l'action d'une solution tampon pH acide, tout en préservant le contenu en hémoglobine fœtale (HbF) des hématies. L'hémoglobine adulte, peu résistante à cette solution, va en effet être éluée des hématies adultes dont il ne reste que des stromas vides à la lecture au microscope alors que les hématies fœtales restent colorées. Un témoin positif et un témoin négatif sont réalisés pour pouvoir comparer la lame à ceux-ci.

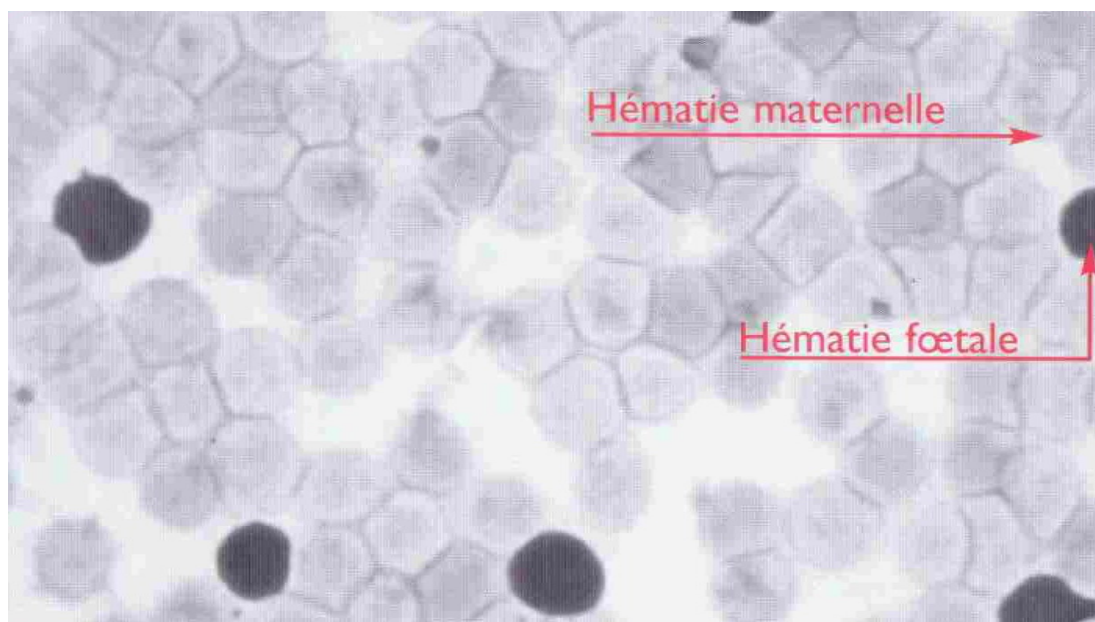


Figure 9: Lecture d'un test de Kleihauer : hématies maternelles incolores ayant perdu leur hémoglobine et hématies fœtales colorées avec l'hémoglobine qui fixe la phloxine. (EFS nord de France, Lille, V. Tunez, 2006)

La quantification des hématies fœtales contenant de l'HbF par rapport aux hématies maternelles qui contiennent de l'HbA permet d'estimer le volume de sang fœtal présent dans la circulation maternelle. Cette quantification est donnée en nombre d'hématies fœtales pour 10 000 hématies adultes. La quantité d'immunoglobulines injectée est ensuite fonction du volume d'hémorragie foeto-maternelle estimé.

Différents réactifs sont disponibles pour ce test, à savoir *Fœtal hemoglobin*® (SureTech, Etats-unis), test de kleihauer-hémoglobine foetale® (Oxytele, France), le kit hémoglobine foetale (Labo moderne, France), le kit DiaMed HbF Screening-Test

(Biorad, Etats-Unis), ou encore des réactifs propres aux différents laboratoires. Le problème de ce test est que c'est une technique manuelle non standardisée nécessitant un personnel formé et entraîné du fait de l'importante difficulté dans le décompte des cellules. Il existe donc de grandes variations inter-individuelles dans l'interprétation.

En 2001 Simonet et coll. [6] ont d'ailleurs mis en place une comparaison inter-laboratoires et inter-opérateurs : 20 laboratoires participants ont analysé une lame colorée comportant 45 hématies fœtales pour 10 000 hématies adultes. Comme le montre la figure n° 10, les différences inter-laboratoires et même inter-opérateurs au sein d'un même laboratoire ont été très importantes, dues à des erreurs de lecture ou à des difficultés de comptage.

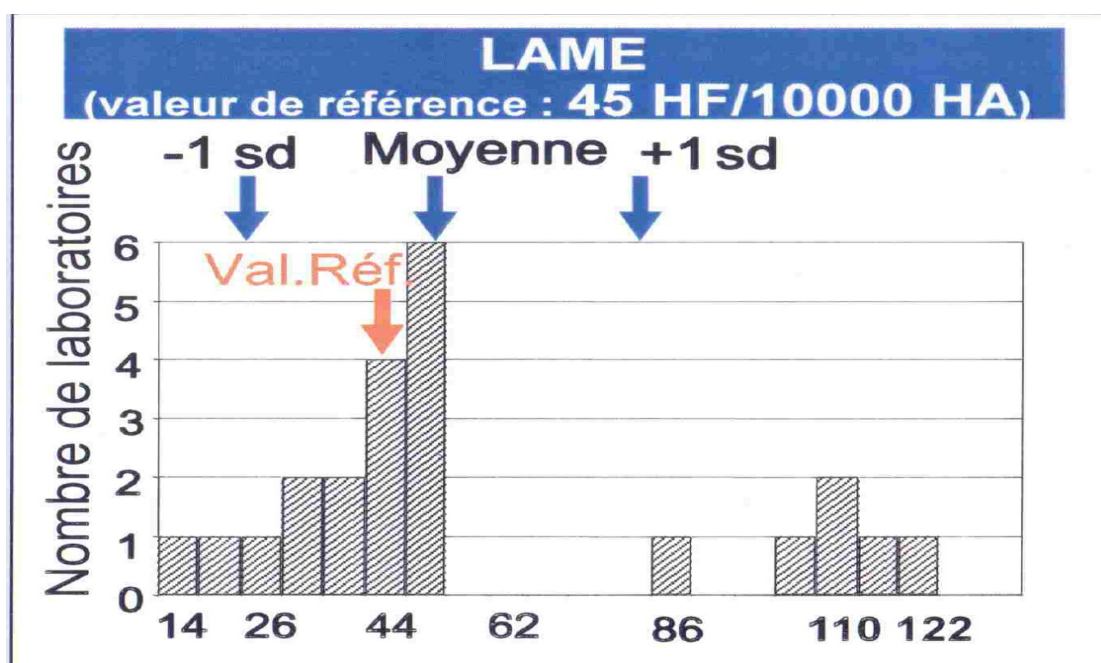


Figure 10: Résultats du contrôle de la qualité du test de Kleihauer selon Simonet et coll. (Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale ou CNRHP, Brossard et Mailloux, 2006)

72 opérateurs ont manipulé dans les 20 laboratoires et les résultats ont été très dispersés : les hématies fœtales comptées ont été de 14 à 122 d'un laboratoire à l'autre et, dans un même laboratoire, le compte a pu varier de 0 à 140 en fonction de l'opérateur.

Une autre raison de la difficulté de l'interprétation du frottis est le problème des hématies maternelles avec un contenu élevé en hémoglobine fœtale donnant des cellules appelées F cells ininterprétables. Ce phénomène survient notamment en cas d'hémoglobinopathies. Les tests de Kleihauer sont alors considérés à tort comme positifs.

Selon une étude de 2006 réalisée au CNRHP, sur environ 6 500 tests, la fréquence des tests ininterprétables s'élève à environ 3 %.

Dans 76 % des cas, on ne retrouve aucune hématie fœtale pour 10 000 hématies maternelles.

D'autres alternatives permettent de diagnostiquer et quantifier les hémorragies foeto-maternelles chez des femmes RH-1, notamment les techniques de comptage par cytométrie en flux des hématies fœtales immunomarquées anti-HbF, anti-RH1, anti-HbF et anti-anhydrase carbonique, soit le « *fetal cell count kit* » (Jaques Boy, France). Néanmoins le test de Kleihauer, beaucoup moins coûteux et très sensible - quoique peu spécifique -, reste, à condition d'être réalisé par un opérateur expérimenté, un très bon test de dépistage de l'HFM, en particulier de première intention.

## 2) Les RAI

La RAI, ou recherche d'anticorps irréguliers, est la mise en évidence d'anticorps dirigés contre les antigènes de globules rouges. Ces anticorps sont dits irréguliers, car ils ne sont pas présents chez tous les individus. En fonction de leur type, ils peuvent être potentiellement dangereux en transfusion et lors de grossesses. Ils sont présents dans la phase plasmatique du patient après une immunisation. Pour rappel, on peut les classer en deux grandes familles :

- les allo-anticorps dirigés contre des antigènes que le patient ne possède pas. Ce type d'anticorps se forme chez le patient après un premier contact avec l'antigène qu'il ne possède pas. Le premier contact se fait essentiellement par transfusion ou par grossesse. La formation de ces anticorps est prévisible ;
- les auto-anticorps dirigés contre des antigènes que le patient possède. Ils se forment suite à un dérèglement non prévisible du système immunitaire du patient, leur apparition ne peut donc pas être prévue.

Le principe est de mettre en présence le plasma du patient avec des hématies-test sélectionnées pour représenter la totalité des antigènes contre lesquels peuvent se former des anticorps potentiellement dangereux.

Concrètement, la RAI comporte deux étapes : le dépistage et l'identification en cas de dépistage positif.

### - *Dépistage*

Cette étape consiste à rechercher la présence d'un éventuel anticorps dans le sérum ou le plasma d'un individu. Elle s'effectue sur au moins 3 hématies de groupe O avec des caractéristiques particulières définies par la réglementation et permettant de détecter les anticorps des groupes sanguins autres que ceux du système ABO. Ce panel de dépistage doit permettre la détection des anticorps correspondants aux antigènes D, C, E, e, c, Kell, Cellano, Kp<sup>b</sup>, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, M, N, S, s, P<sub>1</sub>, Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Lu<sup>b</sup>. Le dépistage doit être également capable de repérer des anti-RH1 dès 20ng/mL.

Équivalence nomenclatures traditionnelle et numérique							
D	C	E	c	e	Kp <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>
RH1	RH2	RH3	RH4	RH5	Kell 4	FY1	FY2

suite									
Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	M	N	S	s	P <sub>1</sub>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	Lu <sup>b</sup>
JK1	JK2	MNS1	MNS2	MNS3	MNS4	P	LE1	LE2	LU2

*Tableau 4: Équivalence entre les nomenclatures traditionnelle et numérique pour les antigènes cités*

#### *- Identification*

Elle est réalisée lorsque le dépistage est positif ou lorsqu'on souhaite faire des recherches supplémentaires à la suite d'un conflit immunologique (MHNN). Le principe est le même que pour le dépistage mais s'effectue sur 10 hématies-test au minimum. Il existe également des panels de références ayant été testés pour des systèmes de groupes sanguins plus larges que les panels standards permettant ainsi de trouver des anticorps très rares.

Avant toute décision d'administrer des immunoglobulines anti-RH1, une RAI devra être effectuée pour s'assurer de l'absence d'immunisation anti-RH1. Elle devra aussi dater de moins d'une semaine. Cependant dans les situations d'urgence, il est inutile d'attendre le résultat de la RAI avant d'administrer les anti-RH1.

La durée de validité de la RAI dans le cadre transfusionnel est, elle, limitée à 72 heures, car il s'agit de la durée estimée de formation d'un allo-anticorps. Cette limite de temps est fixée par différents organismes internationaux de transfusion sanguine (American Association of Blood Banking, National Health Security, Société Française de Transfusion Sanguine...).

En France, le calendrier des RAI pour les femmes enceintes est le suivant :

Début de grossesse : double détermination du groupe sanguin ABO et du phénotype RH			
Femme RH1 jamais transfusée	Femme RH1 polytransfusée	Femme RH-1 non immunisée	Femme RH-1 immunisée
RAI au 2ème mois et avant l'accouchement.	RAI au 2ème, 6ème, 8ème, et 9ème mois.	RAI au 2ème, 6ème, 8ème, et 9ème mois et détermination du phénotype du géniteur.	Dosage des anticorps selon avis de l'hémobiologiste.

Tableau 5: Calendrier des RAI au cours de la grossesse.

## **IV Une nouvelle ère : prévention systématique et ciblée**

En résumé, la prévention ciblée permet de combattre efficacement la maladie hémolytique périnatale, ce qui est très appréciable tant du point de vue économique qu'éthique. Elle limite aussi les injections d'une immunoglobuline humaine, avec tous les problèmes d'approvisionnement et de risque potentiel de transmission de maladies infectieuses qui y sont liés, aux seuls cas qui paraissent le nécessiter.

Par ailleurs ce type de prévention reste imparfait, car comme nous l'avons vu, au cours de la grossesse et notamment son troisième trimestre, un nombre important d'hématies fœtales peut traverser le placenta et se retrouver dans le sang maternel sans facteur de risque apparent. Or ce phénomène engendre des cas qui échappent à la prévention ciblée. Il peut donc exister une allo-immunisation résiduelle chez des femmes RH-1 malgré la prévention ciblée, d'où la nécessité d'adjoindre une prévention dite « systématique » à celle-ci.

### **1) Principe et avantages**

Ce type de prévention s'ajoute à la prévention ciblée et consiste en l'administration systématique d'Ig G anti-RH1 aux femmes RH-1 au cours de leur 28ème semaine d'aménorrhée qu'il y ait ou non un facteur de risque associé.

Elle a été initialement instaurée au Canada il y a une quarantaine d'années puis d'autres pays l'ont adoptée. Elle complète les indications traditionnelles de la prévention ciblée. En France, c'est seulement à partir de 2006 qu'elle a été mise en œuvre à la suite d'un consensus entre le CNGOF et le CNRHP. Les deux organismes se sont mis d'accord pour recommander une injection d'une dose de 300µg d'Ig G anti-RH1 à la 28ème semaine d'aménorrhée chez toutes les femmes enceintes RH-1 en complément de la prophylaxie ciblée.

Cette nouvelle recommandation découle de constatations économiques, épidémiologiques, et éthiques.

### - *Épidémiologie*

La prévention ciblée seule et celle systématique et ciblée ont été évaluées en terme d'incidence d'immunisation anti-RH1 : l'incidence d'immunisation est de 0,8 à 2,2 % avec une prévention ciblée seule, contre 0,1 à 0,7 % avec une prévention systématique et ciblée. Ainsi l'application d'un protocole « systématique et ciblé » permet une réduction de l'immunisation de 60 à 80 % par rapport à une prévention ciblée seule. Les doses reconnues comme efficaces pour cette prévention systématique sont de 300µg IM en une injection à 28 semaines d'aménorrhée ou 2 injections de 100µg à 28 et 34 semaines d'aménorrhée.

Ces valeurs sont celles de Chilcott et coll. [7], qui ont réalisé en 2002 une méta-analyse portant sur l'analyse de 601 publications traitant de la prévention de l'allo-immunisation materno-foetale anti-RH1. L'objectif était d'évaluer l'efficacité clinique de la prophylaxie anténatale systématique chez des femmes RH-1 non immunisées, en comparaison avec l'absence de prophylaxie anténatale systématique (prévention ciblée seule). Malgré les biais observés, la conclusion de ces travaux est identique à celle que nous venons d'évoquer, à savoir l'avantage en terme de réduction de l'allo-immunisation d'une prévention systématique et ciblée.

En réalité, il existe deux protocoles de prophylaxie systématique possibles, laissant le choix aux différents pays qui la réalisent d'appliquer l'un ou l'autre.

Le premier repose sur l'injection successive de deux doses de 100µg d'Ig G anti-RH1 au cours du troisième trimestre de grossesse. Traditionnellement l'une se fait à la 28ème semaine et l'autre à la 34ème semaine d'aménorrhée. C'est notamment cette méthode qui a été adoptée au Royaume-Uni.

La seconde option consiste en une seule injection de 300µg d'Ig G anti-RH1 à la 28ème semaine d'aménorrhée comme c'est le cas aux États-Unis, au Canada ou en Allemagne, avec une variante : l'injection d'une dose unique de 200µg au cours de la 30ème semaine d'aménorrhée aux Pays-bas.

C'est le premier protocole qui a été validé en France... Cependant en pratique, c'est le second qui est appliqué car le prescripteur ne dispose plus depuis mai 2005 que d'une présentation à 300µg IM avec l'AMM pour cette indication.

Dans tous les cas et quel que soit le protocole utilisé, il persiste tout de même de rares échecs de la prévention, voire de l'administration, ou des cas d'hémorragie foeto-maternelle masquées...

### - *Économie*

Évaluer le rapport bénéfice/coût, c'est analyser toutes les conséquences d'une intervention ainsi que les prix encourus. Si les bénéfices sont supérieurs aux coûts, alors l'intervention est acceptable. Plusieurs éléments sont à prendre en compte pour décider du rapport bénéfice/coût de la prévention systématique. Cela englobe d'abord les coûts directs ou traitements, c'est-à-dire les injections de Rhophylac®, et les coûts indirects.

Ces derniers regroupent les dépenses en amniocentèses, transfusions in-utero, prélèvements sanguins, photothérapie et échanges plasmatiques, hospitalisations plus longues et plus intensives pour l'enfant, visites post-natales.

Cependant les calculs impliqués par cette approche sont complexes et les méthodes d'évaluation des bénéfices non monétaires, tels que les vies sauvées, rendent cette méthode difficile à mettre en œuvre pour prendre une décision objective et acceptable tant sur les plans économique qu'humain.

Ainsi, d'autres types d'évaluation existent en économie de santé. L'analyse coût/utilité par exemple permet d'évaluer les coûts et les bénéfices d'une intervention et de comparer différents programmes dans différentes zones traitées. L'unité de mesure la plus utilisée est en années-gagnées ajustée par la qualité de vie ou QALY. Les bénéfices mesurés évaluent à la fois le nombre d'années de vie gagné et la qualité de cette vie.

Enfin la méthode la plus utilisée est celle du rapport coût/efficacité. Elle compare des médicaments ou des interventions ayant des résultats standardisés (comme les années de vie gagnées par exemple). Les résultats sont souvent présentés sous forme de ratio (coût par vie sauvée).

Les choix de santé publique ne sont jamais simples, mais les méthodes d'évaluation économique bien que limitées offrent tout de même une idée plus claire de l'impact économique de certaines décisions.

En France, aucune étude sur la prévention Rhésus n'a encore abouti mais la littérature internationale a publié de nombreux articles sur le sujet. Au moment de la rédaction des RCP pour le Rhophylac® en 2006, 9 études internationales ont ainsi été retenues pour servir de base à la décision. Parmi elles, l'étude de Chilcott et coll. a permis au CNGOF de calculer, à partir des tarifs français, les coûts des différentes stratégies de prévention. Ainsi pour 790 000 naissances en 2004, dont 15 % de femmes RH-1 avec un prix par dose de Rhophylac® 300µg de 85,16 € (valeur 2004) et un coût de l'injection par l'infirmière de 2,9 €, on aboutit à un surcoût total de la prévention systématique par rapport à la prévention ciblée seule de 10 220 000 € par an.



