



HAL
open science

Le génotypage foetal rhésus sur sang maternel dans le cadre de la prévention de l'allo-immunisation rhésus

Pauline Bergaentzlé

► **To cite this version:**

Pauline Bergaentzlé. Le génotypage foetal rhésus sur sang maternel dans le cadre de la prévention de l'allo-immunisation rhésus. Médecine humaine et pathologie. 2010. hal-01886323

HAL Id: hal-01886323

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01886323>

Submitted on 2 Oct 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-theses-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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université Henri Poincaré, Nancy I

École de Sages-femmes

Pierre Morlanne de METZ

Le génotypage foetal rhésus sur sang maternel
dans le cadre de la prévention
de l'allo-immunisation rhésus

[Monographie]

Mémoire présenté et soutenu par
BERGAENTZLE Pauline

Née le 20 octobre 1986

Promotion 2006-2010



« Cet écrit n'engage que la responsabilité de son auteur »

REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont participé, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire.

Je tiens, en tout premier lieu, à remercier chaleureusement Monsieur le Docteur LEMARIÉ, mon directeur de mémoire, pour l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et pour avoir porté un regard critique, ouvert et constructif sur mon travail. En dépit de son emploi du temps chargé, je mesure tous les efforts qu'il a dû fournir pour se rendre disponible, particulièrement durant la phase de rédaction de ce mémoire.

Je tiens ensuite à remercier le Docteur MINON, chef de service de Biologie Clinique du CHR de la Citadelle à Liège (Belgique), pour le partage de ses connaissances et ses précieux conseils.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur CARTRON, Directeur Scientifique de l'Institut National de Transfusion Sanguine (INTS), pour sa contribution à ma réflexion au cours de l'élaboration de ce mémoire.

Ma reconnaissance va également envers Monsieur MENU, Président directeur général de l'institut de Biotechnologies Jacques Boy, pour la richesse des informations et documents qu'il m'a adressés.

Un grand merci à mes parents pour leur soutien, leur présence, leur patience et leur amour tout au long de mes études.

Enfin j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis qui ont su me soutenir et m'encourager tout au long de la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	4
SOMMAIRE.....	5
INTRODUCTION	7
PARTIE 1 : PRÉVENTION ACTUELLE DE L'ALLO-IMMUNISATION RHÉSUS EN FRANCE	9
1. Définition de l'allo-immunisation	10
2. L'incompatibilité dans le système Rhésus.....	10
2.1. La découverte du système Rhésus.....	10
2.2. Epidémiologie de l'allo-immunisation RhD	12
2.3. Les mécanismes de l'allo-immunisation.....	14
2.3.1. Allo-immunisation fœto-maternelle anti-RhD.....	15
2.3.2. Allo-immunisation par transfusion	18
3. Les conséquences de l'allo-immunisation	19
4. Le dépistage de l'incompatibilité sanguine fœto-maternelle.....	21
4.1. Détermination du statut immunologique de la mère	21
4.2. Recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) chez toutes les femmes enceintes	21
4.2.1. Chez la femme Rhésus négatif.....	22
4.2.2. Chez la femme Rhésus positif.....	23
4.2.3. Chez la femme immunisée	23
4.3. Le test de Kleihauer	24
5. La prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle en France : de ses débuts aux recommandations actuelles.....	25
5.1. Le principe de la prévention de l'incompatibilité Rhésus anti-D	25
5.2. Les débuts de la prophylaxie de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D ...	26
5.3. Une prévention ciblée de l'allo-immunisation fœto-maternelle en France à partir de 1970	26
5.4. Une prévention systématique et ciblée de l'allo-immunisation fœto-maternelle en France depuis 2006.....	28
5.4.1. Deux schémas thérapeutiques	29
5.4.2. Les recommandations pour la pratique clinique	29
5.4.3. Les risques biologiques.....	30
5.4.4. Coût financier de la prévention systématique	31
PARTIE 2 : PRÉSENTATION DES ÉTUDES ET DE LEURS RÉSULTATS	35
1. Méthodologie de recherche.....	36
1.1. Le choix du thème	36
1.2. Les objectifs de l'étude	36
1.3. Les hypothèses de recherche.....	36
1.4. Description de l'étude	37
1.4.1. Durée de l'étude.....	37
1.4.2. Choix des études.....	37