Cependant il faut noter que la transposition de cette étude anglaise à notre système n'est pas chose facile, car les coûts de santé sont très différents dans nos deux pays.

Pilgrim [8] a révisé en 2009 le modèle de Chilcott en intégrant de nouveaux paramètres économiques et en intégrant à l'analyse d'autres protocoles de prévention anti-RH1, notamment celui faisant intervenir une injection unique de 300µg d'immunoglobulines anti-RH1 à la 28ème semaine d'aménorrhée qui est celui utilisé en France actuellement. Il en résulte que le rapport bénéfice/coût de cette dernière méthode est assez favorable dans le cas d'une femme primipare mais beaucoup moins avantageux chez les multipares. Cela tiendrait au fait que le risque de survenue d'une allo-immunisation foeto-maternelle est moindre chez une femme ayant déjà bénéficié de la prophylaxie anti-RH1 au cours d'une première grossesse. De même, il semblerait que la sévérité clinique d'une immunisation anti-RH1 soit moindre chez la multipare ayant déjà bénéficié d'une prévention lors d'autres grossesses. Ces deux points auraient néanmoins besoin d'être approfondis par d'autres études, et, en attendant, la femme multipare reste concernée par la prévention systématique et ciblée.

Population et fréquence des événements	Pour les femmes RhD négatif avec gestes à risque ou nouveau-né Rh positif (prévention ciblée)		Pour toutes les femmes RhD négatif (prévention systématique)		Pour les femmes RhD négatif avec un conjoint (père de l'enfant) RhD positif si connu dès le premier trimestre (prévention systématique)		Pour les femmes RhD négatif avec un fœtus RhD positif si connu après 28 SA (prévention systématique)	
	Hypothèse basse	Hypothèse haute	Hypothèse basse	Hypothèse haute	Hypothèse basse	Hypothèse haute	Hypothèse basse	Hypothèse haute
<b>Grossesses avant 14 SA</b>								
IVG	27 000	33 000	27 000	33 000	22 950	28 050	27 000	33 000
Fausse couches précoces (>7- 9 SA date apparition antigène D à la surface des hématies du fœtus) : 10-15 %	17 417	27 232	17 417	27 232	14 804	23 147	17 417	27 232
GEU (2 %), traumatisme abdominal	3 483	3 631	3 483	3 631	2 961	3 086	3 483	3 631
<b>Grossesses 14 - 28 SA</b>								
Biopsie de villosités choriales, amniocentèses (10-12 %)	12 476	14 971	12 476	14 971	10 605	12 725	12 476	14 971
Interruptions médicales de grossesse (7 %)	873	873	873	873	742	742	873	873
<b>Grossesses &gt; 28 SA</b>			125 383	125 383	106 576	106 576	75 230	75 230
Métrorragies, ponction de sang fœtal, version externe, traumatisme abdominal, MFIU, grossesses multiples (2 - 4 %)	3 739	9 971	3 739	9 971	3 178	8 475	2 243	5 983
<b>Mères avec nouveau-nés vivants et décédés</b>	<b>74 781</b>	<b>74 781</b>	<b>74 781</b>	<b>74 781</b>	<b>63 564</b>	<b>63 564</b>	<b>74 781</b>	<b>74 781</b>
<b>Total traitements anti-D</b>	<b>139 769</b>	<b>164 459</b>	<b>265 152</b>	<b>289 842</b>	<b>225 379</b>	<b>246 366</b>	<b>213 503</b>	<b>235 700</b>
<b>Nombre de doses</b>	<b>167 723</b>	<b>197 351</b>	<b>318 182</b>	<b>347 810</b>	<b>270 455</b>	<b>295 639</b>	<b>256 204</b>	<b>282 840</b>
<b>Nombre de doses en moyenne</b>	<b>182 537</b>		<b>332 996</b>		<b>283 047</b>		<b>269 522</b>	
<b>Nombre de doses (arrondi)</b>	<b>183 000</b>		<b>333 000</b>		<b>283 000</b>		<b>270 000</b>	

Tableau 6: Estimation du nombre de doses de Rhophylac® à administrer en fonction du Rhésus des parents et du type de prévention (INSEE première n° 118, 2007)

## - *Éthique*

L'intérêt éthique n'est bien sûr pas quantifiable mais compte tenu des risques (infectieux notamment) liés à la prévention actuelle, systématique et ciblée, il serait intéressant de ne réserver la prévention anti-RH1 qu'aux patientes potentiellement porteuses d'un fœtus RH1 (grâce au groupage du géniteur ou au génotypage fœtal non invasif).

### 2) Prévention systématique et/ou génotypage foetal

L'administration systématique d'Ig G anti-RH1 aux femmes RH-1 à 28 semaines d'aménorrhée représente un surcoût important par rapport à l'administration uniquement sur signes d'appel. Ce surcoût se justifie néanmoins par les allo-immunisations évitées et par la diminution attendue des formes graves.

En revanche, il pourrait être en partie compensé par l'utilisation du génotypage *RHD* fœtal sur sang maternel. Car il est à noter qu'un tiers des femmes RH-1 portant des enfants eux-mêmes RH-1, le nombre d'injections d'immunoglobulines pourrait être diminué d'autant. Le coût total d'un tel protocole dépendrait du montant du génotypage qui n'est pas encore renseigné dans les nomenclatures.

Indépendamment de ces questions économiques, la généralisation du génotypage fœtal permettrait d'éviter l'administration systématique d'Ig G anti-RH1 d'origine humaine.

## **V Recommandations pour la pratique clinique**

Aujourd'hui, une injection d'Ig G anti-RH1 est indiquée de façon systématique chez la femme RH-1, après qu'elle ait bénéficié d'une information claire et donné son consentement, en cas de situation à risque d'immunisation aux premier et deuxième trimestres de la grossesse et après l'accouchement d'un enfant RH1. C'est le collège national des gynécologues et obstétriciens français (CNOGF) qui a élaboré ces recommandations pour la pratique clinique à partir de principes méthodologiques définis par la HAS en 2005. [9]

La réalisation d'examens immuno-hématologiques, comme les RAI ou le test de Kleihauer, est obligatoire chez la femme enceinte depuis l'arrêté du 19 avril 1985. Les recommandations actuelles pour les mesures générales à prendre pendant la grossesse sont, notamment, une double détermination de groupe sanguin et une recherche d'agglutinines irrégulières (ou RAI) dès le premier trimestre de la grossesse chez

toutes les femmes.

\_ Si la femme est RH-1 et qu'elle n'est pas immunisée contre l'antigène anti-RH1, une information doit être délivrée sur l'immunisation anti-RH1 mentionnant le dépistage, le suivi, et la prévention. Dans le même temps, le groupe RH du géniteur doit être déterminé et un contrôle de RAI doit être réalisé régulièrement au cours de la grossesse, idéalement entre 26 et 28 semaines d'aménorrhée.

Lorsqu'une indication d'immunoprophylaxie se présente :

- si le conjoint est RH-1 et la paternité certaine, la prophylaxie anti-RH1 peut être évitée. Cela suppose que le clinicien dispose d'un document de laboratoire valide. Un entretien privé avec la patiente est réalisé puis retranscrit dans son dossier. Il confirme la vraie paternité du conjoint, mais il ne dispense pas du test de paternité.

- si le conjoint est RH1 ou inconnu, la prophylaxie anti-RH1 peut être proposée. Une information est alors donnée à la patiente et son consentement doit être systématiquement obtenu avant toute administration d'Ig G anti-RH1.

Avant de réaliser la prophylaxie on s'assurera, sauf en situation d'urgence, de l'absence d'immunisation anti-RH1 par une RAI de moins de 7 jours.

L'efficacité de l'immunoprophylaxie repose sur des posologies d'immunoglobulines anti-RH1 adaptées et sur leur injection dans les 72 heures après un événement potentiellement immunisant. Au-delà, un bénéfice peut quand même être espéré jusqu'à 30 jours même si son efficacité n'a pas été clairement évaluée.

\_ Si la femme a déjà développé une immunisation anti-RH1, l'administration d'immunoglobulines n'est plus indiquée dans la mesure où elle sera totalement inefficace sur l'allo-immunisation déjà établie. Dans ce cas, une programmation particulière des examens est nécessaire. Les dosages des anticorps maternels doivent être effectués à intervalles rapprochés en fonction du type d'anticorps, de leur concentration et du terme de la grossesse. Ce sont les hématologistes qui décident du rythme à adopter et qui établiront le lien avec les cliniciens du premier trimestre jusqu'à la fin de la grossesse.

\_ La femme RH1 sans antécédents et non immunisée, enfin, ne bénéficie d'une surveillance de sa grossesse identique à celle des femmes RH-1 que si elle a précédemment bénéficié d'une transfusion du fait d'une possible immunisation avec d'autres antigènes du système Rhésus. Toutefois la RAI du 9ème mois est souvent maintenue par les centres hospitaliers qui préfèrent s'assurer de l'absence d'immunisation avant toute césarienne urgente ou programmée. L'administration d'Ig G anti-RH1 n'est pas nécessaire pour elle.

Lorsque la galénique des Ig G anti-RH1 autorise la voie IM ou la voie IV, la voie IV sera toujours préférée pour la prophylaxie post-exposition, surtout lorsqu'on se rapproche du délai de 72 heures ou en cas d'hémorragie foeto-maternelle identifiée. Lorsqu'une nouvelle circonstance anténatale indiquant une immunoprophylaxie ciblée survient après une première administration anti-RH1, on peut s'abstenir de renouveler la prophylaxie dans un délai qui est fonction de la dose antérieurement reçue, à savoir 9 semaines pour 200µg et 12 pour 300µg, et du résultat des anti-RH1 résiduels.

L'abstention s'applique dans tous les cas où il n'existe qu'un risque modéré de passage d'hématies fœtales et seulement si le test de Kleihauer est négatif lors d'une circonstance à risque important de passage d'hématies fœtales.

### 1) Prophylaxie au premier trimestre de la grossesse

Une injection unique de 200µg d'Ig G anti-RH1 par voie IM ou IV est justifiée pour tous les événements détaillés dans le tableau n° 7. Il n'y a pas de limite inférieure d'âge gestationnel pour la réalisation de la prévention. Un test de Kleihauer - quantification des hématies fœtales dans le sang maternel - n'est pas possible avant l'injection d'immunoglobulines.

1 <sup>er</sup> trimestre	2 <sup>ème</sup> et 3 <sup>ème</sup> trimestres	
Risque modéré de passage d'hématies fœtales	Risque modéré de passage d'hématies fœtales	Risque important de passage d'hématies fœtales
<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Toute fausse couche spontanée (FCS) ou menace de FCS du 1<sup>er</sup> trimestre</li> <li>▶ Toute interruption de grossesse (IVG, IMG) quels que soient le terme et la méthode utilisée</li> <li>▶ Grossesse molaire</li> <li>▶ Grossesse extra-utérine</li> <li>▶ Métrorragies</li> <li>▶ Choriocentèse (biopsie de villosités choriales), amniocentèse</li> <li>▶ Réduction embryonnaire</li> <li>▶ Traumatisme abdominal</li> <li>▶ Cerclage cervical</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Métrorragies</li> <li>▶ Cerclage du col utérin</li> <li>▶ Menace d'accouchement prématuré nécessitant un traitement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Interruption médicale de grossesse</li> <li>▶ Fausse couche spontanée tardive</li> <li>▶ Mort fœtale <i>in utero</i></li> <li>▶ Version par manœuvres externes</li> <li>▶ Traumatisme abdominal ou pelvien (quel que soit le terme de la grossesse)</li> <li>▶ Intervention chirurgicale abdominale ou pelvienne (quel que soit le terme de la grossesse)</li> <li>▶ Amniocentèse, cordocentèse, placentocentèse</li> <li>▶ Accouchement quelle que soit la voie</li> </ul>

IVG : Interruption volontaire de grossesse / IMG : Interruption médicale de grossesse

Tableau 7: Événements requérant une prophylaxie anti-RH1 au cours de la grossesse dans le cadre de la prévention ciblée (Mannessier et coll.)

### 2) Prophylaxie au deuxième trimestre de la grossesse

Les circonstances conduisant à proposer une immunoprophylaxie anti-RH1 sont également listées dans le tableau n° 7. Dans les circonstances pouvant entraîner un passage important d'hématies fœtales, la posologie sera guidée par le test de Kleihauer

ou une quantification par cytométrie en flux, selon les règles du tableau n° 8 :

KLEIHAUER (HF/10000HA)	Dose de 200 µg		Dose de 300 µg		voie d'administration
	Doses	µg	Doses	µg	
0 - 4	1	200	1	300	IV directe
5 - 24	1	200	1	300	
25 - 44	2	400	1	300	
45 - 64	2	400	2	600	Perfusion sur 4 heures
65 - 84	3	600	2	600	
85 - 104	3	600	2	600	
105 - 124	4	800	3	900	
125 - 144	4	800	3	900	
145 - 164	5	1000	3	900	
165 - 184	5	1000	4	1200	
185 - 204	6	1200	4	1200	
205 - 224	6	1200	4	1200	
225 - 244	7	1400	5	1500	
245 - 264	7	1400	5	1500	
265 - 284	8	1600	5	1500	
285 - 304	8	1600	6	1800	

Tableau 8: Modes d'administration et doses de Rhophylac® à administrer en fonction des résultats du test de Kleihauer (J. Gynecol Obstét. Biol. Reprod., 2006)

HA : hématies adultes

HF : hématies fœtales

Pour toutes les autres circonstances, le test de Kleihauer n'est pas nécessaire et une dose de 200µg suffit.

### 3) Prophylaxie au troisième trimestre de grossesse

Toute femme enceinte RH-1 non immunisée contre l'antigène RH1 et dont le fœtus est connu ou présumé RH1 se verra proposer une injection d'Ig G anti-RH1 de 300µg par voie IM à 28 semaines d'aménorrhée (plus ou moins une semaine), toujours précédée d'une RAI datant de moins de 8 jours. Lorsque cette injection a été réalisée, il n'est pas nécessaire de répéter par la suite les RAI en vue de dépister une immunisation anti-RH1, et ce jusqu'à l'accouchement. Les RAI ultérieures sont à visée exclusivement transfusionnelle. Il est donc recommandé de réaliser cet examen avant admission pour l'accouchement. Si la patiente n'a pas reçu l'injection d'anti-RH1 à 28 semaines d'aménorrhée, alors la RAI du 8ème mois doit être maintenue et la prophylaxie ciblée est effectuée comme au cours du second trimestre.

#### 4) Recommandations lors de l'accouchement

Si l'enfant est RH1, un test de Kleihauer sera effectué sur un échantillon de sang maternel prélevé au minimum 30 minutes après la délivrance et la mère se verra proposer une prophylaxie anti-RH1. La posologie et la voie d'administration sont à adapter en fonction du test de Kleihauer. En cas d'oubli d'administration des immunoglobulines dans les premières 72 heures, l'injection peut tout de même être réalisée jusqu'à 30 jours après l'accouchement. En cas d'injection systématique d'Ig G anti-RH1 chez la mère à 28 semaines d'aménorrhée, le test de Coombs peut être positif chez le nouveau-né RH1 - dans près de 10 % des cas -. En l'absence de symptomatologie associée (ictère, anémie), aucune exploration complémentaire n'est à prévoir si le test d'élution confirme l'origine de ce test direct à l'antiglobuline positif. [10]

Le bon fonctionnement effectif du traitement prophylactique n'est connu que plusieurs mois après l'accouchement, car le délai de constitution d'une immunisation anti-RH1 est parfois très long et le respect de ce délai permet d'éliminer l'interférence des anticorps anti-RH1 passifs. Chez les femmes pour lesquelles une hémorragie foeto-maternelle avait été décelée, une nouvelle RAI est donc effectuée 6 mois après l'accouchement. Néanmoins ce délai peut être écourté si au moment de la naissance il a été découvert une immunisation anti-RH1 probable ou certaine, la RAI est alors avancée à 1 ou 2 mois après la naissance.

## **Chapitre III - Le Rhophylac® : un médicament dérivé du sang**



## **I Qu'est-ce-que le Rhophylac® ?**

Le Rhophylac® est une immunoglobuline humaine anti-RH1. Ce produit appartient au groupe très contrôlé des médicaments dérivés du sang ou MDS. Autrement dit, c'est un produit sanguin stable, doté d'une grande durée de conservation. Ces produits sanguins stables sont obtenus par fractionnement du plasma prélevé chez des donneurs immunisés. Le Rhophylac® est produit en Amérique du Nord et a d'abord été commercialisé en France par le Laboratoire Français du fractionnement et des Biotechnologies ou LFB puis par le laboratoire Behring. Il a obtenu son AMM en France en 2004, et, comme tous les produits d'origine humaine, il est soumis à une traçabilité et nécessite une information (document d'information pour les femmes enceintes) et un consentement préalable des personnes traitées. Le Rhophylac® existe sous deux présentations en seringues pré-remplies de 200µg /2mL ou 300µg/2mL. Les anti-RH1 spécifiques utilisées dans ce médicament appartiennent essentiellement aux sous-classes d'Ig G1 et G3. Par comparaison à la distribution de ces sous-classes dans le plasma humain, celles-ci sont enrichies dans Rhophylac®. Sa teneur en Ig A, elle, reste inférieure à 5µg par mL, ce qui lui confère une bonne tolérance mais n'empêche pas qu'elle reste contre-indiquée chez les patientes porteuses d'anticorps anti-Ig A.

## **II Mode d'obtention**

### *1) Fabrication*

Le Rhophylac® est fabriqué par combinaison de différentes étapes de chromatographie échangeuses d'ions à partir de pools de plasma humain prélevé chez des donneurs et donneuses américains, hyperimmunisés et rémunérés. L'utilisation de la chromatographie comme procédé de fabrication optimise l'utilisation d'une matière première rare et de grande valeur, car son rendement est plus élevé que celui d'autres méthodes de fragmentation. Le produit est ensuite stabilisé par l'addition d'albumine humaine et de glycine, puis, après filtration stérilisante, il est conditionné dans des seringues en verre.

Précisément, tout au long de la fabrication du produit, on assiste à des étapes successives de centrifugation, traitement par détergent, chromatographies, absorption, nanofiltration. Toutes ces étapes ayant un rôle bien précis détaillé dans la figure n° 11.

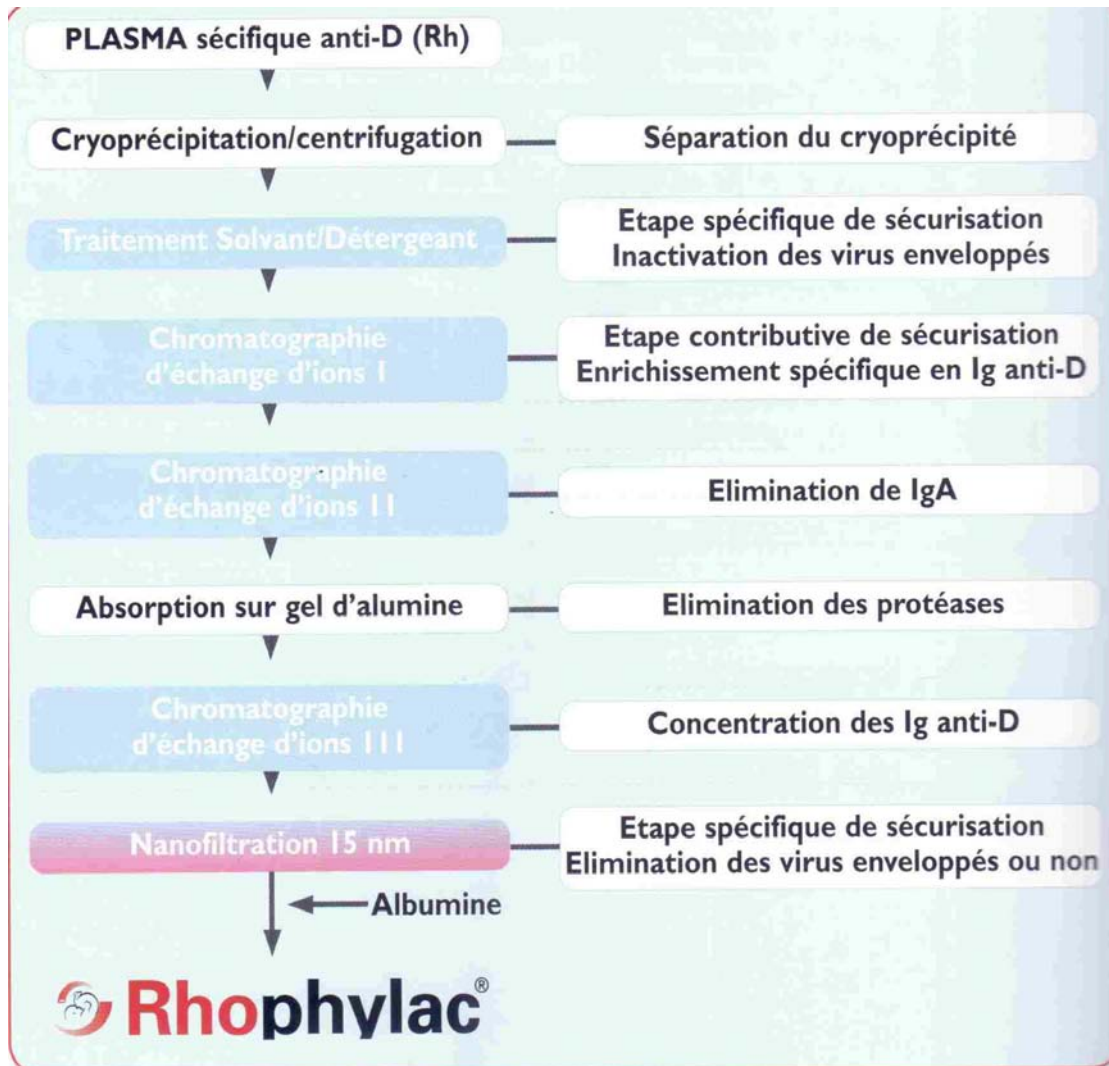


Figure 11: Schéma simplifié des étapes de fabrication du Rhophylac® et leur intérêt (Documentation LFB)

La sécurisation du Rhophylac® repose d'abord sur la qualité de la matière première : le plasma.

Celle-ci est en premier lieu garantie par une sélection médicale rigoureuse des donneurs comprenant notamment une information pré-don, un entretien médical, un examen clinique, et, à la suite de cela, l'exclusion des donneurs à risque.

Afin d'assurer une sécurité optimale, les critères sont actualisés en fonction des connaissances.

Virus	VIH	BVDV	PRV	Parvovirus (CPV/MVM)	Parvovirus (BPV)
Génome	ARN	ARN	ADN	ADN	ADN
Enveloppe	oui	oui	oui	non	non
Taille	80 – 100 nm	40 – 70 nm	120 – 200 nm	18 – 24 nm	18 – 24 nm
Traitement S/D <sup>1)</sup>	≥ 6,0	≥ 5,4	≥ 5,6	nt	nt
Etapes chromatographiques <sup>1)</sup>	4,5	1,6	≥ 3,9	2,5	nt
Nanofiltration <sup>1)</sup>	≥ 6,3	≥ 5,5	≥ 5,6	3,4	≥ 5,6 <sup>2)</sup>
Facteur de réduction globale <sup>1)</sup>	≥ 16,8	≥ 12,5	≥ 15,1	5,9	≥ 5,6

nt non testé

<sup>1)</sup> unités log<sub>10</sub>

<sup>2)</sup> Ce chiffre montre que le parvovirus est complètement éliminé par nanofiltration en présence d'anticorps réactifs (contrairement au CPV ou au MVM, le BPV réagit de manière croisée avec les anticorps anti-B19 présents dans l'organisme).

Figure 12 : Réduction du titre viral de différents virus (laboratoire ZLB Behring)

Vient ensuite l'étape du dépistage des marqueurs viraux. En effet, chaque don du sang est soumis au dépistage de l'antigène HBs, des anticorps anti-VIH 1 et 2 et anti-VHC et à un dépistage par amplification des acides nucléiques des virus enveloppés (VIH, VHB, VHC) et des virus non enveloppés (VHA, parvovirus B 19).

Tout aussi important, l'inactivation virale par traitement solvant/détergent. Cette étape vise à détruire les virus enveloppés qui auraient pu rester après centrifugation. L'enveloppe lipidique des virus enveloppés est très sensible à l'action d'un mélange de tri n-butyl phosphate et d'un détergent (le triton X-100). Elle est détruite après traitement, laissant donc le virus inactivé. A priori, le mélange solvant/détergent ne nuit pas à l'activité fonctionnelle du Rhophylac®.

Une série de chromatographies vise ensuite à extraire les Ig G non spécifiques. Les conditions chromatographiques sont choisies de façon à ce que les anticorps anti-RH1 soient retenus dans la colonne mais que la plupart des autres constituants plasmatiques ainsi que le solvant et le détergent utilisés pour l'inactivation virale soient éliminés par le procédé de lavage. C'est au cours de cette étape que plus de 98 % des protéines plasmatiques sont éliminées. Les Ig G anti-RH1 liées sélectivement à la colonne échangeuse d'ions sont alors éluées. Des étapes de chromatographie et d'adsorption supplémentaires permettent ensuite d'éliminer les Ig A et les protéases et contribuent à l'élimination des virus éventuellement présents. A la suite de cette série de chromatographies d'échanges anioniques, le mélange solvant-détergent est retiré par chromatographie en phase inverse.

Enfin survient la réduction de charge virale par nanofiltration. Le produit intermédiaire est filtré à travers un système de fibres creuses d'une porosité de 15 + ou - 2 nm. Ainsi, les virus qui auraient résisté aux différentes étapes d'élimination rencontrées jusque-là sont retenus par le filtre.

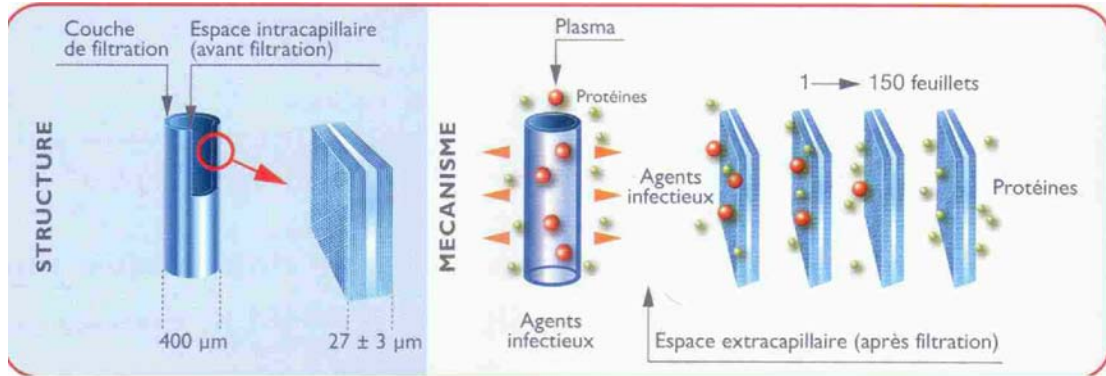


Figure 13: Les étapes d'inactivation/élimination virale dont l'efficacité peut être limitée face à des virus non enveloppés tels que le virus de l'hépatite A ou le parvovirus B19 (Documentation LFB)

## 2) Système d'assurance de la qualité

Les mesures de bonnes pratiques de fabrication ou cGMP (current Good Manufacturing Practice) assurent l'uniformité des méthodes de travail lors du prélèvement, du contrôle et du traitement des dons de sang. Le traitement informatique des données permet en outre de maximiser la sécurité en écartant le risque d'échanges involontaires et d'erreurs d'étiquetage. Pour valider la production de Rhophylac®, il convient d'abord de diviser le procédé de fabrication en plusieurs étapes. Chaque étape est reproduite en laboratoire en s'assurant que les opérations effectuées à cette échelle correspondent dans la mesure du possible aux conditions de la production industrielle. La différence entre le titre viral initial et le titre final permet de calculer le facteur de réduction logarithmique (FRL). FRL 4 signifie que le titre viral est réduit de 10 000 fois. Les valeurs FRL déterminées à chaque étape peuvent alors être additionnées afin d'obtenir le FRL de tout le processus.

## III Mode d'action

Comme nous le savons bien maintenant, le passage d'hématies fœtales RH1 à travers le placenta pendant la grossesse peut entraîner une immunisation anti-RH1 de la part de mères RH-1 non immunisées au départ. Nous rappelons aussi que le Rhophylac® contient des anticorps spécifiques de type Ig G dirigés contre l'antigène RH1 des érythrocytes humains. Or, il s'avère que l'immunisation passive avec l'Ig G anti-RH1 va prévenir l'allo-immunisation RH1 dans plus de 99 % des cas, à condition qu'une dose suffisante d'Ig G anti-RH1 soit administrée, et, ce, suffisamment tôt après l'exposition aux hématies fœtales RH1. Bien que le mécanisme exact par lequel l'Ig G

anti-RH1 supprime l'immunisation contre les hématies RH1 ne soit pas encore élucidé, cette suppression pourrait être liée à l'élimination des hématies de la circulation maternelle avant que celles-ci n'aient atteint les sites immunocompétents. Une autre hypothèse fait intervenir des mécanismes plus complexes impliquant la reconnaissance de l'antigène étranger et la présentation de cet antigène par les cellules appropriées aux sites compétents, en présence ou absence d'anticorps. On aurait ainsi une inhibition spécifique de la réponse immunitaire anti-RH1. Dans les deux cas, il ne s'agit que d'une inhibition de la réponse immune primaire.

## **IV Avantages et inconvénients**

Force est de constater le premier avantage de ce type de médicament qui est celui de disposer de molécules d'origine humaine, ce qui limite les risques de réaction immunitaire : les effets indésirables sont minimes, car ils ne comportent que de très rares réactions allergiques et d'hypersensibilité.

Il en va de même pour le risque viral lié à l'utilisation des immunoglobulines qui est extrêmement faible du fait des traitements appliqués pour éliminer les agents pathogènes. Néanmoins une possibilité de transmission infectieuse ne peut jamais être totalement exclue, notamment avec les pathogènes émergents. D'ailleurs d'autres préparations anti-RH1 ont été liées à des épidémies d'hépatite C en Irlande, en 1977 et au début des années 1990, et en Allemagne. Il est important de le rappeler toutefois, aucun cas de transmission de prions par des médicaments dérivés du sang n'a été rapporté à ce jour en France. Malgré cela les RCP exigent que l'exposition inutile à des produits dérivés du sang soit évitée autant que possible et que la traçabilité des administrations d'immunoglobulines soit assurée, avec un archivage pendant 40 ans.

Le problème posé est le suivant : le Rhophylac® ne contient malheureusement pas que des Ig G anti-RH1, et, à partir de là, il est possible d'imaginer que des pathologies autres qu'infectieuses puissent être transmises par l'administration du produit. En effet, il reste malgré le procédé de purification plusieurs autres composés comme d'autres immunoglobulines, comme les Ig A, les anti-RH2 et les anti-RH3. En ce qui concerne les anticorps anti-RH2 et anti-RH3, ils ne sont pas délétères mais leur présence doit être connue des biologistes pour qu'ils puissent interpréter au mieux les résultats de RAI post-injection de Rhophylac®.

Autre aspect négatif, la fabrication du produit n'est possible que s'il existe un nombre suffisant de donneurs immunisés aptes au don. Des difficultés d'approvisionnement sont donc possibles dans la mesure où personne ne peut prévoir la quantité de dons qui sera réalisée sur une période donnée avec certitude. Le traitement par les Ig G anti-RH1 recombinantes ou monoclonales n'étant pour l'instant pas disponible, celui proposé en prophylaxie pour les femmes RH-1 consiste obligatoirement en une injection de Rhophylac®. En continuant sur cette idée, il est logique d'envisager qu'un produit aussi rare soit aussi un produit relativement cher, avec un prix en France de 60,89 € pour le 200µg et de 84,62 € pour le 300µg (valeurs 2013), pris en charge à

100 % par l'assurance maladie.

## **V Traçabilité**

Rhophylac® est un médicament dérivé du plasma qui tombe sous le décret du 6 mai 1995. Il nécessite à ce titre une traçabilité qui doit être effectuée par tout membre d'une profession de santé qui administre le médicament et par le pharmacien, d'après le code de la santé publique.

Cette traçabilité va s'exercer à différents niveaux : fabrication, distribution et administration. Ceci dans le but d'identifier rapidement les dons à partir desquels a été fabriqué un lot donné, les lots administrés à un patient donné (par transmission ascendante), ainsi que les patients auxquels un lot donné a été administré (transmission descendante). En pratique, cela s'effectue grâce aux étiquettes de traçabilité. Le conditionnement d'un médicament dérivé du sang comporte en effet 3 étiquettes détachables indiquant les informations suivantes :

- Dénomination
- Nom de l'entreprise qui le fabrique
- Numéro du lot
- Code barre
- Numéro d'AMM

Une des étiquettes détachables doit être apposée sur le conditionnement extérieur (étui) et les deux autres sur le conditionnement primaire (blister).

Une informatisation est possible grâce à des logiciels agréés par le Ministère de la Santé. Selon l'arrêté du 24 décembre 1997 relatif aux traitements automatisés des informations dans la pharmacovigilance exercée sur les MDS :

- les logiciels doivent permettre une interrogation de toutes les données enregistrées ainsi qu'une édition ;
- l'édition doit être faite au moins 1 fois par semaine ;
- il faut réaliser des sauvegardes régulières, et cela nécessite une demande d'avis ou déclaration à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés.

En cas de rappel de lot, la circulaire du 9 avril 1998 nous apprend que si le risque est théorique, il faut avertir les médecins prescripteurs seuls, par mesure de précaution ; en revanche, si le risque est avéré, il convient d'avertir systématiquement les prescripteurs et les patients.

## 1) A l'hôpital

Le médicament est délivré par la pharmacie à usage intérieur (ou PUI). Lors de la délivrance, le pharmacien hospitalier appose l'étiquette détachable du conditionnement extérieur sur le bordereau de délivrance et d'administration. Une copie du bordereau est conservée par la PUI jusqu'au retour de l'original.

Lors de l'administration, la personne qui administre le médicament appose une étiquette détachable du conditionnement primaire sur l'ordonnance conservée dans le dossier médical et l'autre sur le bordereau qui sera renvoyé à la pharmacie où il sera archivé pendant 40 ans. Dans le cas où Rhophylac® n'a pas été administré, il est retourné à la pharmacie ainsi que son bordereau à usage intérieur.

Plus précisément, chacun a un rôle à jouer tout au long du parcours du MDS à l'hôpital :

### *- Le médecin*

- \* Informe le patient.
- \* Demande une recherche de groupe sanguin et une RAI, dont il note précisément la date de réalisation.
- \* Rédige une prescription nominative identifiée, datée, signée avec les nom, prénom, date de naissance, sexe et nom de jeune fille de la patiente ainsi que son propre nom, la date et la signature.
- \* renseigne le type de produit et la quantité prescrite.

### *- L'infirmière*

- \* Vérifie l'existence d'une carte de groupe.
- \* Vérifie que la RAI date d'il y a moins de 3 jours pour l'administration.
- \* Joint la carte de groupe à la feuille de demande de produits sanguins.
- \* Réalise les examens pré-transfusionnels décidés par l'hôpital.
- \* Si la RAI date de plus de 3 jours, prélève de nouveau sur tube sec de 7 ml avec mention « urgent ».
- \* Retourne le produit à la pharmacie s'il n'est pas administré.
- \* Effectue les contrôles avant administration : identité du patient, concordance prescription et produits délivrés, aspect du produit, date de péremption.

Le responsable d'une erreur dans ce circuit interprofessionnel est la personne qui administre.

- Le pharmacien

- \* Transporte le produit dans des boîtes isothermes lors de la dispensation.
- \* Remet les produits en main propre à l'infirmière.
- \* Se charge de la traçabilité informatique.
- \* Conserve les bordereaux de délivrance et d'administration.

Pour que la traçabilité soit correctement réalisée, il existe des moyens :

- Informatiques :

- \* centralisés ou
- \* individualisés

- Manuels :

- \* les vignettes

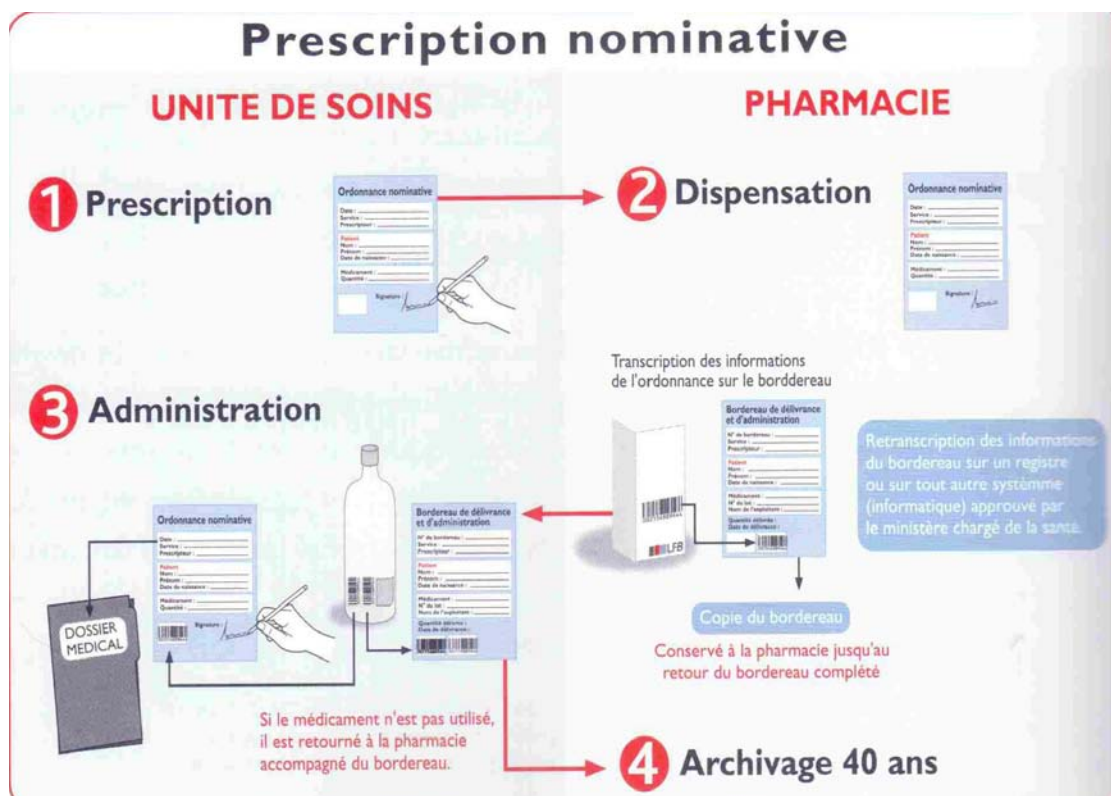


Figure 14: Circuit des MDS à l'hôpital (laboratoire LFB)



## 2) En ville

Le médicament est délivré par un pharmacien d'officine. Lors de la délivrance, celui-ci appose l'étiquette détachable du conditionnement extérieur sur un registre spécial coté et paraphé.