2.	Présentation des études et de leurs résultats.....	38
2.1.	Étude de Lo et al	39
2.2.	Étude de Costa et al.....	42
2.3.	Étude de Hromadnikova et al.....	44
2.4.	Étude de González et al.....	46
2.5.	Étude de Dif-Couvreux et al	49
2.6.	Étude de Rouillac et al	52
2.7.	Étude de Finning et al	55
2.8.	Étude de Minon et al	57
2.9.	Tableaux récapitulatifs des 8 études	63
PARTIE3 : ANALYSE ET DISCUSSION.....		65
1.	Analyse des différentes études.....	66
1.1.	Interprétation des résultats de l'étude de Lo et al.	66
1.2.	Interprétation des résultats de l'étude de Costa et al.....	66
1.3.	Interprétation des résultats de l'étude de Hromadnikova et al.....	67
1.4.	Interprétation des résultats de l'étude de González et al.....	68
1.5.	Interprétation des résultats de l'étude de Dif-Couvreux et al.	68
1.6.	Interprétation des résultats de l'étude de Rouillac et al.	69
1.7.	Interprétation des résultats de l'étude de Finning et al.	70
1.8.	Interprétation des résultats de l'étude de Minon et al.	71
2.	Discussion.....	72
2.1.	Utilisation de l'ADN foetal libre circulant dans le plasma maternel.....	72
2.2.	La population étudiée.....	73
2.2.1.	<i>Age gestationnel</i>	73
2.2.2.	<i>Parité et gestité des patientes</i>	74
2.2.3.	<i>Grossesses gémeillaires versus grossesses uniques</i>	74
2.2.4.	<i>Origine ethnique</i>	75
2.2.5.	<i>Anamnèse</i>	76
2.3.	Préparation des prélèvements.....	76
2.3.1.	<i>Tubes à prélèvements sanguins</i>	77
2.3.2.	<i>Délai d'acheminement vers le laboratoire</i>	77
2.4.	Analyse par PCR.....	77
2.4.1.	<i>PCR en temps réel versus PCR classique</i>	77
2.4.2.	<i>PCR multiplexe en temps réel</i>	78
2.4.3.	<i>Mesures strictes nécessaires</i>	80
2.4.4.	<i>Résultats faux-négatifs et faux-positifs</i>	80
2.4.5.	<i>La Trousse "Free DNA Fetal Kit RhD"</i>	81
2.5.	Le coût financier du génotypage foetal RhD sur sang maternel.....	82
2.6.	Proposition de stratégie de prise en charge	83
CONCLUSION.....		86
ANNEXE 1 :		I
ANNEXE 2 :		II

INTRODUCTION

L'allo-immunisation anti-Rhésus D (RhD) est responsable d'anémies fœtales et néonatales sévères ainsi que d'ictères néonataux graves.

Sa fréquence a considérablement diminué depuis la généralisation des injections d'immunoglobulines anti-D chez les femmes Rhésus négatif au cours de la grossesse et après l'accouchement.

Jusqu'en 2005, en France, la prévention par immunoglobulines anti-D au cours de la grossesse n'était pratiquée qu'en cas de situation à risque.

Cependant certaines immunisations surviennent au cours de la grossesse, sans facteur de risque identifié d'hémorragie fœto-maternelle. De nombreuses femmes échappaient donc à une prévention ciblée. Cette constatation a conduit la France et d'autres pays à proposer une injection systématique d'immunoglobulines anti-D au 3^{ème} trimestre de la grossesse à toutes les femmes Rhésus négatif.

Lors de mes stages effectués en maternité, je me suis de nombreuses fois interrogée sur le nombre de femmes RhD négatif ayant accouché de fœtus RhD négatif et ayant reçu à titre systématique une injection d'immunoglobulines au cours de la grossesse qui aurait pu être évitée. Ces femmes ont donc été exposées inutilement à des produits dérivés du sang.

De nombreux articles parus dans des revues spécialisées m'ont permis de découvrir une nouvelle technique: le génotypage RhD fœtal sur sang maternel. Une prise de sang maternel suffirait à déterminer le Rhésus fœtal. Cette technique de génotypage RhD fœtal pendant la grossesse permettrait donc de limiter le nombre d'injections d'immunoglobulines aux seuls cas utiles et ainsi de réduire les risques liés à l'injection de produits dérivés du sang.

Cette découverte technique ouvre des perspectives nouvelles au cœur de l'actualité gynéco-obstétricale.

Dans cette optique, il s'agira donc de réfléchir aux pratiques actuelles, à leurs limites et à leurs risques avant de s'interroger sur l'avenir de la technique de génotypage foetal Rhésus sur sang maternel.