Mois de \_\_\_\_\_ 19\_\_\_\_

Nom et adresse du prescripteur	N° d'ordre	Formes	Prescripteur / Etiquette détachable	Quantité	Nom et adresse du malade	Date de naissance

Figure 15: Registre des MDS à compléter et conserver dans les officines (pharmacie Charroyer à Custines, 2013)

Lors de l'administration, le professionnel de santé qui administre le médicament doit apposer une étiquette détachable du conditionnement primaire sur l'ordonnance conservée par le patient. Lorsque le Rhophylac® est administré par un médecin, celui-ci appose l'autre étiquette dans le dossier médical s'il existe.

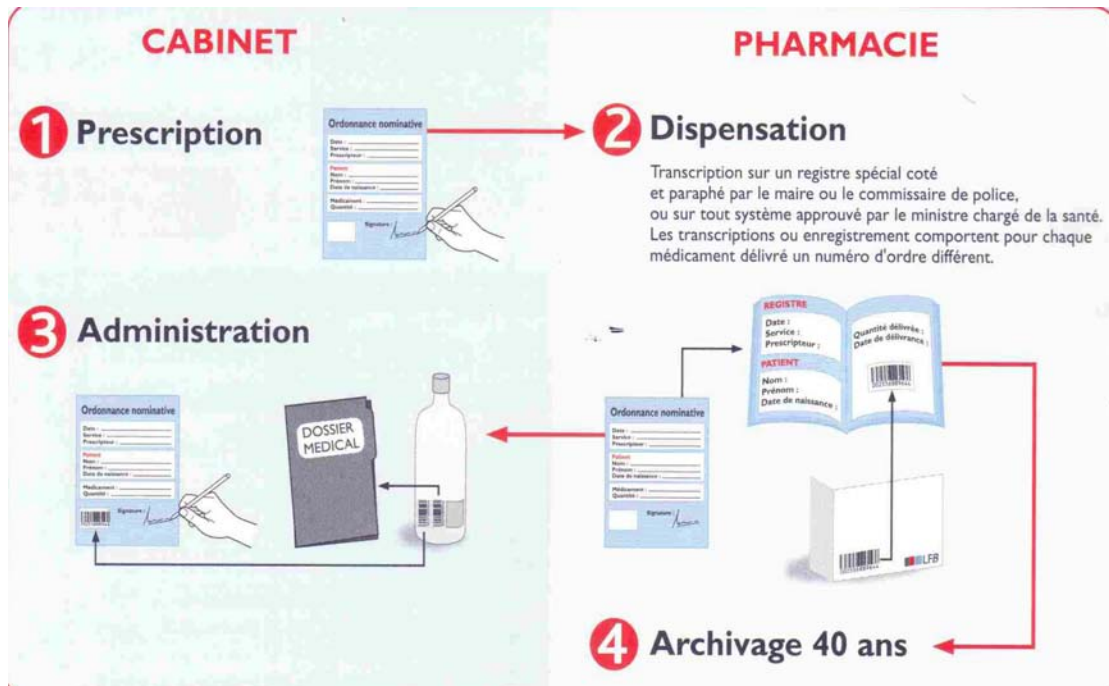


Figure 16: Circuit des MDS en ville (laboratoire LFB)

## VI Les immunoglobulines monoclonales : solution d'avenir ?

L'utilisation d'immunoglobulines monoclonales anti-RH1 pour la prophylaxie est à l'étude depuis plusieurs années. L'intérêt en serait double : permettre une parfaite sécurité biologique et éviter les risques de pénurie d'immunoglobulines d'origine humaine. Malheureusement, les anticorps testés jusqu'à présent ne permettraient pas encore une élimination satisfaisante des hématies RH1.

D'autres études cliniques avec d'autres anticorps monoclonaux sont en cours. Là encore, même si cette option offrirait effectivement une sécurité virale renforcée par rapport à ce qui se passe actuellement, elle ne serait pas parfaite dans la mesure où les molécules produites par recombinaison seraient plus ou moins proches de la molécule native, pouvant entraîner une réaction du système immunitaire. De plus, en fonction des produits, l'efficacité est parfois moindre avec ce type de médicament non humain.

## **Chapitre IV- Place du diagnostic anténatal**

Les développements récents en matière de caryotypage moléculaire ont eu des conséquences importantes sur les différentes approches de diagnostic prénatal invasives ou non. Nous sommes à l'aube d'une ère où il sera possible de connaître la majorité des caractéristiques importantes d'un enfant avant que celui-ci ne voit le jour. Cette réalité proche représente certes une avancée médicale mais elle pose aussi un problème important sur le plan de l'éthique. Pour rappel, il est à ce jour interdit de réaliser un caryotype fœtal à la recherche d'anomalies chromosomiques, excepté le cas du dépistage de la trisomie 21 sur signes d'appel (avis 120 du CCNE). Quoiqu'il en soit, le diagnostic prénatal invasif semble désormais obsolète et la recherche d'appartenance à un groupe Rhésus dans le cadre d'une AIFM RH1, en particulier, réclame nécessairement un diagnostic non invasif.

## **I Historique à partir du liquide amniotique**

### *1) principe*

L'amniocentèse consiste à prélever stérilement du liquide amniotique pendant la grossesse. Elle est possible à partir de 13 à 14 semaines d'aménorrhée et jusqu'au terme de la grossesse. Le médecin introduit, sous contrôle échographique permanent, une aiguille à travers le ventre maternel. Le geste se fait sans anesthésie et 15 à 20mL de liquide sont ainsi prélevés et envoyés dans un laboratoire spécialisé pour analyse.

La plupart du temps, le prélèvement est effectué pour analyser et compter les chromosomes fœtaux mais il peut avoir d'autres indications. Ces dernières sont restreintes et varient selon le terme.

Avant de réaliser cet examen invasif, il faut s'assurer que certains points ont été traités :

1. Évaluation du risque pour l'enfant à naître d'être atteint d'une maladie d'une particulière gravité, compte tenu des antécédents familiaux ou des constatations médicales effectuées au cours de la grossesse.
2. Information de la femme enceinte sur les caractéristiques de cette maladie, les moyens de la détecter, les possibilités thérapeutiques et sur les résultats susceptibles d'être obtenus au cours de l'analyse.
3. Information de la patiente sur les risques inhérents aux prélèvements, sur leurs contraintes et leurs éventuelles conséquences.

Après qu'elle ait posé toutes les questions qu'elle souhaitait poser, il sera demandé à la patiente de signer une fiche de consentement (imposée par la loi) qui sera indispensable pour l'analyse des prélèvements au laboratoire.

Actuellement, les techniques d'amniocentèse et de prélèvement de villosités chorales (PVC) ont tendance à être décrites dans les directives nationales et locales, mais certains aspects, notamment le choix des instruments, reposent principalement sur les préférences personnelles de l'opérateur. Une enquête sur la pratique dans les centres spécialisés au Royaume-Uni menée par Carlin et coll. [11] a révélé de grandes variations ; par conséquent, toute standardisation d'un élément de la technique pourrait influencer sur l'innocuité de la procédure.

## 2) Limites

La ponction est un geste invasif qui peut avoir de nombreuses conséquences graves :

- elle peut favoriser une infection amniotique,
- provoquer un accouchement prématuré quand elle est tardive,
- l'aiguille peut toucher le placenta, le cordon ou le fœtus et provoquer un avortement dans 0,5 à 1 % des cas.

Le risque de fausse couche est maximum dans les 8 à 10 jours qui suivent une amniocentèse. Cela peut se manifester par des douleurs, des saignements ou un écoulement de liquide qui doivent immédiatement conduire la patiente à consulter son obstétricien. Mais parfois aucune manifestation particulière n'augure de ce qui va se passer.

Précisément, quand le placenta est localisé à l'avant de l'utérus, l'examen est difficile, avec un risque de passage de globules rouges fœtaux dans la circulation sanguine maternelle. Lorsque les conditions techniques ne sont pas favorables à la réalisation de ce test, il peut ainsi être reporté de 8 à 10 jours.

En plus de tout cela, la ponction peut être blanche, ne pas ramener de liquide, ou même contenir du sang, ce qui la rend ininterprétable. D'autre part, la fiabilité des résultats est bonne, mais non absolue : il existe un risque d'erreur.

Après une amniocentèse, une grossesse normale peut devenir une grossesse à risques. C'est donc un geste dont il faut bien peser les indications, de plus en plus strictes. Chez la femme Rhésus négatif notamment, une ponction amniotique doit toujours être suivie d'une injection intraveineuse de gammaglobulines anti-RH1 dans un délai d'une demi-heure à deux heures après l'examen.

Le risque de perte fœtale ou de déclenchement/majoration d'une allo-immunisation foeto-maternelle est apparu de moins en moins acceptable depuis que des politiques de dépistage - de la trisomie 21, par exemple - par analyse des marqueurs sériques maternels ont été introduites. [12]. Malgré l'aide diagnostique qu'elle peut apporter, l'amniocentèse est donc à éviter autant que possible.

## II Nouveau à partir d'un simple prélèvement sanguin maternel

### 1) Les prémices

L'équipe du professeur Lo a été la première à découvrir l'existence d'ADN fœtal dans le plasma et le sérum maternel, en 1997. L'ADN issu du plasma, du sérum et même de cellules sanguines nucléées de 43 femmes enceintes a été soumis à une PCR pour détecter de l'éventuel ADN fœtal mâle circulant (pour les femmes portant des fœtus de sexe masculin). Des séquences du gène Y ont ainsi été détectées chez 24 femmes au niveau des échantillons de plasma et 21 pour les échantillons de sérum. Ces séquences ne pouvaient provenir que du fœtus puisque absentes chez la mère. Ces résultats ont été obtenus avec seulement 10 $\mu$ L d'échantillon. Pour un même volume, si seul l'ADN des cellules du sang nucléées est extrait, seuls 5 des 30 échantillons donnent un signal positif pour la détection des séquences du gène Y. Aucune des 13 femmes portant un fœtus femelle et aucune des femmes non enceintes servant au contrôle n'ont donné d'échantillon positif, que le prélèvement provienne du sérum, du plasma ou de cellules nucléées. C'est suite aux résultats de cette expérience que Lo et coll. ont déduit la possibilité d'un diagnostic prénatal non invasif ou DNPI. [13] Précisément, cet ADN fœtal représentant un fragment d'environ 200 pb, est visible dans la circulation maternelle dès 9 à 10 semaines d'aménorrhée et il en disparaît quelques heures seulement après l'accouchement.

Par la suite, une autre étude de 2004 a pu démontrer que l'ADN fœtal libre retrouvé chez la mère provenait en fait du trophoblaste. L'idée avait déjà été émise en 2002 par Zhong que l'ADN fœtal libre ne provenait peut-être pas des cellules du sang. [14]

En effet, il est parfois arrivé de ne pas retrouver la séquence du gène SRY dans le plasma de femmes enceintes alors que l'échographie laissait voir des organes génitaux masculins. Le caryotype était 45,X après analyse directe du trophoblaste et 45, X/46, XYp après culture et dans tous les autres tissus fœtaux. Comme la séquence SRY est absente chez la mère et dans le cytotrophoblaste, il a été présumé que l'ADN foetal libre provenait des cellules du trophoblaste. Mais le cas dont nous parlons étant exceptionnel, l'impact pour la détermination du sexe du fœtus par l'analyse du plasma maternel reste de toute manière minime. Ce savoir apporté par Flori et coll. [15] démontre tout de même l'importance de compléter et confirmer les résultats du génotypage par une échographie.

Plus récemment, il a été démontré que des ARNs spécifiquement exprimés au niveau placentaire (ARNs fœtaux) étaient également présents dans la circulation maternelle.

La relative simplicité et la robustesse de l'analyse de l'ADN fœtal circulant ont permis au DPNI de devenir une réalité clinique quelques années seulement après la

découverte du phénomène physiologique qu'est le transfert d'ADN et d'ARN fœtal dans la circulation sanguine maternelle. Cet ADN équivaut à quelques copies jusqu'à plusieurs centaines de copies de génome fœtal par mL de plasma. Vraisemblablement, ce transfert débute dès l'implantation de l'embryon mais ne devient détectable avec les techniques actuellement disponibles qu'à partir de la 12 ou 15ème semaine d'aménorrhée. La concentration d'ADN fœtal dans le sang maternel augmente tout au long de la grossesse, puis il disparaît très rapidement (en quelques heures) après l'accouchement, et, point essentiel, ne persiste pas d'une grossesse à une autre dans le sang maternel.

## 2) Le génotypage RHD fœtal

### - Principe

Les applications actuelles du DPNI par l'analyse de l'ADN plasmatique concernent l'analyse de gènes totalement absents du génome maternel et dont la détection est relativement simple car indépendante de la présence majoritaire de l'ADN maternel dans le plasma.

Dans notre cas, le DNPI a été rendu possible grâce à la découverte du mécanisme moléculaire associé au groupe sanguin Rhésus. Il a été en effet démontré que le phénotype RH-1 résulte majoritairement, dans la population caucasienne, d'une délétion complète du gène *RHD*. La mise en évidence de séquences dérivées de ce gène dans le plasma de la femme enceinte RH-1 est par conséquent la signature d'un ADN fœtal et permet ainsi de définir le génotype *RHD* positif du fœtus. Par défaut, son absence révèle le plus souvent la présence d'un fœtus de génotype *RHD* négatif.

Cette application est donc en tout point similaire à celle, plus ancienne, de la détermination du sexe fœtal par la détection de séquences dérivées du chromosome Y. De fait, dans de nombreuses études menées sur la fiabilité des diagnostic de Rhésus fœtal à partir de plasma maternel, les deux sont liés, permettant ainsi de disposer d'un étalon interne.

- Free DNA fetal kit Rhesus D

La détermination du Rhésus par génotypage est réalisée en France depuis plusieurs années : une trousse diagnostique (ou kit) «*Free DNA fetal kit rhesus D* » (Biorad, États-Unis) pour PCR en temps réel bénéficie d'un marquage CE depuis juillet 2007. Les cibles amplifiées sont les exons 5, 7 et 10 du gène *RHD*. Des tests dits « maison », développés et réalisés par des laboratoires, existent et s'appuient également sur la réalisation d'une PCR en temps réel, les cibles amplifiées étant initialement l'exon 10

seul, puis les exons 7 et 10, voire même les exons 5, 7 et 10 du gène *RHD*. Cette dernière option permet de détecter très spécifiquement un grand nombre de variants du gène *RHD*.

La sensibilité et la spécificité du test sont souvent supérieures à 95 %. Les amplicons sont révélés grâce à des sondes d'hydrolyse spécifiques de chaque exon amplifié. Des contrôles positifs, négatifs, blancs et contrôles d'extraction sont réalisés en parallèle.

Plus spécifiquement, le kit «*Free DNA fetal kit Rhesus D* » en lui-même est constitué de :

- un contrôle RH1 (+)
- un contrôle RH-1 (-)
- un contrôle interne d'extraction et d'amplification (exon mais)
- l'exon 5 du gène *RHD* primers sens/antisens
- l'exon 7 du gène *RHD* primers sens/antisens
- l'exon 10 du gène *RHD* primers sens/antisens

En plus de cela, s'ajoutent pour l'analyse des éléments nécessaires non fournis :

- un kit pour extraction d'ADN

Il en existe plusieurs dont par exemple ceux utilisés à l'EFS Lorraine-Champagne : «*MinElute Virus Vacuum kit* » et «*QIAmp DSP virus kit* ».

- des réactifs PCR en temps réel en fonction de l'appareillage utilisé : notamment le kit «*LightCycler Taqman Master* » pour le LightCycler 480 utilisé à l'EFS Lorraine-Champagne, et le kit «*Faststart Taqman ProbeMaster* » pour les autres appareils.

Il existe également des consommables pour thermocycleur PCR en temps réel avec système capillaire en verre de 20µL ou avec plaque multipuits.

Des pipettes et embouts spécifiques à filtre pour PCR

Parallèlement à cela, la réaction doit aussi avoir lieu dans des locaux adaptés qui séparent bien les phases de pré- et post-amplification. Ces locaux et le personnel doivent bénéficier d'une autorisation de l'ARS.



- Polymerase chain reaction

De façon générale, la polymerase chain reaction ou PCR est une technique de répllication ciblée in vitro.

Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures, ce qui est généralement suffisant pour une utilisation ultérieure (ici une simple détection).

Le principe est le suivant : il s'agit de réaliser une succession de réactions de répllication d'une matrice double brin d'ADN. L'astuce consiste à utiliser les produits de chaque étape de synthèse comme matrices pour les étapes suivantes, l'amplification obtenue est alors exponentielle.

Imaginée par K. Mullis en 1985 (Prix Nobel 1993), la technique connaît un essor considérable à partir de la commercialisation, en 1988, d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées (la Taq polymérase), qui permet une automatisation de la technique.

Avant la réaction, tous les réactifs de la PCR sont introduits dans le même tube. Il s'agit de l'ADN à amplifier, des oligonucléotides (ou amorces) spécifiques du segment d'ADN voulu, de l'ADN polymérase (ici la Taq polymérase) et enfin du mélange des quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN. Tous sont ajoutés en large excès par rapport à l'ADN cible.

La séquence cible représente le segment d'ADN qui sera amplifié (dans notre cas les exons 5, 7 et 10), elle est déterminée par le choix du couple d'amorces.

Une PCR est réalisée dans un appareil programmable appelé « thermocycleur ». Le thermocycleur se contente de placer l'échantillon aux températures voulues pendant les durées programmées, et ce à plusieurs reprises, en effectuant des cycles. Un relevé de températures indique en permanence la température qui règne dans le thermocycleur.

Déroulement d'un cycle de PCR :

Chaque cycle de PCR est constitué de trois phases distinctes ayant lieu à trois températures différentes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation (ou extension des amorces).

Dans un premier temps, pendant l'étape de **dénaturation**, celle-ci va monter à 95 °C. A cette température les liaisons faibles qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN.

On passe alors à l'étape suivante qui est l'**hybridation** des amorces sur l'ADN simple brin. Ce phénomène repose sur le principe de l'appariement des bases complémentaires.

Le choix de la température d'hybridation se fait en fonction de la longueur et de la composition de la séquence des amorces. Mais elle est, de toute façon, inférieure à la température de dénaturation.

Le thermocycleur est ensuite porté à une température de 72 °C pour permettre de passer à l'étape d'**élongation**.

Les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice. La polymérisation se fait par incorporation successive des désoxyribonucléotides, présents dans le mélange en large excès. Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice.

Les ADN polymérase sont des enzymes qui synthétisent l'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Celles utilisées en PCR sont extraites de bactéries vivant naturellement à des températures élevées comme les sources hydrothermales du fond des océans. Ces polymérase ne sont pas dénaturées par la chaleur. La plus connue est la Taq polymérase, elle est thermostable et peut rester dans le milieu réactionnel alors même que les températures y passent de 37 à 95 °C.

La Taq polymérase possède une activité 5' exonucléasique. Au cours de la PCR en temps réel, elle va dégrader les amorces marquées, en libérant ainsi, lors de l'élongation, des fluorochromes dont la quantité est directement proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisé.

De façon théorique, en partant de deux brins d'ADN initiaux, on obtient 4 segments d'ADN à la fin du premier cycle, 8 à la fin du second, 16 à la fin du troisième et jusqu'à  $2^n$  à la puissance  $n$  après  $n$  cycles, soit plus d'un million de copies en une vingtaine de cycles.

Malgré l'intéressant apport qu'il représente en biologie moléculaire, ce test conserve ses limites. La première étant qu'il a été validé exclusivement pour l'analyse de plasmas humains prélevés sur les anticoagulants EDTA ou ACD. Les échantillons ne doivent surtout pas être collectés sur héparine, car il s'agit d'un inhibiteur de la PCR.

Au cours des processus d'amplification qui sont de nature enzymatique, il existe en effet un risque de réduction de l'efficacité de l'amplification si des substances inhibitrices sont présentes dans l'échantillon clinique.

Une autre difficulté réside dans le fait que l'ADN fœtal est « dilué » au sein d'un ADN largement majoritaire et hautement homologue qu'est l'ADN libre circulant d'origine maternelle, sans qu'on puisse l'isoler spécifiquement pour l'instant. Ne pourront être recherchées et/ou étudiées que les seules séquences géniques fœtales absentes ou différentes du génome maternel.

En cas d'absence d'amplification des segments recherchés, il peut s'agir d'une réelle absence, mais aussi d'un résultat faussement négatif correspondant à un manque d'ADN fœtal dans le plasma maternel ou d'un défaut de sensibilité de la méthode PCR. Il est donc indispensable d'inclure des contrôles internes témoignant de la bonne amplification de l'ADN.

Compte tenu du risque secondaire à un résultat faussement négatif, le dépistage ne sera jamais réalisé avant 12 SA et un génotype *RHD* fœtal négatif observé sur un

premier échantillon de sang maternel sera provisoire et à confirmer sur un second prélèvement sanguin maternel effectué en général deux semaines plus tard afin de s'assurer de l'absence d'un faux négatif.

Un génotype *RHD* fœtal positif observé sur un premier échantillon de sang maternel peut être, lui, considéré comme définitif. Même si un résultat faussement positif reste possible par contamination pré-analytique ou per-analytique de l'échantillon, ou si la mère est porteuse d'un gène *RHD* non exprimé, dans ce cas l'amplification sera plus précoce que celle observée sur des quantités moindres d'ADN fœtal.

Une étude menée par Rouillac-Le Sciellour et coll. [16] portant sur 300 échantillons issus de plasmas collectés entre 12 et 36 semaines d'aménorrhée chez des femmes enceintes de phénotype RH-1 a été effectuée. Elle est intitulée « *non invasive fetal genotyping from maternal plasma, use of a new developed free DNA fetal kit RhD* » et date de 2007. Les résultats ont été comparés au génotype *RHD* fœtal déterminé sur liquide amniotique ainsi qu'à la technique initialement développée à partir des travaux de Rouillac-Le Sciellour et coll. [17] au centre national de référence en hématologie périnatale. Une corrélation de 100 % a été obtenue entre les deux méthodes. Aucun résultat faux négatif, défini par l'absence d'amplification des trois exons du gène *RHD*, n'a été trouvé chez les enfants ayant un phénotype RH1.

Le génotypage fœtal *RHD* sur sang maternel a une très bonne sensibilité au-delà de 11 à 12 semaines d'aménorrhée, elle est même excellente au-delà de 15 semaines. En-dessous de 12 semaines d'aménorrhée, la quantité d'ADN fœtal circulant dans le plasma maternel n'est, en revanche, pas suffisante pour donner des résultats satisfaisants.

#### – Intérêt

Les récentes recommandations d'une immunoprophylaxie anti-RH1 (Rhopylac®) systématique à 28 SA chez toutes les femmes enceintes RH-1, soit près de 150 000 injections chaque année en France, ont relancé le débat autour d'un génotypage *RHD* fœtal préalable devenu possible à grande échelle.

L'utilisation systématique du génotypage fœtal chez les femmes RH-1 dont le conjoint est RH1 ou inconnu permettrait de limiter les injections d'immunoglobulines anti-RH1, qu'elles soient d'indication ciblée ou systématique. Rappelons encore qu'un tiers des femmes RH-1 portant des enfants eux-mêmes RH-1, le nombre d'injections d'immunoglobulines pourrait être diminué d'autant sans pour autant diminuer l'efficacité de la prévention, ce qui représenterait à la fois un gain financier et une avancée sur le plan éthique.

Nous avons en effet déjà insisté sur le fait que les immunoglobulines anti-RH1 restent un produit dérivé du sang avec un risque infectieux - probablement négligeable mais non exclu -, cher, dont l'approvisionnement peut être limité et qu'il conviendrait donc d'économiser.

L'intérêt de la détermination non invasive du génotype *RHD* fœtal est, de plus, évident chez les patientes déjà en situation d'alloimmunisation anti-RH1, puisque la connaissance du statut du fœtus, donc de la situation d'incompatibilité pour la grossesse, va permettre soit d'alléger la surveillance en cas de fœtus RH-1 (environ 30 % des cas), soit de mettre en place une surveillance spécifique plus lourde en cas de fœtus RH1: dosage pondéral et micro-titration de l'anti-RH1, surveillance échographique orientée vers la recherche d'une anémie fœtale. Tout cela en vue d'apporter des éléments en cas d'AIFM particulièrement sévère représentant une indication d'IMG.

Le génotypage, réalisé de façon non invasive, évite également une potentialisation de l'allo-immunisation, donc du risque fœtal, engendré par l'effraction que représente l'amniocentèse, ou pire la ponction de sang fœtal autrefois proposée chez ces patientes.

#### - *Limites*

Les principales limites à l'utilisation de ce test tiennent en partie au coût de l'analyse et à son impact négatif sur le plan économique, en particulier dans un contexte de génotypage systématique. L'impact organisationnel d'un génotypage à grande échelle est aussi à considérer.

Bien que détermination du sexe fœtal et génotypage *RHD* ne constituent pas à proprement parler un diagnostic prénatal puisqu'ils ne relèvent pas d'une affection mais plus d'une caractéristique génétique d'un fœtus, ces activités sont considérées comme des actes de diagnostic prénatal à part entière. A ce titre, elles sont encadrées par l'ARS qui agréé les laboratoires habilités à effectuer le génotypage.

Il a été en outre rappelé que la mise à disposition de trousse diagnostiques CE ne dispensait pas l'équipe d'une validation de tout le processus de PCR et de la participation à des campagnes d'évaluation externe de la qualité. La réalisation de ces tests nécessite un matériel adapté et une équipe parfaitement formée sur l'immunohématologie et la génétique du système Rhésus.

Ces techniques nouvelles ont en tout cas le vent en poupe et l'Agence de la Biomédecine a relevé une progression de leur utilisation. De 384 déterminations en 2005, on passe à 799 en 2006 et à 2 962 en 2007. A ce jour cependant, aucun test de détermination prénatale du statut *RHD* du fœtus n'est encore inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale en France. Les nomenclatures américaine et canadienne sont dans le même cas, mais la belge en revanche a déjà intégré l'examen.

Plusieurs laboratoires spécialisés disposent d'une technique validée de génotypage fœtal sur sang maternel. Les éléments qui freinent encore son utilisation à large échelle en France, sont l'absence de standardisation des techniques et l'absence de remboursement du test. Il semble donc important que le génotypage *RHD* fœtal soit

inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale et qu'un protocole soit établi pour avoir partout une homogénéité du test et de ses résultats.

#### - *Évaluation*

Rappelons que dans le cadre de ses missions, la Haute Autorité de Santé (HAS) évalue le service attendu (SA) des actes professionnels puis rend un avis quant à leur inscription, à la modification de leur condition d'inscription ou à leur radiation de la liste des actes pris en charge par l'Assurance maladie.

L'avis de la HAS est ensuite transmis à l'Union nationale des caisses d'assurance maladie (UNCAM), qui prend la décision d'inscrire, de modifier les conditions d'inscription ou de radier les actes.

Le rapport de la HAS de janvier 2011 stipule que, quinze ans après sa découverte, l'analyse de l'ADN fœtal circulant dans le plasma maternel fait d'ores et déjà partie des outils du diagnostic prénatal. A noter que, pour l'instant, ses applications se limitent en routine au génotypage Rhésus et à la détermination du sexe fœtal, comme nous l'avons vu plus haut. Toutefois, l'utilisation de cette approche pour le diagnostic prénatal d'autres maladies ou caractéristiques du fœtus fait l'objet actuellement d'une intense recherche.

Une étude multicentrique intitulée GENIFERH (« Génotypage Non Invasif Foetal Rhésus D ») a été lancée dans le cadre d'un STIC (Soutien aux Techniques Innovantes et Coûteuses). Cette étude, menée par le professeur Brossard à l'hôpital Saint-Antoine de Paris, a plusieurs objectifs : intérêt médical du test marqué CE, aspect économique et analyse des conditions cliniques et biologiques de faisabilité optimale du test en pratique systématique. Elle était censée prendre fin en mai 2013 et ses résultats devraient donc bientôt être connus.

Le champ de l'évaluation de la HAS a porté sur la performance diagnostique de la détermination du génotype fœtal *RHD* à partir du sang maternel et la définition des indications de ce test.

Trente-trois études, comportant au moins dix patientes, évaluant la performance diagnostique de la détermination du génotype *RHD* fœtal sur sang maternel ont été retenues par la HAS. Globalement, la PCR en temps réel semble être la technique la plus employée. L'analyse de ces études indique l'absence de standardisation des procédures en termes de nombre et de type d'exons testés, de témoins d'amplification et de contrôles internes utilisés, du nombre de tests réalisés et des modalités d'interprétation des résultats. En d'autres termes, chacune des équipes a développé, mis au point, et validé sa propre procédure. La majorité des études a été réalisée sur des femmes RH-1 non immunisées, à des stades variables de leur grossesse. La majorité des études a couvert les 3 trimestres de grossesse, les résultats ont montré des sensibilités et spécificités supérieures à 95 % pour 22 études, avec pour 15 études 100 % de sensibilité et de spécificité. Une seule étude a été réalisée spécifiquement au 1er trimestre de la grossesse et comportait 106 patientes RH-1 prélevées entre 8 et 14 SA.

La sensibilité et la spécificité étaient chacune de 100 %. Une autre étude, réalisée sur un échantillon de 104 femmes, a rapporté une sensibilité de 97,8 % et une spécificité de 92,3 %, avec un résultat faussement positif et 2 résultats faussement négatifs, qui concernaient des prélèvements effectués entre 9-11 SA.

La bibliographie décrivant l'impact clinique de la détermination du génotype *RHD* fœtal est assez pauvre. Selon la HAS toujours, quatre publications ont décrit l'utilisation à large échelle du génotypage fœtal *RHD*. Toutes sauf une ont utilisé plusieurs exons, et certaines ont mis en place plusieurs niveaux de tests pour améliorer la fiabilité et l'obtention des résultats. Ces auteurs ont considéré que le génotypage améliorerait la prise en charge des grossesses des femmes RH-1. Toutefois, les études présentaient des faiblesses méthodologiques qui limitent leur portée : population non définie ou parfois très sélectionnée, absence d'indication sur le nombre de tests non concluants, modalités d'interprétation des tests mal décrites, en particulier lorsque plusieurs exons étaient testés.

Néanmoins, les différentes publications portant sur des contrôles de qualité externe réalisés tous les deux ans par un groupe de travail de l'International Society of Blood Transfusion (ISBT) ont apporté des informations qui permettent d'étayer les résultats favorables sur la performance.

Sur la base des seules études publiées, il n'apparaît pas possible, pour la HAS, de définir une stratégie diagnostique en termes d'âge gestationnel de réalisation, de conduite à tenir en cas de résultat négatif à l'issue d'une première détermination, de nécessité d'une réalisation d'un second test et de délai de recontrôle.

Pour se faire une idée des options qui sont à notre portée, voici un tableau comparatif, en termes de méthodes et de résultats obtenus, de différentes études menées sur le sujet.

auteurs	Pays et année	But de l'étude	Echantillon	méthode	témoins	résultats								
Lo et coll. <b>[18]</b>	Royaume-uni, 1998	Comparer les résultats du génotypage foetal <i>RHD</i> sur plasma maternel et ceux obtenus par amniocentèse ou prélèvement sur sang de cordon	57 ♀ dont : -12 au 1er T -30 au 2ème T -15 au 3ème T  caucasiennes	<u>Préparation</u> : -10mL de sang maternel prélevé sur tube EDTA -centrifugation à 3000 gets -récupération du plasma et conservation à -20°C jusqu'à son utilisation <u>Extraction</u> : utilisation d'un kit QIAamp® sur 800µL d'échantillon <u>Analyse</u> : PCR en temps réel centrée sur l'exon 10 à l'aide d'un Perkin-Elmer sequence detector® modèle 7700	-Gène de la B-globine -contrôle + -contrôle -	96,4 % de concordance avec deux faux négatifs chez des patientes à 10 et 11 semaines d'amenorrhée soit : <table border="1"> <tr> <td>PCR+</td> <td>37</td> <td>NN RH1</td> <td>39</td> </tr> <tr> <td>PCR-</td> <td>20</td> <td>NN RH-1</td> <td>18</td> </tr> </table>	PCR+	37	NN RH1	39	PCR-	20	NN RH-1	18
PCR+	37	NN RH1	39											
PCR-	20	NN RH-1	18											
Costa et coll. <b>[19]</b>	France, 2002	Comparer les résultats du génotypage foetal <i>RHD</i> sur plasma maternel au premier trimestre et ceux obtenus par amniocentèse (génotypage) ou prélèvement sur sang de cordon (analyse sérologique)	106 ♀ au 1er T  caucasiennes	<u>Préparation</u> : -5mL de sang maternel prélevé sur tube EDTA -centrifugation à 3000 gets pendant 10 minutes à 4°C -récupération du plasma et conservation à -30°C <u>Extraction</u> : utilisation d'un kit de préparation pour PCR de la société Roche Biochemicals sur un échantillon de 200µL <u>Analyse</u> : PCR duplex en temps réel ciblée sur l'exon 10 avec un second gène autosomique de référence : celui de	-contrôle + -contrôle - -gène SOD	100 % de concordance. Pas de détermination du phénotype par analyse du sang de cordon sur 4 enfants car IMG (anomalie chromosomique).  <table border="1"> <tr> <td>PCR+</td> <td>62</td> </tr> <tr> <td>PCR-</td> <td>40</td> </tr> </table>	PCR+	62	PCR-	40				
PCR+	62													
PCR-	40													

				la superoxyde dismutase (SOD) qui sont coamplifiés dans un lightcycler®																													
Hromadnikova et coll. [20]	République-Tchèque, 2005	Comparer les résultats du génotypage fœtal <i>RHD</i> sur plasma maternel entre 12 et 41 SA et ceux obtenus par prélèvement sur sang de cordon (analyse sérologique).	45 ♀  caucasiennes	<p><u>Préparation</u> :</p> -10mL de sang maternel prélevé sur tube EDTA -centrifugation à 1200g puis 3000g pour 10 minutes -récupération du plasma et conservation à -80°C <p><u>Extraction</u> :</p> utilisation d'un kit QI Aamp® sur 400µL d'échantillon selon le protocole du fabricant <p><u>Analyse</u> :</p> PCR multiplex en temps réel ciblée sur les exons 7 et 10 du gène <i>RHD</i> et 2 et 5 de RHCE avec un ABI PRISM 7700 sequence detection system®	-gène de la B-globine -contrôle + -contrôle - -gène SRY	100 % de concordance avec : <table border="1"> <tr> <td>PCR+</td> <td>24</td> </tr> <tr> <td>PCR-</td> <td>21</td> </tr> </table>	PCR+	24	PCR-	21																							
PCR+	24																																
PCR-	21																																
Gonzales et coll. [21]	Espagne, 2005	1ère étude : déterminer la quantité d'ADN fœtal dans le sang maternel en fonction du terme	1 ♀ (13 prélèvements à différents moments de sa grossesse)  caucasiennes	<p><u>Extraction</u> :</p> utilisation d'un kit QI Aamp® sur 0,2 à 0,8µL d'échantillon selon le protocole du fabricant. <p><u>Analyse</u> :</p> PCR quantitative en temps réel ciblée sur l'exon 7 du gène <i>RHD</i> avec un ABI PRISM 310 genetic analyzer® utilisant le logiciel d'analyse genescan	-gène de la B-globine	<table border="1"> <thead> <tr> <th>SA</th> <th colspan="2">ADN fœtal</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10</td> <td>non</td> <td>non</td> </tr> <tr> <td>12</td> <td colspan="2">oui</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>non</td> <td>non</td> </tr> <tr> <td>18</td> <td colspan="2">oui</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td colspan="2">oui</td> </tr> <tr> <td>22</td> <td colspan="2">oui</td> </tr> <tr> <td>24</td> <td colspan="2">oui</td> </tr> <tr> <td>26</td> <td colspan="2">oui</td> </tr> </tbody> </table>	SA	ADN fœtal		10	non	non	12	oui		15	non	non	18	oui		20	oui		22	oui		24	oui		26	oui	
SA	ADN fœtal																																
10	non	non																															
12	oui																																
15	non	non																															
18	oui																																
20	oui																																
22	oui																																
24	oui																																
26	oui																																