En première partie, nous ferons un état des lieux de la prévention actuelle de l'allo-immunisation foeto-maternelle en France après en avoir donné une définition et présenté les mécanismes et conséquences.

En deuxième partie, nous présenterons les différentes études publiées sur le génotypage foetal Rhésus sur sang maternel ainsi que leurs résultats.

Enfin, dans un dernier temps, nous procéderons à l'analyse et à la discussion des résultats des différentes études.

PARTIE 1 :
PRÉVENTION ACTUELLE DE
L'ALLO-IMMUNISATION RHÉSUS
EN FRANCE



1. Définition de l'allo-immunisation

L'allo-immunisation foëto-maternelle est due chez la femme RhD négatif, à la synthèse d'anticorps anti-D en réponse au passage transplacentaire d'hématies foëtales RhD positif dans la circulation maternelle.

Les anticorps maternels (IgG) traversent le placenta vers la circulation foëtale et se dirigent contre les éléments figurés du sang foëtal, principalement les hématies mais parfois aussi les plaquettes.

Les antigènes les plus souvent concernés dans l'incompatibilité foëto-maternelle sont les antigènes des systèmes ABO, Rhésus, Kell, Duffy et MNS. L'incompatibilité ABO est la plus fréquente mais elle est rarement préoccupante. En revanche, la sensibilisation Rhésus à l'antigène D est la plus redoutable puisqu'elle peut conduire à des situations obstétricales majeures voire des décès in-utéro (la maladie survient donc chez des enfants Rhésus positif de mères Rhésus négatif) [1,2].

2. L'incompatibilité dans le système Rhésus

2.1. La découverte du système Rhésus

En 1939, Levine et Stetson découvrent dans le sérum d'une femme qui vient d'accoucher d'un enfant mort-né, un anticorps qui agglutine les hématies du père.

En 1940, Landsteiner et Wiener immunisent des lapins avec des globules rouges d'un singe "Macacus Rhésus" et identifient dans leur sérum un anticorps actif non seulement sur les globules rouges de ces singes, mais aussi sur les hématies de 85% des sujets humains.

Ces 85 % furent donc appelés Rhésus positif et les 15% dont les hématies étaient mal agglutinées ou non agglutinées après dilution convenable de l'antisérum furent appelés Rhésus négatif.

Ainsi est reconnu l'antigène "rhésus" ou "Rh" responsable de l'allo-immunisation foëto-maternelle.

Les antigènes du système Rhésus sont portés sur des protéines en situation transmembranaire.

Ce système présente plus de 50 antigènes mais cinq antigènes sont à connaître en pratique courante : D (RH1), C (RH2), E (RH3), c (RH4), e (RH5). Ces antigènes se répartissent selon les couples antithétiques : D/d, C/c et E/e. L'antigène d n'existe pas. Par convention, lorsqu'il est noté, il signifie l'absence de l'antigène D. Sur une hématie, pour chacun de ces couples, on peut avoir un antigène ou l'autre ou les deux mais en aucun cas ni l'un ni l'autre. Les antigènes de chaque couple sont codominants.

La difficulté de l'étude du système Rhésus est accrue par l'existence de plusieurs nomenclatures : celles de Fisher-Race (Grande-Bretagne), de Wiener (USA) et de Rosenfield (nomenclature internationale).

Dans la pratique médicale courante, on distingue les individus rh- (ou RH :-1 dans la nomenclature internationale) qui ne portent pas l'antigène D sur la surface de leurs hématies et les individus Rh+ (Rh :1 dans la nomenclature internationale), qui présentent l'antigène D. Les sujets Rhésus positifs peuvent être homozygotes ou hétérozygotes pour le gène D. Ceux qui ne possèdent pas D sont des homozygotes récessifs.

	Homozygote	Hétérozygote
Rh+	DD	Dd
Rh-	dd	

Il faut noter l'existence d'un variant antigénique faible de D appelé Du. Chez un sujet Du+, le nombre de molécules d'antigène D présentes à la surface des hématies est plus faible que dans les cas habituels. L'antigène D est donc présent mais faiblement exprimé. On a pu considérer ces sujets comme des sujets Rhésus négatif mais les sujets Du+ doivent être classés comme Rhésus positif car ce D même faible est immunisant.

En tant que donneur de sang, le sujet Du+ doit donc être considéré comme donneur positif. Par ailleurs, certains sujets Du+ peuvent faire des anticorps anti-D, on les considère alors comme des receveurs négatifs [1-4].

2.2. Epidémiologie de l'allo-immunisation RhD

En 2008, 828 404 naissances vivantes ont été enregistrées en France et dans les DOM-TOM [5].