						<table border="1"> <tr> <td>29</td> <td>non</td> <td>oui</td> </tr> <tr> <td>34</td> <td colspan="2">oui</td> </tr> <tr> <td>37</td> <td colspan="2">oui</td> </tr> <tr> <td>24h après accouchement</td> <td colspan="2">non</td> </tr> </table>	29	non	oui	34	oui		37	oui		24h après accouchement	non	
29	non	oui																
34	oui																	
37	oui																	
24h après accouchement	non																	
		2ème étude : Comparer les résultats du génotypage foetal <i>RHD</i> sur plasma maternel entre 13 et 18 SA et ceux obtenus par analyse du liquide amniotique ou des villosités chorales	20 ♀ de 13 à 18 SA caucasiennes			2 faux-négatif sur les 20 échantillons par rapport à la méthode invasive												
Dif-Couvreux et coll. [22]	France, 2006	Étudier la faisabilité de la détermination du Rhésus fœtal sur plasma maternel par une hemi-nested PCR classique en comparant les résultats du génotypage de l'ADN fœtal du sang maternel et ceux d'une amniocentèse	99 ♀ dont -47 au 2ème T -52 au 3ème T  caucasiennes	<p><u>Préparation</u> :</p> -20mL de sang maternel prélevé sur tube EDTA -centrifugation à 1200g puis 2950 g pour 20 minutes -récupération du plasma et conservation à -20°C	-contrôle + -contrôle -	<p><u>Extraction</u> :</p> utilisation d'un kit QI Aamp® sur 400µL d'échantillon selon le protocole du fabricant. En parallèle par 2 opérateurs différents	2ème T : 74,5 % de concordance 3ème T : 94,2 % de concordance une 2ème détermination a été réalisée pour les résultats discordants entre les opérateurs :											
				<p><u>Analyse</u> :</p> PCR hemi-nested classique à l'aide d'un classique cycler PTC 200® 1ère PCR : amplification d'une séquence commune aux gènes RHD et		<table border="1"> <tr> <td></td> <td>NN Rh+ 68</td> <td>NN Rh- 30</td> </tr> <tr> <td>PCR +</td> <td>68</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>PCR -</td> <td>0</td> <td>26</td> </tr> </table>		NN Rh+ 68	NN Rh- 30	PCR +	68	4	PCR -	0	26			
	NN Rh+ 68	NN Rh- 30																
PCR +	68	4																
PCR -	0	26																

				RHCE (exon 4) et d'une spécifique de l'exon 10 du gène <i>RHD</i> 2ème PCR : amplification du produit d'amplification de la 1ère PCR obtenu à partir de l'exon 10		Soit au final 4 faux positifs									
Rouillac et coll. [16]	France, 2008	Comparer 2 méthodes de détection des produits d'amplification : -par ajout d'un colorant, le SYBR green I -à l'aide de la trousse de diagnostic <i>Free DNA fetal kit RhD</i> ®. Les résultats du génotypage fœtal ont été comparés au phénotype à la naissance	300 ♀ de 12 à 36 SA  caucasiennes	<u>Préparation</u> : -5 à 10mL de sang maternel prélevé sur tube EDTA -acheminement vers le laboratoire en moins de 48h -centrifugation à 1730 gets 10 minutes à T°C ambiante -récupération du plasma et conservation à -20°C <u>Extraction</u> : L'ADN est extrait à partir de 500mL d'échantillon de plasma à l'aide d'un kit QI Aamp® MinElute® Virus Vacuum <u>Analyse</u> : PCR duplexe en temps réel ciblée sur les exons 7 et 10 à l'aide d'un Lightcycler® 1,5 ou 2.	-contrôle + -contrôle - -contrôle blanc (500mL d'eau)  dans tous les échantillons et les témoins, il a été ajouté 5µL d'ADN de maïs (contrôle interne)	<table border="1"> <tr> <td></td> <td>NN RH1 229</td> <td>NN RH-1 81</td> </tr> <tr> <td>PCR+</td> <td>229</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>PCR-</td> <td>0</td> <td>79</td> </tr> </table> 2 résultats faux positif ont été trouvés pour les exons 7 et 10. Il y a 100 % de concordance entre la méthode utilisant le SYBR green I et celle du <i>free DNA kit RhD</i> ®		NN RH1 229	NN RH-1 81	PCR+	229	2	PCR-	0	79
	NN RH1 229	NN RH-1 81													
PCR+	229	2													
PCR-	0	79													
Finning et coll. [23]	Royaume-uni, 2008	Comparer le résultat du génotypage foetal sur sang maternel au phénotype à la naissance. Amplification de l'exon 7 observée pour les gènes <i>RHD</i> et <i>RHD psi</i> , celle de l'exon 5 uniquement pour	1997 ♀ moyenne : 27,9 SA 55 % caucasiennes 8 % asiatiques	<u>Préparation</u> : -4 à 6 mL de sang maternel prélevé -centrifugation 10 minutes -récupération du plasma et conservation à -30°C <u>Extraction</u> : L'ADN est extrait à partir de 0,56mL d'échantillon grâce à un MDx	-gène CCR5 (récepteur aux chémokines) -contrôle + -contrôle - -contrôle <i>RHD psi</i>	124 échantillons de sang de cordon ont été perdus et il y a eu 4 morts fœtales in-utero, sur les 1869 échantillons restants :									

		le gène <i>RHD</i>	1,5% afro-antillaises , 33 % inconnues	BioRobot® <u>Analyse</u> : PCR quantitative duplexe en temps réel ciblée sur les exons 5 et 7 à l'aide d'un ABI PRISM® 7900 HT .		<table border="1"> <tr> <td></td> <td>NN RH1</td> <td>NN RH-1</td> </tr> <tr> <td>PCR +</td> <td>1118</td> <td>14</td> </tr> <tr> <td>PCR -</td> <td>3</td> <td>670</td> </tr> </table> <p>Pour 64 patientes, soit 3,4 %, la détermination n'a rien donné</p>		NN RH1	NN RH-1	PCR +	1118	14	PCR -	3	670
	NN RH1	NN RH-1													
PCR +	1118	14													
PCR -	3	670													
Minon et coll. [24]	Belgique, 2008	Évaluer la valeur diagnostique du génotypage <i>RHD</i> fœtal sur sang maternel en routine clinique dès 12 SA	563 ♀ dont : -40 au 1er T. -409 au 2ème T. -114 au 3ème T.  moyenne : 21,7SA  22 africaines, toutes les autres caucasiennes	<u>Préparation</u> : -échantillon de sang maternel prélevé sur tube EDTA -centrifugation à 1700g pour 10 minutes moins de 48h après prélèvement -récupération du plasma et conservation à -20°C -récupération de la couche leuco-plaquettaire et conservation à -20°C <u>Extraction</u> : utilisation d'un système automatisé Cobas amplipred® sur 850µL d'échantillon selon le protocole du fabricant <u>Analyse</u> : PCR quantitative en temps réel ciblée sur les exons 4,5 et 7 du gène <i>RHD</i> à l'aide d'un ABI PRISM® 7700	-contrôle + (couche leuco-plaquettaire d'un homme RhD+) -contrôle négatif -gène CCR5 -gène SRY	Que ce soit au 1er, 2ème ou 3ème trimestre de la grossesse, la concordance entre les résultats du génotypage et le phénotype à la naissance est toujours de 100 %									

SA : semaine d'aménorrhée

T : trimestre

PCR : polymérase chain reaction

Certaines équipes ont aussi tenté de prouver la présence d'ADN fœtal en recherchant de l'ADN hyperméthylé. Si celui-ci est détecté mais que le gène *RHD* reste absent, le fœtus est donc RH-1.

Néanmoins ces techniques sont lourdes et les précautions suivantes nécessaires :

- validation des équipes
- participation à des EEQ
- pas de test avant 12 SA
- validation des prélèvements (EDTA, moins de 5 jours)
- nouveau test en cas de résultat négatif
- connaissance de la structure du système Rhésus
- connaissance des origines ethniques des géniteurs

Le groupe de travail de la HAS a préconisé que, dans l'attente des résultats de l'étude GENIFERH, la réalisation d'une seconde détermination 15 jours plus tard serait nécessaire si le premier test a donné un résultat négatif. Enfin, lorsque le résultat des tests reste ininterprétable, le fœtus doit être considéré comme RH1.

La détermination pourrait être effectuée à partir de 11 à 12 SA pour permettre sa réalisation à l'occasion du prélèvement des marqueurs sériques de trisomie 21, dans le cadre du dépistage combiné du premier trimestre et/ou précéder une biopsie de trophoblaste, acte invasif à risque d'allo-immunisation.

La définition de protocoles à suivre est nécessaire pour garantir la performance du test. La mise en place d'un contrôle de qualité interne d'extraction et d'amplification de l'ADN est indispensable pour limiter les résultats faussement négatifs, de même que celle d'un contrôle de qualité externe.

Les conséquences cliniques d'un résultat faussement négatif peuvent être graves, tout particulièrement chez la femme enceinte RH-1 déjà immunisée. Dans cette situation, la grossesse ne bénéficierait pas d'une surveillance spécialisée, destinée à identifier et à prendre en charge une anémie fœtale potentiellement sévère.

Même s'ils existent, les résultats faussement positifs ont moins d'impact clinique ; ils entraînent simplement un traitement par immunoglobulines anti-RH1 inutile (ce qui revient pour elles à la prophylaxie systématique actuelle) et une surveillance spécialisée injustifiée de la grossesse.

Certains experts du groupe de travail de la HAS ont souligné que la détermination du génotype fœtal *RHD* était réalisée en pratique clinique depuis plusieurs années. Ils ont aussi reconnu la faiblesse méthodologique des données publiées mais ont toutefois considéré que les procédures apparaissaient suffisamment fiables pour les proposer en

clinique, notamment pour les populations caucasiennes ou asiatiques. Pour les populations d'origine africaine ou afro-antillaise, l'identification des variants les plus fréquents apparaît possible par l'utilisation d'une association d'exons incluant notamment l'exon 5, et rendant la procédure acceptable dans cette population.

Dans cette population, en effet, le phénotype RH-1 est en effet le plus souvent lié à l'existence de gènes variants non fonctionnels, comme le pseudogène *RHD* psi. Dans ce cas, l'identification du gène *RHD* par l'amplification d'un seul exon ne suffit pas pour déduire correctement le phénotype à partir du génotype, contrairement aux populations caucasiennes ou asiatiques, chez lesquelles le phénotype RH-1 est majoritairement lié à une délétion du gène *RHD*. La détection par PCR du pseudogène *RHD* psi notamment permettrait de réduire le nombre de faux positifs et d'améliorer ainsi la spécificité de la détermination. Pour ce faire, l'utilisation de tests amplifiant les exons 5, 7, et 10 semble une solution optimale. La PCR en temps réel permettant également de détecter un *RHD* mutant maternel.

Il faut noter également l'importance de la concertation entre les laboratoires et les cliniciens pour le suivi de ces grossesses dans le cadre de la communication inter-professionnelle. Cette activité entre dans le champ du diagnostic prénatal et les laboratoires font l'objet d'une déclaration annuelle d'activité à l'Agence de la Biomédecine. Il serait souhaitable que ce bilan intègre le nombre de tests réalisés en fonction de l'indication (prophylaxie ou suivi de grossesse), la technique utilisée, le nombre de secondes déterminations, les incidents ou difficultés techniques rencontrés.

Les résultats de l'étude GENIFERH apporteront des informations complémentaires sur les conditions de réalisation de ce test et sur sa performance en pratique clinique courante. Il apparaît toutefois important de poursuivre la recherche visant à optimiser la performance du test, notamment à éviter les résultats faussement négatifs (par la validation de témoins d'ADN fœtal par exemple). À l'issue de l'étude GENIFERH, une actualisation de l'évaluation de la HAS sera donc de mise.

Au final, la HAS a estimé l'ASA du test de détermination du génotype *RHD* fœtal suffisant dans les deux indications suivantes :

- la prise en charge des grossesses des femmes RH-1 non immunisées, pour lesquelles le géniteur présumé est identifié RH1 ;
- la prise en charge des grossesses des femmes RH-1 immunisées, pour lesquelles le géniteur présumé est identifié RH1.

L'ASA de cet acte est estimée à 3, en d'autres termes, modérée.

### 3) Conclusion

Le fait de pouvoir présumer le statut RH1 du fœtus avant sa naissance est un progrès dans la mesure où cela permet d'adapter le suivi des grossesses. D'autant que les anciennes techniques de détermination n'étaient pas sans risque pour le fœtus.

Or, si elle venait à être appliquée en routine, la détermination du RH1 fœtal sur prélèvement sanguin maternel permettrait d'obtenir les mêmes résultats que l'amniocentèse, sans ses inconvénients. En effet, contrairement à cette dernière, le génotypage sur plasma maternel n'est pas invasif. Il exclut donc les risques d'infection, d'avortement, et, même, de passage transplacentaire d'hématies fœtales, entraînant potentiellement une allo-immunisation foeto-maternelle.

Nous rappelons que le génotypage *RHD* prénatal chez le fœtus permet :

- à titre prophylactique chez les femmes RH-1 non immunisées, de déterminer les modalités de prise en charge des grossesses ;
- à titre thérapeutique chez les femmes RH-1 déjà immunisées, de déterminer quelles grossesses doivent bénéficier d'une prise en charge spécifique spécialisée.

Il semble donc que dorénavant, le DNPI soit bien en marche et en passe de faire partie des outils à la disposition des biologistes et des obstétriciens. La question de son positionnement au sein de l'arsenal diagnostique paraît simple et évidente en ce qui concerne les maladies monogéniques ou toute autre situation à haut risque pour le fœtus (incompatibilité foeto-maternelle érythrocytaire ou plaquettaire).

#### 4) Mise en place du génotypage à l'EFS Lorraine-Champagne : choix d'un protocole

Fort de cette constatation, l'EFS Lorraine Champagne situé sur le site de Brabois s'est équipé en locaux et en matériel en vue de réaliser un jour prochain le DNPI en routine.

- *Les locaux*

Pour éviter la contamination des échantillons, le laboratoire de biologie moléculaire a été divisé en trois pièces : un sas, une pièce pré-PCR, et une pièce post-PCR.

La séparation du plasma et des globules rouges est réalisée dans la pièce pré-PCR, tandis que l'extraction et l'amplification ont lieu dans la pièce post-PCR. Le sas permet le changement de blouse d'une pièce à l'autre ; on ne peut entrer dans la pièce post-PCR à partir du sas qu'après que la porte de la salle de pré-PCR se soit refermée. La salle de post-PCR où se trouve le thermocycleur est par ailleurs climatisée afin de maintenir une température optimale et stable tout au long de l'année. Chaque pièce a dû être organisée de façon à ce qu'aucun matériel installé en post-PCR ne revienne en pré-PCR, pour éviter toute sorte de contamination sur les échantillons natifs.

– *Le matériel*

Réaliser une PCR réclame plusieurs appareillages dont notamment des centrifugeuses de diverses capacités en terme de rotations par minute, précisément une Mikro 220R® (Hettich Zentrifugen, Allemagne) et une Universal 320® (Hettich Zentrifugen, Allemagne). Le laboratoire de l'EFS Lorraine-Champagne utilise également pour cette manipulation un vortex TopMix® (Fisher Scientific, Etats-unis), un bain-marie sec, des pipettes et des cônes de pipettes de qualité BM.

Mais l'outil principal de la PCR reste bien sûr le thermocycleur qui permet l'amplification et la révélation de l'ADN testé pour le génotypage foetal *RHD*.

L'établissement a donc acquis un LightCycler® 480 II (Roche diagnostics, France), qui lui permet de réaliser la technique de PCR quantitative en temps réel (qPCR) en vase clos. Le LightCycler® 480 II est un thermocycleur à air pulsé combiné à un module de détection fluorimétrique, le tout piloté par un ordinateur permettant l'acquisition et le traitement des données obtenues. Il permet de réaliser des qPCR de 45 cycles en 60 minutes. La plateforme de l'automate accueille des plaques 96 puits.

- Composition et fonctionnement du LightCycler® 480 II

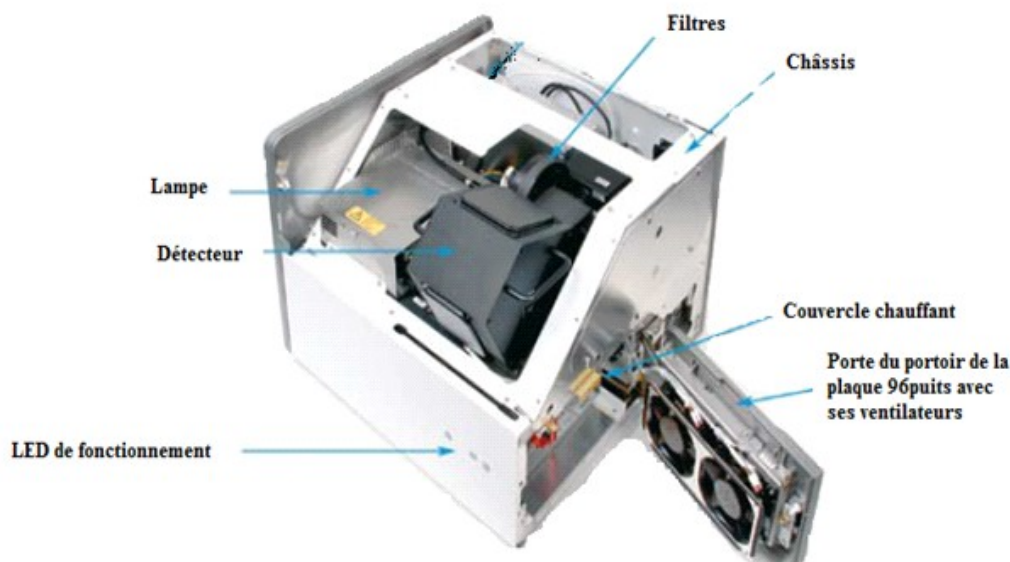


Figure 17: Composition du thermocycleur LightCycler 480 II (Courjan Pauline, 2013)

Le fonctionnement du thermocycleur est simple : l'air ambiant est injecté dans une enceinte hermétique, puis chauffé grâce à une résistance électrique. Il est ensuite homogénéisé par un ventilateur. Après quoi l'air chaud est refroidi par une nouvelle injection d'air ambiant. L'avantage du thermocycleur à air pulsé est d'assurer une répartition homogène de la température d'un échantillon à un autre, et, ce, lors de la montée en température à raison de 4,8 °C/s et de la descente en température : 2,5 °C/s, cette homogénéité étant la condition nécessaire pour la précision et la reproductibilité des mesures effectuées. [25]

Le système optique qui est combiné au thermocycleur sert à l'excitation puis à la détection des marqueurs fluorescents qui permettent de suivre la réaction de PCR en temps réel.

Un des marqueurs en question est le fluorochrome FAM, qui sera détecté à l'aide de lampes électroniques. Ces lampes produisent un faisceau lumineux très intense, correspondant à un domaine de longueur d'onde sélectionné par le technicien (498-580nm) grâce au filtre à bande passante étroite. La lumière émise est ensuite filtrée puis déviée sur le système de détection : une caméra CCD (charge coupled device) et des photodiodes. L'avantage de la caméra CCD est de diminuer le bruit de fond et d'améliorer la sensibilité de détection et la linéarité du système lors du refroidissement.

La Taq polymérase représente, elle, l'enzyme qui va permettre l'élongation des brins d'ADN à partir des amorces. Elle a une activité 5' exonucléasique spécifique de l'ADN double brin. Or, la sonde Taqman utilisée est une unique chaîne limitée de 25 à 30 nucléotides, marquée à son extrémité 5' par le fluorophore donneur (reporter, nommé FAM) et à son extrémité 3' par le fluorophore suppresseur (quencher). Les deux extrémités étant proches l'une de l'autre, lorsque le fluorophore donneur est excité, il transmet son énergie au fluorophore suppresseur par le principe de la FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert).

Du fait de la structure de la sonde Taqman, la Taq polymérase ne peut donc pas agir sur elle et aucune fluorescence n'est émise au départ.

Lors de l'hybridation, la sonde et les amorces vont se lier à leurs séquences complémentaires respectives.