Compte tenu du nombre de naissances par accouchement qui est de l'ordre de 1,015 [4], le nombre de grossesses donnant lieu à au moins une naissance vivante est de 816 162 environ.

Il faut ajouter le nombre de mort-nés qui a été de 8 838 en 2008 [5], ce qui donne environ 825 000 grossesses dont l'issue est au moins un nouveau-né vivant ou décédé.

Pour connaître le nombre de grossesses totales conçues chaque année en France, il faut encore ajouter :

- les Fausses Couches (FC) dont l'incidence est estimée à 15-20 % des grossesses totales [2] ;
- les interruptions volontaires de grossesse (IVG) estimées en France, en 2007 à 227 050 selon la DREES (Direction de la Recherche, des Études, de l'Évaluation et des Statistiques) [6] ;
- les Interruptions Médicales de Grossesse (IMG) de l'ordre de 0,7% des grossesses avec nouveau-nés vivants ou décédés soit 5 775 IMG en France pour l'année 2008 [4] ;
- les grossesses extra-utérines (GEU) dont l'incidence dans les pays développés est de l'ordre de 100 à 175 GEU par an pour 100 000 femmes âgées de 15 à 45 ans, soit environ 2% des naissances vivantes [7], ce qui donne 16 568 GEU en France pour l'année 2008.

Au total, **le nombre de grossesses conçues chaque année en France** serait de l'ordre de 1 264 000 à 1 343 000 (soit en moyenne 1 303 491).

Le groupe RhD négatif représente en moyenne 15 % de la population française (dite caucasienne), et donc aussi 15 % des femmes enceintes ou ayant accouché [4].

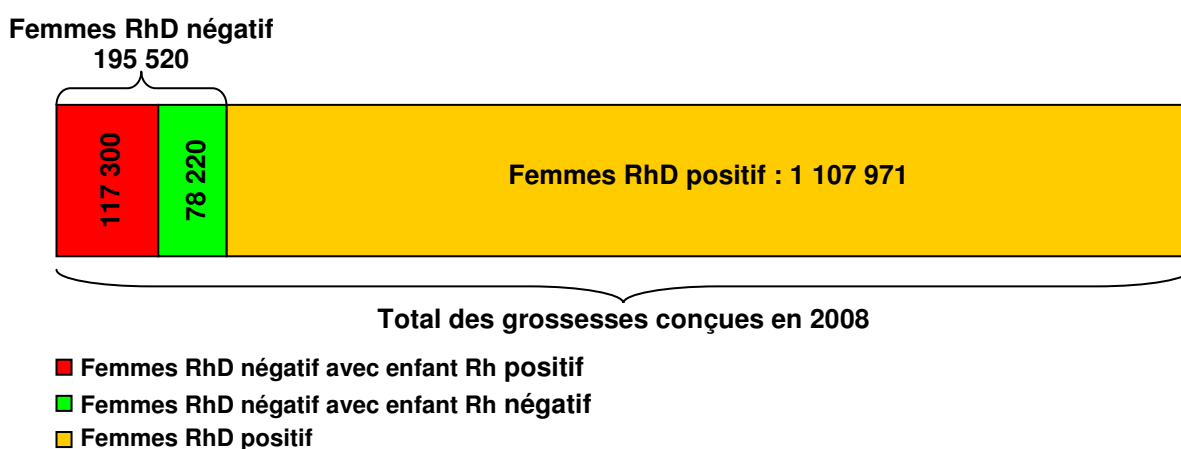
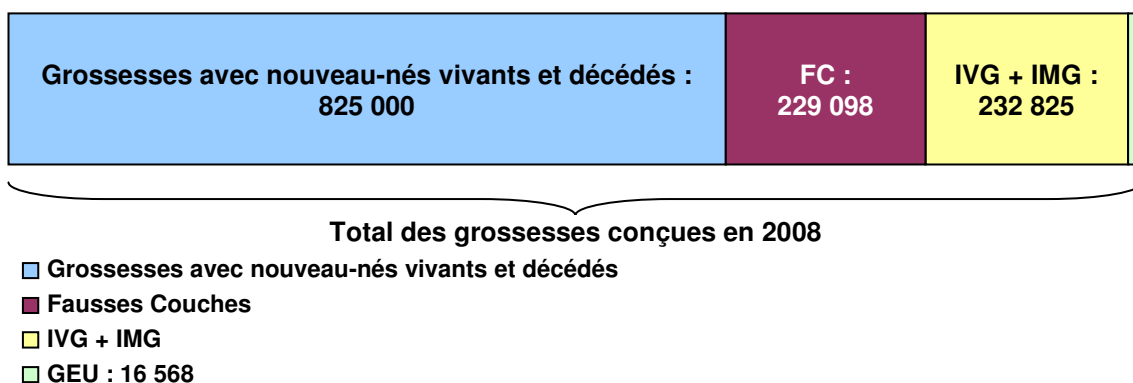
On peut donc évaluer entre 189 600 et 201 450 le **nombre de femmes RhD négatif enceintes chaque année, en France** (soit en moyenne 195 520).

La fréquence du gène RhD étant de 0,6 dans la population française [4], le nombre annuel des femmes RhD négatif avec fœtus RhD positif serait de l'ordre de 113 760 à 120 870 (soit en moyenne 117 300).

Le tableau suivant présente l'ensemble des résultats ci-dessus :

	Population de toutes les femmes enceintes		Population des femmes enceintes RhD négatif (15% de la population des femmes enceintes)	
	<i>Hypothèse basse</i>	<i>Hypothèse haute</i>	<i>Hypothèse basse</i>	<i>Hypothèse haute</i>
Grossesses avec nouveau-nés vivants et décédés	825 000	825 000	123 750	123 750
Fausse 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
Grossesses totales conçues	1 263 991	1 342 991	189 598	201 448
Moyennes des grossesses totales conçues	1 303 491		195 520	

Les données du tableau précédent peuvent être schématisées dans les graphiques suivants :



2.3. Les mécanismes de l'allo-immunisation

Les cinq antigènes du système Rhésus sont impliqués dans l'incompatibilité fœto-maternelle dans l'ordre de fréquence suivant :

$$D > c > E > C > e$$

La maladie Rhésus, mettant en cause l'antigène D est la plus grave de ces incompatibilités.

L'incompatibilité fœto-maternelle anti-Rhc est de gravité analogue à l'incompatibilité anti-RhD tandis que les incompatibilités fœto-maternelles anti-RhE, anti-RhC et anti-Rhe sont de gravité moindre et ne provoquent qu'exceptionnellement une atteinte fœtale [1].

Ainsi 3 classes de gravité d'allo-immunisation peuvent être différenciées. Elles sont répertoriées dans le tableau suivant [8] :

Classe 1 (les plus nombreuses): sans risque pour l'enfant	Classe 2 : risque limité à une maladie hémolytique post-natale (ictère périnatal, pas de retentissement foetal)	Classe 3 : risque d'anémie sévère in-utéro
Anti-LE1 (Lea), LE2 Anti-MNS2 (N) Anti-P1 Anti-H, anti-Hi Anti-LU1 (Lua), LU2 (Lub) Tous les auto-anticorps anti-papaïne	Anti-FY1 (Fya), FY2 (Fyb) Anti-JK1 (Jka), JK2 (Jkb) Anti-MNS3 (S), MNS4 (s) Anti-MNS1 (M) Anti-RH3 (E) Anti-RH2 (C) Anti-RH5 (e) Anti-RH8 (Cw)	Anti-RH1 (D) Anti-RH4 (c) Anti-KEL1 (Kell)

Deux circonstances conduisent à l'allo-immunisation maternelle. En effet, celle-ci peut être consécutive soit à une transfusion foëto-maternelle soit à une transfusion sanguine antérieure incompatible (n'ayant pas respecté le phénotype Rhésus) [9].

2.3.1. Allo-immunisation foëto-maternelle anti-RhD

L'allo-immunisation se produit s'il y a contact entre un antigène de groupe foëtal et une mère réactive qui ne le possède pas.

Cinq conditions sont donc nécessaires à la survenue d'une allo-immunisation maternelle :

- 1) l'antigène responsable doit être immunogène,
- 2) cet antigène doit être bien développé chez le foëtus (sur le plan quantitatif),
- 3) cet antigène doit être exclusivement localisé sur la membrane érythrocytaire,
- 4) l'anticorps réactionnel produit par la mère doit pouvoir passer le placenta,
- 5) il doit exister une immunisation préalable de la mère vis-à-vis de l'antigène considéré.

L'allo-immunisation fœto-maternelle primaire gravidique résulte d'Hémorragies Fœto-Maternelles (HFM) c'est-à-dire d'hémorragies de sang fœtal vers la circulation maternelle. Ces hémorragies peuvent survenir dès le premier trimestre de la grossesse (4% des femmes enceintes).