A l'étape suivante, la Taq polymérase entame alors l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle trouve sur son passage la sonde hybridée, qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5' exonucléasique. Le fluorophore donneur est alors éloigné du suppresseur, il va dès lors pouvoir émettre une fluorescence qui sera de plus en plus forte à mesure que le nombre de cycles d'amplification augmente. Ainsi, à chaque cycle, la quantité d'ADN total ou d'amplicon est mesurée en temps réel grâce à un marqueur fluorescent.



– *Méthode*

Le protocole suivi pour effectuer un génotypage fœtal *RHD* est donné par Biorad qui conseille l'utilisation de l'ensemble des kits Qiagen, Biorad et Roche pour effectuer les manipulations d'extraction et d'amplification.

Parmi les dix exons présents sur le gène *RHD*, les exons 5, 7 et 10 ont été sélectionnés pour la détection. Après amplification, ils permettent de confirmer la présence ou l'absence du gène *RHD* et ainsi le phénotype. L'amplification de l'exon 5 permet d'exclure un maximum de variants du gène *RHD* silencieux. L'exon 7 est le plus spécifique du gène *RHD* et le 10, quant à lui, augmente la sensibilité de l'analyse.

Le dépôt des mélanges réactionnels dans les puits de la plaque 96 puits se fait selon le nombre d'échantillons à tester, suivant un schéma plaque bien précis. Une fois les échantillons déposés dans la plaque, celle-ci est scellée par un film adhésif et ne sera plus ouverte au cours de la PCR. Il faut cependant prendre des précautions au cours de l'extraction de l'ADN et du dépôt des échantillons dans la plaque 96 puits (port de gants, changement régulier des gants, port d'une blouse, respect des consignes) pour éviter au maximum les contaminations.

Éléments limitant le risque de contamination :

- protection de l'espace pré-PCR.
- utilisation de milieux réactionnels clos avec des plaques réactionnelles scellées.
- utilisation de dUTP ne pouvant servir de base pour une nouvelle amplification à partir d'amplicon.

Les températures choisies pour les différentes étapes d'un cycle de PCR sont de 95 °C pour la dénaturation, 60 °C pour l'hybridation et 72 °C pour l'élongation.

Comme le montre la figure n°18 ci-après, l'allure d'une courbe d'amplification est celle d'une sigmoïde.

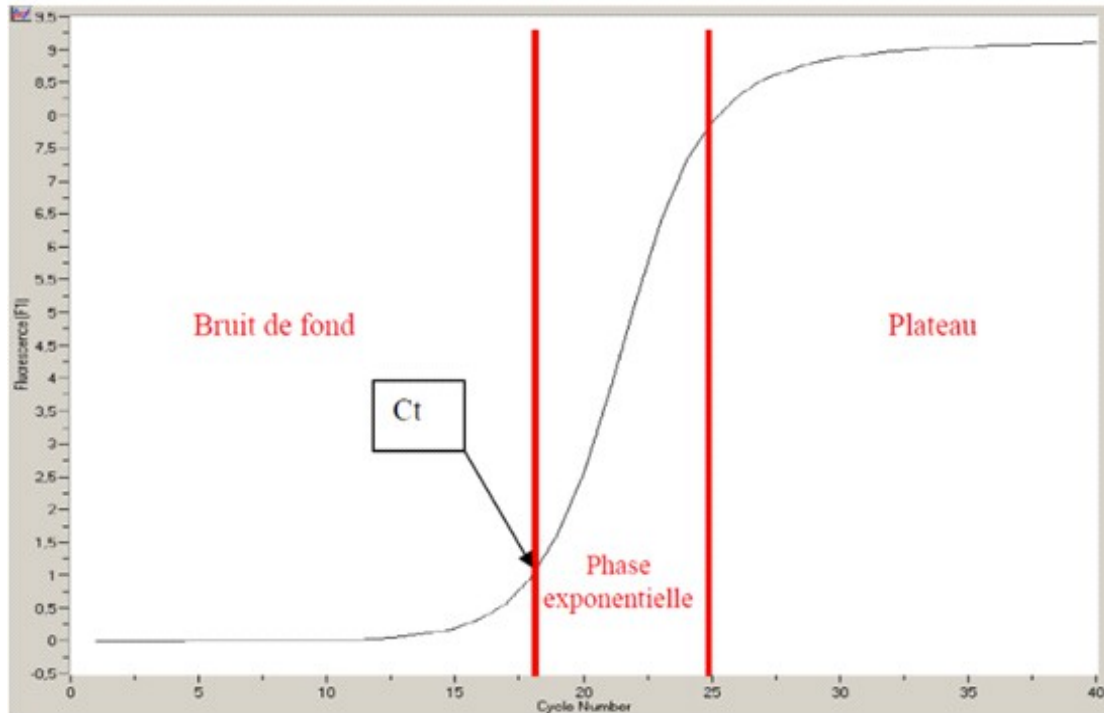


Figure 18: Allure d'une courbe d'amplification. (EFS Vandoeuvre, 2013)

Ainsi, le génotypage fœtal *RHD* voit une accumulation exponentielle de la quantité des produits au cours de la réaction après un temps de latence de 30 à 35 cycles lorsqu'il est réalisé sur sang fœtal et de 20 à 25 cycles s'il est réalisé sur du plasma maternel. Au-delà, un plateau est observé. Ce plateau reflète une baisse de l'efficacité de l'amplification due, d'une part, à l'inactivation thermique partielle de l'ADN polymérase au cours des derniers cycles et, d'autre part, au fait que les nucléotides et les amorces deviennent limitant.

Une autre notion importante est celle de cycle seuil (Ct). Il s'agit de la phase où la fluorescence considérée comme correspondant au bruit de fond commence à se démarquer de celui-ci, car les variations d'intensité de fluorescence deviennent visibles. Le bruit de fond est considéré comme tel tant que l'on reste sous les  $1.10^8$  copies.

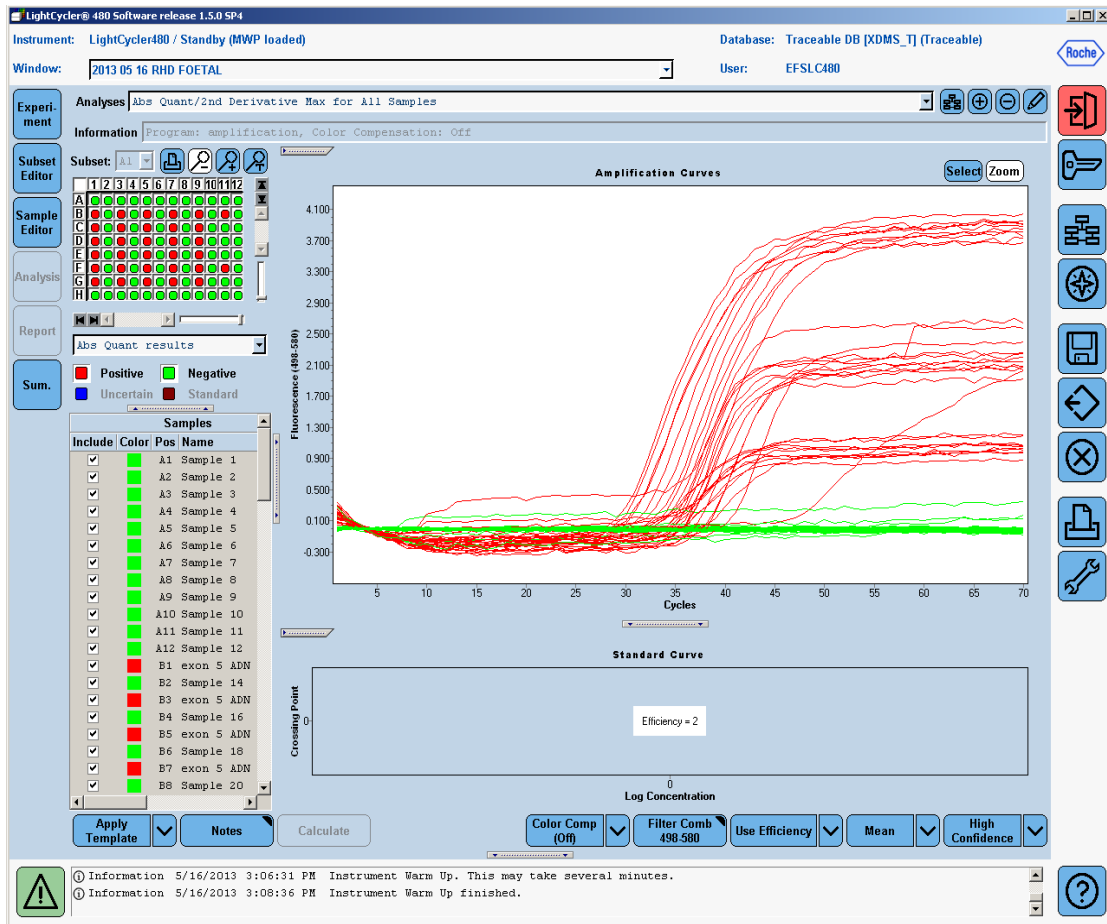


Figure 19: Courbe d'amplification où l'on voit les phases de plateau correspondant à l'amplification des trois exons 5, 7, et 10 du gène RHD et au contraire, l'absence d'amplification pour le témoin négatif en vert (EFS lorraine-Champagne, 2013)

Le protocole choisi par l'EFS pour réaliser la qPCR est donc satisfaisant puisqu'il permet d'obtenir des courbes où l'on voit bien la phase exponentielle et celle de plateau (correspondant à l'amplification des différents exons du gène RHD). Pour chaque exon, on constate que l'amplification, évaluée par fluorescence, et les Ct sont différents. En réalité cela est dû à la température choisie pour la phase d'élongation qui ne peut être optimale pour les trois séquences exoniques à la fois. Il faut sélectionner une température qui puisse convenir aux trois exons, même si ce n'est pas la température idéale pour chacun pris en particulier.

*- Interprétation des résultats*

Le biologiste doit valider le résultat des analyses en se basant sur :

- l'âge gestationnel
- le statut RH1 du couple
- l'origine géographique du couple
- les résultats obtenus pour les trois exons et le témoin

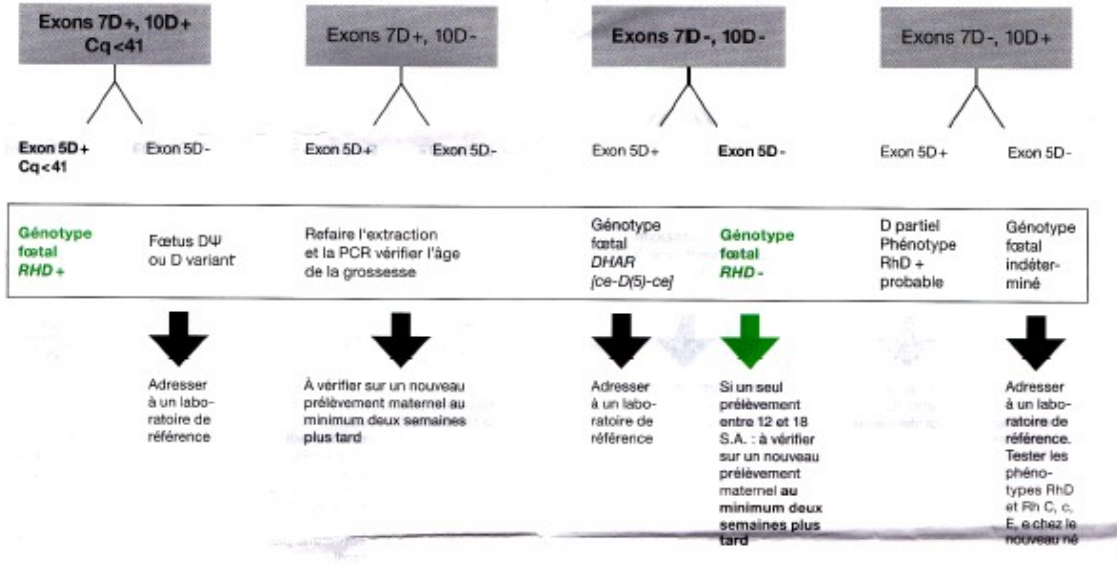
Le fabricant Biorad fournit une base d'interprétation des résultats qu'il est possible d'obtenir suite à l'amplification de l'ADN fœtal, cette base permet de déterminer le phénotype des échantillons qui sont amplifiés :

## Free DNA Fetal Kit® RhD (Id-n°: 45990)

**BIO-RAD**

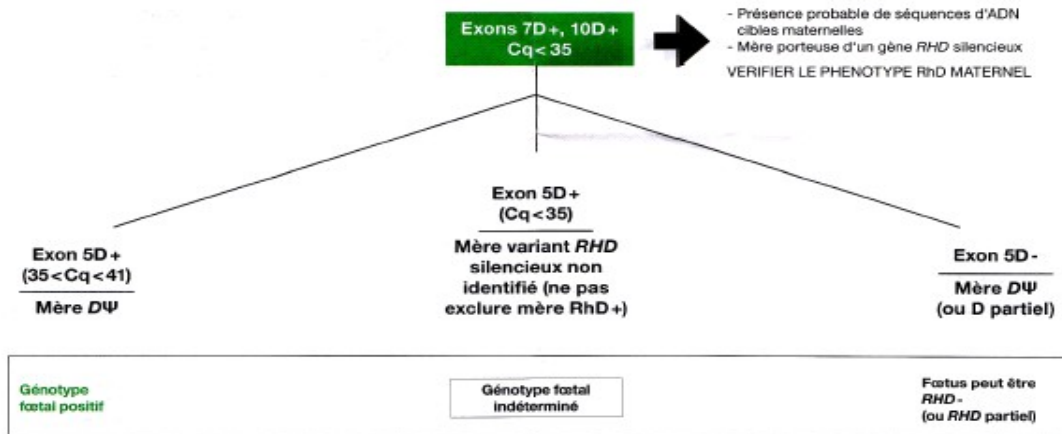
### Guide d'interprétation – génotypage foetal *RHD* sur sang maternel

Dans tous les cas, le témoin mais doit être positif  
Si le témoin mais présente un Cq>36 : refaire le test



### Guide d'interprétation – génotypage foetal *RHD* sur sang maternel amplifications anormalement précoces

Dans tous les cas, le témoin mais doit être positif.  
Si le témoin mais présente un Cp>36 : refaire le test.



B080002 02.12

Figure 20: Guide d'interprétation des résultats du génotypage foetal *RHD* sur sang maternel (Biorad)

– *Validation du protocole*

Différentes PCR ont été réalisées en faisant varier plusieurs paramètres de la manipulation pour définir le meilleur protocole en termes de sensibilité et de spécificité. Ainsi ont été testés les kits d'extraction et d'amplification de l'ADN, différentes dilutions de l'ADN extrait du plasma, et également la période de stabilité de l'ADN extrait de plasma conservé à température ambiante. Les premières manipulations de mises au point du génotypage fœtal *RHD* ont montré que, pour obtenir des résultats fiables, il est nécessaire et impératif d'utiliser des réactifs adéquats selon le protocole établi.

Validation de méthode : - sur sang total de donneur de sang RH1 connu

- sur plasma de donneur de sang RH1 connu et plasma de femmes enceintes à différents âges gestationnels (étude en dilution de plasma et étude en dilution d'ADN).

Le génotypage *RHD* a d'abord été réalisé sur des plasmas de donneurs, le sang des mères enceintes RH -1 étant précieux et disponible en faible quantité.

- L'extraction

L'extraction de l'ADN a été réalisée avec le kit QIamp DSP Virus® (Qiagen, Pays-Bas). Le QIamp DSP DNA Blood Mini kit® a également été testé mais ne s'utilise en principe que pour l'extraction de l'ADN à partir de sang total. Il a donc été évalué uniquement dans l'éventualité d'une analyse d'ADN maternel en cas de résultat douteux sur le plasma. En effet, l'amplification de l'ADN fœtal est visible au bout de 30 cycles environ. Si elle a lieu avant, il faut se méfier, car il est fort possible que ce soit l'ADN de la mère et non celui du fœtus qui ait été amplifié. L'ADN maternel est en effet visible aux alentours de 20 cycles, car sa quantité dans le plasma est plus importante. Dans ce cas de figure, il faut alors vérifier qu'il s'agit bien de l'ADN de la mère en extrayant l'ADN de ses leucocytes à partir de sang total avec le kit QIamp DSP DNABlood Mini®. Cependant, il est à noter que, même si ce dernier kit est spécifique au sang total, il contient les mêmes réactifs et le même matériel que le kit QIamp DSP Virus®.

Le protocole d'extraction suivi est celui fourni par le fabricant.

L'incubation permet de dénaturer l'ADN en deux brins simples. Puis les premières centrifugations récupèrent les gouttelettes accrochées à la paroi du tube, les suivantes éliminent les débris protéiques accrochés à l'ADN, le purifiant, et la dernière permet de détacher l'ADN de la colonne de silice.

Le contrôle interne d'extraction contenant de l'ADN de maïs est ajouté aux plasmas échantillons après dilution dès la première étape d'extraction de l'ADN. Il est dilué,

selon le protocole, au 1/100<sup>ème</sup> dans de l'eau de qualité BM, et 5µL sont ajoutés au plasma. Ce contrôle interne d'extraction permet de garantir la qualité et le rendement de l'extraction, pour pouvoir affirmer, en cas d'échantillon négatif pour tous les exons, que la réaction de PCR s'est bien déroulée.

Il s'est cependant avéré que la dilution au 1/100<sup>ème</sup> du contrôle interne d'extraction contenant de l'ADN de maïs prévue par Biorad est trop grande et ne permet pas l'amplification par la sonde correspondant à l'exon maïs. Une dilution au 1/50<sup>ème</sup> a donc été préférée et l'amplification de l'exon maïs s'est alors révélée efficace.

Les manipulations ont par la suite été réalisées à cette dilution.

Quant au volume utilisé pour extraire l'ADN, si Qiagen préconise d'apporter 200µL de plasma, 250µL sont plutôt utilisés afin d'avoir un maximum d'ADN détectable pour l'amplification.

L'extraction de l'ADN des témoins positifs et négatifs est réalisée en parallèle de l'extraction des échantillons.

Les sondes et amorces correspondant aux exons 5, 7, 10 et maïs sont ajoutées au pré-mélange réactionnel de Roche lors de la préparation pour le dépôt dans la plaque 96 puits pour l'amplification

L'extraction des ADN a été réalisée sur différents kits d'extraction Qiagen, puis les échantillons obtenus ont été dilués pour tester la sensibilité de chaque kit grâce à une amplification.

Le premier kit testé est le QIAamp DSP Virus® sur de l'ADN extrait du plasma :

ADN	dilution	tampon	résultats	nombre de cycles
ADN RH1 (6 échantillons)	pur	Eau de qualité BM	+ pour les exons 5, 7 et 10	29,76 à 34,78
		Pool d'ADN RH-1		
	1/5ème	Eau de qualité BM		29,75 à 37,79
		Pool d'ADN RH-1		
	2/5ème	Eau de qualité BM		
		Pool d'ADN RH-1		
	3/5ème	Eau de qualité BM		
		Pool d'ADN RH-1		
4/5ème	Eau de qualité BM			
	Pool d'ADN RH-1			
ADN RH-1	pur	Eau de qualité BM	- pour l'exon 7 + pour les exons 5 et 10	47,23 pour l'exon 5
		Pool d'ADN RH-1		40,27 pour l'exon 10
Eau	-	-	- pour les exons 5, 7 et 10	-

La dilution de l'ADN dans deux tampons de dilution différents permet de juger de leur qualité en tant que tampon. En l'occurrence, les deux sont équivalents.