Le volume de l'hémorragie sera plus important en fin de grossesse et notamment au moment de l'accouchement (1% des HFM sont supérieures à 2,5 ml au 3^{ème} trimestre ; 3% sont supérieures à 5 ml à l'accouchement ; 3% sont supérieures à 10 ml à l'accouchement) [13].

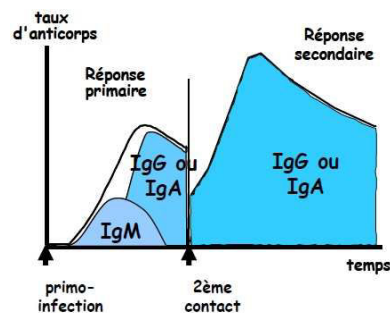
L'allo-immunisation anti-RhD va donc résulter, chez une femme Rhésus négatif, du passage d'hématies fœtales Rhésus positif dans sa circulation. Cette iso-immunisation est rare au cours d'une première grossesse car l'HFM est souvent faible (inférieure à 2,5 ml) et la réponse immunitaire à ce passage d'hématies est lente.

En effet, deux types de réponse sont observés comme lors de toute réponse immunitaire :

- la réponse primaire : lors du premier contact avec un antigène étranger, 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 principalement constitués d'immunoglobulines M (IgM), **ils apparaissent exceptionnellement avant 1 mois après l'exposition. Habituellement, ils apparaissent entre 8 et 9 semaines et parfois même seulement après 6 mois. Il se produit ensuite une commutation en IgG et A. Sauf exception il n'y a pas de Maladie Hémolytique du Nouveau-Né (MHNN) chez une primipare.**

- la réponse secondaire : lors d'un deuxième ou énième contact avec le même antigène, **les cellules immunocompétentes peuvent synthétiser les anticorps en 24 ou 48 heures**. Les anticorps sont alors principalement des immunoglobulines G (IgG) et A (IgA). **La réponse secondaire est explosive** et va entraîner une allo-immunisation. En outre, s'il existe une incompatibilité ABO associée, le risque d'immunisation diminue de 5 à 10 fois du fait de la destruction rapide des hématies par les anticorps ABO naturels maternels.

Courbes des anticorps produits lors des réponses primaires et secondaires
[10]



Toute manipulation obstétricale peut entraîner ou aggraver une allo-immunisation fœto-maternelle par le biais de l'HFM.

Au premier trimestre, les principaux événements favorisant le passage d'hématies fœtales dans la circulation maternelle sont : les Fausses Couches Spontanées (FCS), les interruptions de grossesse (IVG, IMG) quels que soient le terme et la méthode utilisée, les grossesses extra-utérines (GEU), les grossesses molaire, les métrorragies, les choriocentèses (biopsie de villosités chorales) et amniocentèses, les réductions embryonnaires, les traumatismes abdominaux et les cerclages.

Aux deuxième et troisième trimestres, il y a un risque important de passage d'hématies fœtales en cas d'Interruption Médicale de Grossesse (IMG), de fausse couche spontanée tardive, de Mort Fœtale In-Utéro (MFIU), de versions par manœuvre externe (VME), de traumatismes abdominaux ou pelviens (quel que soit le terme de la grossesse), d'interventions chirurgicales

abdominales ou pelviennes (quel que soit le terme de la grossesse), de prélèvements ovulaires (amniocentèse, cordocentèse, placentocentèse) et lors de l'accouchement (quelle que soit la voie). On observe également un risque modéré de passage d'hématies fœtales en cas de métrorragies, cerclage du col utérin et Menace d'Accouchement Prématuro (MAP) [11-14] [annexe1, tableau1].

Ces situations sont repérables. Cependant, on estime qu'environ 25% des patientes vont développer une allo-immunisation Rhésus sans cause apparente. En effet, il existe un passage spontané d'hématies fœtales en fin de grossesse que l'on ne peut prévenir [14].

Ce passage spontané d'hématies fœtales survient dans 4% des cas au 1^{er} trimestre, 12% au 2^{ème} trimestre, 45% au 3^{ème} trimestre et 60% à l'accouchement (total de 121% ...surprenant ?!) [13].

2.3.2. Allo-immunisation par transfusion

Les allo-immunisations post-transfusionnelles sont devenues exceptionnelles. Elles se font selon les mêmes modalités mais sont la conséquence de transfusions antérieures sans respect du phénotype Rhésus. La fréquence de ces allo-immunisations est fonction du degré d'immunogénicité de l'antigène et d'autre part des possibilités de rencontre entre le donneur et le receveur ne le possédant pas. Le volume du sang transfusé est important donc un antigène même faiblement immunogène pourra entraîner une immunisation. Tous les antigènes peuvent donc être responsables d'immunisations, mais les anticorps immuns les plus fréquents sont l'anti-D +/- C +/- E, l'anti-E, l'anti-c du système Rhésus, l'anti-K du système Kell, l'anti-S du système MNS, l'anti-Fya du système Duffy et l'anti-JKa du système Kidd [1,2].

3. Les conséquences de l'allo-immunisation

L'allo-immunisation fœto-maternelle est responsable de la Maladie Hémolytique du Nouveau-Né (MHNN).

Les immunoglobulines G (IgG) maternelles franchissent la barrière placentaire et se fixent sur les globules rouges du fœtus, lesquels sont alors captés par les macrophages de la rate et du foie fœtaux et détruits.

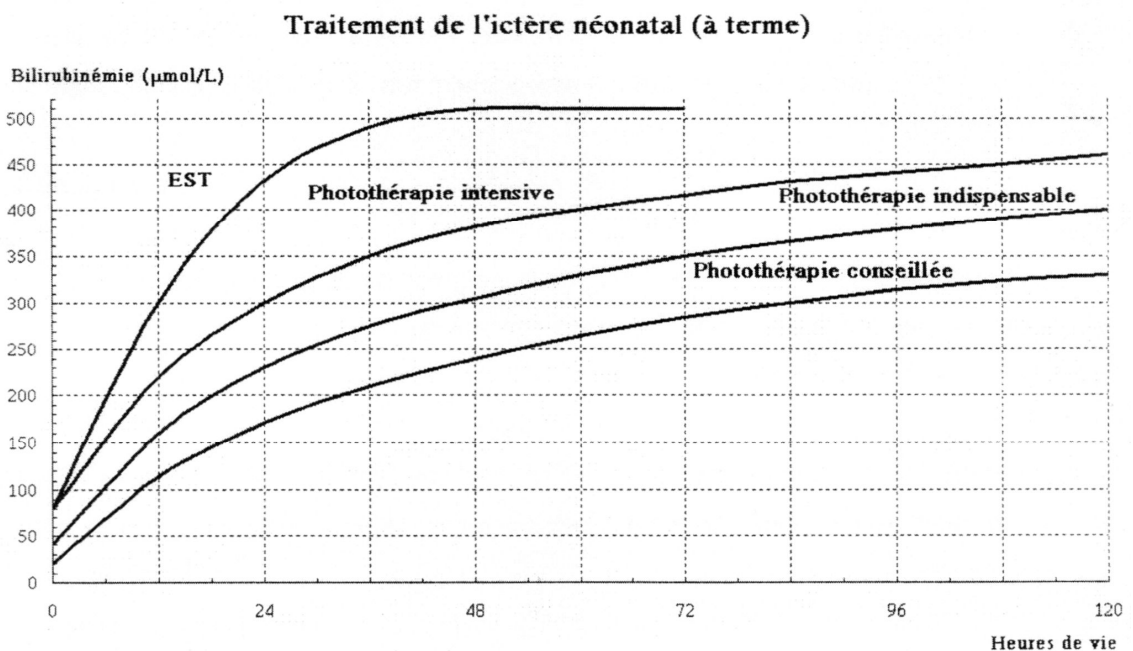
La MHNN atteint le fœtus et le nouveau-né. Elle est responsable d'une immuno-hémolyse fœtale importante avec ses deux complications que sont l'anémie et l'ictère hémolytique. Après la naissance, l'hémolyse se poursuit pendant la durée de vie des anticorps maternels transmis (3 mois environ).

♦L'anémie hémolytique commence parfois très tôt dans la vie intra-utérine. Chez le fœtus, normalement le taux moyen d'hémoglobine croît de 9 g/dl à 20 semaines d'aménorrhée (SA) jusqu'à 16 g/dl à la naissance.

Au-dessous d'une valeur proche de 7 g/dl au cours du deuxième trimestre de la grossesse et de 9 g/dl au troisième trimestre, apparaît un accroissement du débit cardiaque qui s'accompagne d'anomalies du rythme cardiaque fœtal. Si l'anémie n'est pas corrigée, la diminution de la pression oncotique plasmatique entraîne une fuite d'eau du secteur vasculaire vers le secteur interstitiel. Apparaissent alors des épanchements liquidiens au niveau des séreuses (péricarde en premier lieu, puis péritoine et éventuellement plèvre) et ensuite des œdèmes tissulaires. Un tableau d'anasarque fœto-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 (transfusion de sang au fœtus (TIU) voire véritable exsanguino-transfusion fœtale= EST), l'évolution inéluctable est la Mort Fœtale In-Utéro (MFIU) [1,2].