L'ADN RH -1 pur déposé est un témoin qui permet d'exclure toute contamination lors des manipulations.

Exemple d'interprétation :

Le fait que l'ADN RH-1 issu du pool d'ADN négatif sorte négatif après amplification de la région correspondant à l'exon 7, mais positif après amplification des régions correspondant aux exons 5 et 10 du gène *RHD* indique qu'il y a eu contamination lors du dépôt dans la plaque 96 puits.

Les valeurs de Ct de référence sont comprises entre 30 et 40 cycles maximum pour l'ADN issu de plasma. Or, le logiciel révèle que les Ct de l'ADN RH-1 amplifié alors qu'il ne devrait pas l'être sont à 47,23 cycles pour l'exon 5 et 40,27 cycles pour le 10. Ces valeurs de Ct sont supérieures à l'intervalle donné par le fabricant et l'échantillon est donc considéré comme étant négatif. L'amplification de cet ADN est due au nombre de cycles trop important qui fait que les sondes et les amorces s'amplifient elles-mêmes (tricotage d'amorces).

La même expérience a été réalisée avec le kit QIAamp DSP DNA Blood® sur de l'ADN extrait du plasma. Les résultats quant aux échantillons d'ADN RH1 purs et dilués sont identiques à ceux obtenus avec le premier kit, mis à part une légère variation dans le nombre de cycles. L'amplification de l'exon 5 de l'échantillon RH-1 révèle encore une fois une contamination au moment du dépôt dans la plaque de 96 puits. Mais de même, le nombre de cycles ayant dépassé la limite prévue, le résultat de l'amplification est finalement considéré comme négatif.

Enfin, le même kit a été testé pour une série de dilution réalisée sur l'ADN extrait de sang total. Les résultats sont alors identiques à ceux de la première série d'analyses.

- L'amplification

A noter que les différents kits contiennent, entre autres choses, un mix de dNTP (désoxynucléotides triphosphates) dans lequel l'uracile remplace la thymine pour réduire le nombre de mutations au moment de la phase d'élongation.

Les kits LightCycler Taqman Master® (Roche, France) et LightCycler 480 Probes Master® (Roche, France) peuvent être utilisés pour l'amplification. Ils ne diffèrent pas par leur composition, mais par leur convenance d'automate. Le LightCycler 480 Probes Master® est en effet spécifique et ne peut être utilisé qu'avec l'automate LightCycler 480 II®, alors que le kit LightCycler Taqman Master®, lui, peut être utilisé avec tous les LightCycler existants, incluant celui qui nous intéresse.

Cependant, la pratique a montré que l'amplification voulue n'a pas eu lieu lorsque le kit LightCycler 480 Probes Master® a été utilisé à l'EFS ; la suite des manipulations a donc été réalisée avec le kit LightCycler Taqman Master®. D'où l'intérêt de tester les deux réactifs lors de la mise en place d'un protocole.



- Stabilité de l'ADN extrait de plasma

L'EFS recevant des échantillons de sang pour analyse de toute la région, il est très important de connaître la durée de stabilité de l'ADN extrait de plasma à température ambiante. En effet, si cette durée devait être trop courte, l'intérêt du génotypage tel qu'il est envisagé serait remis en question, car, à cause de soucis d'acheminement, une grande partie des échantillons ne serait plus utilisable. Ainsi pour rendre des résultats fiables et reproductibles, la conservation en bon état de l'ADN doit être assurée.

Le but de la manipulation est de déterminer s'il est possible de réaliser un génotypage fœtal *RHD* sur du plasma maternel prélevé il y a plus de 48h sans que les résultats soient discordants d'un jour à l'autre. Les analyses sont ainsi répétées tous les jours sur une durée de huit jours.

Cinq donneurs dont le phénotype est connu offrent leur sang, les prélèvements sont ensuite directement analysés après le don. On observe un échantillon RH-1 et quatre RH1.

Durant huit jours, les plasmas ne seront pas congelés, mais conservés à température ambiante afin de tester la stabilité de l'ADN, et plus particulièrement celle du gène *RHD*.

Chaque jour, les protocoles d'extraction (kit QIAamp DSP Virus®) et d'amplification sont réalisés à partir des plasmas à disposition. Un témoin positif et un témoin négatif sont également inclus dans l'analyse, afin de valider les résultats.

Le témoin positif donne un résultat positif après amplification des régions correspondant aux exons 5, 7, 10 et de l'ADN de maïs.

Le témoin négatif, quant à lui, donne un résultat négatif après amplification des régions correspondant aux exons 5, 7 et 10, mais l'exon maïs donne bien un résultat positif.

Les témoins sont donc validés puisque les résultats obtenus sont ceux attendus.

Le contrôle interne contenant de l'ADN de maïs confirme l'absence d'inhibition durant la phase d'extraction, son Ct est en effet inférieur à 36 cycles dans toutes les amplifications.

Les échantillons RH1 sont tous révélés positifs suite à l'amplification des régions correspondants aux exons 5, 7, 10 du gène *RHD* et l'exon maïs.

Les Ct apparaissent de plus en plus tard à mesure que les jours passent, et ce pour chaque région étudiée du gène *RHD*. Cependant, le délai de survenue du Ct est plus important pour certains ADN que pour d'autres.

Ce phénomène est particulièrement visible sur un des échantillons pour lequel, au jour 0, le Ct de la région du gène correspondant à l'exon 5 apparaît à 34.15 cycles, alors qu'il ne survient qu'à 37.36 cycles au jour 8.

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que l'ADN est peu à peu dégradé au fil des jours.

Ainsi la durée de conservation de l'ADN du plasma à température ambiante semble être satisfaisante et permet le traitement à grande échelle des échantillons de sang

maternel.

Par ailleurs, les analyses effectuées sur des femmes enceintes à différents âges gestationnels et après l'accouchement confirment l'épuration très rapide de l'ADN fœtal après l'accouchement (probablement par un mécanisme de dégradation actif).

Les protocoles indiqués par les laboratoires, quoique très légèrement modifiés lorsqu'il le fallait, permettent d'apporter des résultats exacts lors des analyses. Dans ces conditions, l'EFS Lorraine-Champagne devrait se trouver prêt à appliquer le DNPI en routine, lorsque le génotypage *RHD* fœtal passera à la nomenclature.

## **Conclusion**

Il est aujourd'hui techniquement possible de réaliser un génotypage *RHD* fœtal à partir du plasma maternel. Pourtant, ce test ne pourra être réalisé à grande échelle que lorsqu'il sera inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale et que ses indications et ses limites auront été clairement définies. A ce jour, il convient de se préparer et de s'équiper au mieux en attendant les résultats de l'étude GENIFERTH coordonnée à l'hôpital Saint-Antoine de Paris, qui devra représenter la base pour une nouvelle évaluation de la HAS quant au génotypage *RHD* fœtal, au rôle qu'il doit jouer et ses modalités.

Toutefois, alors que le sexe fœtal peut déjà être déterminé par le DPNI et qu'il sera aussi possible de détecter des anomalies chromosomiques chez le fœtus, il est clair qu'il sera indispensable de réfléchir aux questions éthiques qui ne manqueront pas d'accompagner les nouvelles avancées techniques offertes par le DPNI à partir du sang maternel.

## Index des figures

Figure 1: Organisation classique du locus RH pour des individus caucasiens RH1 (Morzine, 2007).....	18
Figure 2: Les antigènes RH sont présents dans la membrane du globule rouge au sein d'un complexe dont le cœur est un tétramère composé de deux molécules RH (D et/ou CE) et de deux molécules RHAG. Les protéines CD47, LW et GPB sont attachées à ce complexe par des liaisons non covalentes. (Cartron et Colin, 1997).....	19
Figure 3: Le macrocomplexe RH/Bande 3/ankyrine. Le complexe RH constitue, avec les complexes Bande 3/ankyrine/protéine 4.2 et GPC/protéine 4.1/p55, un nouveau site majeur d'ancrage du squelette érythroïde à la bicouche lipidique membranaire. Dans le modèle proposé, le complexe RH et l'échangeur d'anion Bande 3 sont associés l'un et l'autre avec le squelette dépendant de la spectrine au travers de leur interaction commune avec l'ankyrine et la protéine 4.2 (Nicolas et coll., 2003).....	20
Figure 4: Polymorphisme RH1/RH-1 dans la population caucasienne. (Wagner et coll., 2005).....	22
Figure 5: Autres génotypes possibles donnant un phénotype RH-1 (Morzine, 2007)	23
Figure 6: RH1 partiels chez les caucasiens qui sont à risque d'anti-RH1( Westhoff et coll.,2004).....	24
Figure 7: RH1 partiels chez les afro-antillais qui sont à risque d'anti-RH1(Whesthoff et coll., 2004).....	25
Figure 8: Écarts entre la valeur normale du PSC-AMC et la valeur seuil de 1,5MoM, en fonction de l'âge gestationnel (Mari G., 2000).....	34
Figure 9: Lecture d'un test de Kleihauer : hématies maternelles incolores ayant perdu leur hémoglobine et hématies fœtales colorées avec l'hémoglobine qui fixe la phloxine. (EFS nord de France, Lille, V. Tunez, 2006).....	40
Figure 10: Résultats du contrôle de la qualité du test de Kleihauer selon Simonet et coll. (Centre National de Référence en Hémiobiologie Périnatale ou CNRHP, Brossard et Mailloux, 2006) .....	41
Figure 11: Schéma simplifié des étapes de fabrication du Rhophylac® et leur intérêt (Documentation LFB).....	56
Figure 12 : Réduction du titre viral de différents virus (laboratoire ZLB Behring)...	57
Figure 13: Les étapes d'inactivation/élimination virale dont l'efficacité peut être limitée face à des virus non enveloppés tels que le virus de l'hépatite A ou le parvovirus B19 (Documentation LFB).....	58
Figure 14: Circuit des MDS à l'hôpital (laboratoire LFB).....	62
Figure 15: Registre des MDS à compléter et conserver dans les officines (pharmacie Charroyer à Custines, 2013).....	63
Figure 16: Circuit des MDS en ville (laboratoire LFB).....	64
Figure 17: Composition du thermocycleur LightCycler 480 II (Courjan Pauline, 2013) .....	85
Figure 18: Allure d'une courbe d'amplification. (EFS Vandoeuvre, 2013).....	88
Figure 19: Courbe d'amplification où l'on voit les phases de plateau correspondant à l'amplification des trois exons 5, 7, et 10 du gène RHD et au contraire, l'absence d'amplification pour le témoin négatif en vert (EFS lorraine-Champagne, 2013).....	89
Figure 20: Guide d'interprétation des résultats du génotypage foetal RHD sur sang maternel (Biorad).....	91

## Index des tableaux

Tableau 1: Fréquences du phénotype RH1 faible .....	26
Tableau 2: Classification ISBT des antigènes du groupe Rhésus (ISBT).....	27
Tableau 3: Comparatif 2009 des grossesses pour les femmes de la population générale et pour les seules femmes RH-1 (Bergaentzle P., 2010).....	36
Tableau 4: Équivalence entre les nomenclatures traditionnelle et numérique pour les antigènes cités.....	43
Tableau 5: Calendrier des RAI au cours de la grossesse.....	44
Tableau 6: Estimation du nombre de doses de Rhophylac® à administrer en fonction du Rhésus des parents et du type de prévention (INSEE première n° 118, 2007).....	48
Tableau 7: Événements requérant une prophylaxie anti-RH1 au cours de la grossesse dans le cadre de la prévention ciblée (Mannessier et coll.).....	51
Tableau 8: Modes d'administration et doses de Rhophylac® à administrer en fonction des résultats du test de Kleihauer (J. Gynecol Obstét. Biol. Reprod., 2006).....	52

## BIBLIOGRAPHIE

[1] Le Van Kim C. et Colin Y.

Les antigènes de groupe sanguin Rh : du diagnostic anténatal de la maladie hémolytique du nouveau-né à la fonction de transport d'ammonium

Hématologie, 2004, 10, 5: 372-383.

[2] Westhoff C.M., Siegel D.L., Burd C.G., Foskett J.K.

Mechanism of genetic complementation of ammonium transport in yeast by human erythrocyte Rh-associated glycoprotein

J Biol Chem, 2004, 17: 279.

[3] Mari G., Deter R.L., Carpenter R.L., et al.,

Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization.

N Engl J Med, 2000; 342: 9-14.

[4] Bowman J.M., Chown B., Lewis M., Pollock J.M.

Rh isoimmunization during pregnancy: antenatal prophylaxis.

Can Med Assoc J, 1978, 118, 623-627

[5] Maayan-Metzger A., Schwartz T., Sulkes J., et Merlob P.

Maternal anti-D prophylaxis during pregnancy does not cause neonatal haemolysis

Arch dis child Fetal Neonatal Ed, 2001, 84: 60-62.

[6] Simonnet C, Brossard Y.

For a standardisation of the Kleihauer-Betke test.

Ann Biol Clin, 2001, 59, 6: 768-769.

[7] Chilcott J., Tappenden P., Lloyd Jones M., Wight J., Forman K., Wray J., Beverley C.

A review of the clinical effectiveness of routine antenatal anti-D prophylaxis for rhesus negative women who are pregnant.

BJOG, 2004, 111: 903-907.

[8] Pilgrim H., Lloyd Jones M., Rees A.

Routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative women : a systematic review and economic evaluation.

Health Technol Assess, 2009, 10, 13.

[9] CNGOF.

Prévention de l'allo-immunisation Rhésus D foetomaternelle. Recommandations pour la pratique clinique.

J Gynecol Obstet Biol Reprod, 2006.



- [10] Carbonne B., Goffinet F. et Marpeau L.  
Prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle anti RhD. Méthodes utilisées et thèmes abordés.  
J Gynecol Obstét et Biol Reprod, 2006, 35.
- [11] Carlin A.J. , Alfirevic Z.  
Techniques for chorionic villus sampling and amniocentesis : a survey of practice in specialist UK centres  
Prenatal diagnosis, 2008, 28, 10: 914-919.
- [12] Benachi A., Costa J.M.  
Le diagnostic prénatal non invasif (DPNI) sur sang maternel.  
Gynécologie obstétrique, 2012: 173-176.
- [13] Lo Y.M., Corbetta N., Chamberlain P.F., Rai V., Sargent I.L., Redman C.W. et Wainscot J.S.  
Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum.  
Lancet, 1997, 350, 9076: 485-487.
- [14] Zhong X., Holzgreve W. et Hahn S.  
Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts.  
Mol Hum Reprod, 2002, 8, 9: 864-870.
- [15] Flori E., Doray B., Gautier E., Kohler M., Ernault P., Flori J., Costa J.M.  
Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. Case report.  
Hum Reprod, 2004, 19, 3: 723-724.
- [16] Rouillac-Le Sciellour C., Serazin V., Brossard Y. et al.  
Non invasive fetal RHD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD.  
Transfus Clin Biol, 2007, 14: 572-577.
- [17] Rouillac-Le Sciellour C., Sérazin V., Brossard Y., Oudin O., Le Van Kim C., Colin Y., Guidicelli Y., Menu M., Cartron J.P.  
Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women.  
Mol Diagn, 2004, 8, 1: 23-31.
- [18] Denis Lo Y.M., Magnus Hjelm N., Fidler C. et al.  
Prenatal Diagnosis of Fetal RhD Status by Molecular Analysis of Maternal Plasma.  
N Engl J Med, 1998, 339: 1734-1738.
- [19] Costa J.M., Giovangrandi Y., Ernault P. et al.

- Fetal *RHD* genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy.  
British J haematol, 2002, 119, 1: 255-260.
- [20] Hromadnikova I., Vechetova L., Vesela K. et al.  
Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies.  
J Histochem Cytochem, 2005, 53, 3: 301-305.
- [21] Gonzales C., Garcia-Hoyos M., Trujillo-Tiebas M.J. et al.  
Application of Fetal DNA Detection in Maternal Plasma : A Prenatal Diagnosis Unit Experience.  
J Histochem Cytochem, 2005, 53: 307.
- [22] Dif-Couvreux D., Houfflin-debauge V., Delsalle A. et al.  
Evaluation of conventional hemi nested PCR analysis for fetal RHD determination in maternal plasma.  
J Gynécol Obstét Biol Reprod, 2006, 35, 7: 658-664.
- [23] Finning K., Martin P., Summers J. et al.  
Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women : prospective feasibility study.  
BMJ, 2008, 336, 7648: 816-818.
- [24] Minon J.M., Gerard C., Senterre J.M. et al.  
Routine fetal *RHD* genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium.  
Transfusion, 2008, 48, 2: 373-381.
- [25] Tse C., Capeau J.  
Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel.  
Ann Biol Clin, 2003, 61, 3: 279-293.



## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 07/10/2013

<p align="center"><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par : ERNEST JOHANNA</p> <p><u>Sujet</u> : Détermination précoce du génotype <i>RHD</i> foetal à partir du plasma maternel : état de l'art, cahier des charges et méthodologie.</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Pr. BERTRAND RIHN      Directeur : Pr. CLAUDE VIGNERON      Dr. CHRISTINE ANDRE-BOTTE      Juges : Dr. SYLVIE GROSS</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 02 septembre 2013</p> <p>Le Président du Jury B. Rihn</p> <p>Directeur de Thèse C. André-Botté C. Vigneron</p> <p align="center"><b>Professeur B. RIHN</b> Université de Lorraine</p>
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 9.09.2013</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center"><b>Francine PAULUS</b> FACULTE DE PHARMACIE</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 13.09.2013</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center"><b>Pierre MUTZENHARDT</b></p> <p>N° d'enregistrement : 6551</p>

Détermination précoce du génotype *RHD* fœtal à partir du plasma maternel : état de l'art, cahier des charges et méthodologie

Soutenue le 07/10/2013  
par Ernest Johanna

RESUME

Cette thèse a pour but de démontrer l'intérêt diagnostique que peut avoir le génotypage *RHD fœtal* effectué en routine, ainsi que de débattre des meilleures conditions de réalisation du dit génotypage. Pour ce faire, nous commencerons par rappeler les principales caractéristiques du système Rhésus et de l'allo-immunisation foeto-maternelle, avant d'aborder la question de la surveillance des grossesses à risque et celle de la prévention en France. Nous nous pencherons ensuite sur le Rhophylac®, son mode d'obtention, son mode d'action, et sa traçabilité. Puis nous aborderons enfin le thème du génotypage en lui-même : son histoire, ses modalités, les prérequis à son exécution, et ses enjeux. Nous concluons la thèse en nous attachant à l'exemple de l'EFS Lorraine-Champagne qui est en train de mettre en place la manipulation et de développer un protocole fiable afin de réaliser bientôt le génotypage en routine, ses premiers résultats seront ainsi présentés.

MOTS CLES

RHESUS  
ADN FOETAL LIBRE  
GENOTYPAGE  
IMMUNOGLOBULINES  
RAI  
KLEIHAUER  
PCR  
GROSSESSE

Directeurs de thèse	Thème	Nature
André-Botté Christine Vigneron Claude	1- Hémato-immunologie 2- Biologie moléculaire	Bibliographique