♦L'hémolyse conduit à une production accrue de bilirubine (hyperbilirubinémie) qui est épurée par l'organisme de la mère. A la naissance, l'hyperbilirubinémie s'accroît car les capacités de glycoconjugaison hépatique du nouveau-né sont limitées et l'ictère apparaît. 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 un ictère nucléaire ou une encéphalopathie hyperbilirubinémique, par action toxique sur les noyaux gris centraux, pouvant provoquer le décès ou des séquelles psychomotrices graves [1,2,3,11]. Ce risque est augmenté par la prématurité, le faible poids de naissance, une infection...

Le traitement de recours est l'EST néonatale mais depuis l'apparition de la photothérapie intensive, l'utilisation de cette technique est devenue exceptionnelle. Le choix de la thérapeutique de l'ictère est fonction de la bilirubinémie et est résumé sur le diagramme suivant [15] :



Ces complications fœtales rendent compte de l'importance du dépistage de l'allo-immunisation et de sa prévention.

4. Le dépistage de l'incompatibilité sanguine foeto-maternelle

Le dépistage des allo-immunisations foeto-maternelles est régit par la loi. Il repose sur la pratique des examens immuno-hématologiques obligatoires chez la femme enceinte qui sont définis par l'arrêté du 19 avril 1985, complété par le décret de février 1992, textes repris dans le guide de bonne exécution des analyses (GBEA) du 26 avril 2002 [2].

4.1. Détermination du statut immunologique de la mère

La détermination des groupes ABO, des phénotypes Rhésus et Kell doit être effectuée chez toutes les primipares et éventuellement les multipares n'ayant pas eu cet examen à la première grossesse. Une seconde détermination ABO, Rhésus D et phénotypes Rh K sera pratiquée en fin de grossesse sur un deuxième prélèvement afin d'établir une carte de groupe sanguin définitive [2,13,14,16].

4.2. Recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) chez toutes les femmes enceintes

Les agglutinines irrégulières sont des immunoglobulines dirigées contre certains antigènes présents à la surface des globules rouges. Ces immunoglobulines sont dites irrégulières car elles ne sont pas présentes chez tous les individus. Elles n'apparaissent dans le sang qu'après une immunisation donc soit après une transfusion sanguine incompatible, soit chez la femme, après une grossesse.

Une RAI doit être demandée dès le premier trimestre de la grossesse (au 2^{ème} mois) chez toutes les femmes [2,13,14,16].

4.2.1. Chez la femme Rhésus négatif

Une information éclairée doit être délivrée sur l'immunisation anti-D (dépistage, suivi, prévention).

Si la femme n'est pas immunisée contre l'antigène D, un contrôle de RAI doit être réalisé au cours du 6^{ème} mois de grossesse (idéalement entre 26 et 28 SA), 8^{ème} et 9^{ème} mois [2,13,14,16].

Il est recommandé de documenter le phénotype RhD du conjoint dès le début de la grossesse. Sa connaissance permet d'envisager une éventuelle abstention d'immunoprophylaxie anténatale. En effet, si le conjoint est Rhésus négatif et la paternité certaine, la prophylaxie anti-D n'est pas nécessaire. Une décision d'abstention s'appuie d'une part sur la présentation d'un document de laboratoire valide du conjoint et d'autre part sur un entretien singulier entre la patiente et le professionnel chargé du suivi de la grossesse, abordant la certitude de la paternité. Cet entretien doit être retranscrit dans le dossier [17].

Si le conjoint est Rhésus positif ou inconnu, la prophylaxie anti-D doit être proposée.

Avant toute décision d'administrer des immunoglobulines anti-D, on s'assurera de l'absence d'immunisation anti-D par une RAI de moins d'une semaine. En effet si la femme a déjà développé une immunisation anti-D, l'injection d'immunoglobulines n'est pas indiquée car sans influence sur le cours d'une immunisation déjà constituée. Dans les situations d'urgence, le résultat ne doit pas être attendu pour réaliser l'injection [13].

L'efficacité du traitement prophylactique peut être jugée seulement plusieurs mois après l'accouchement. En effet, le délai de constitution d'une immunisation anti-D est parfois très long et le respect de ce délai permet d'éliminer l'interférence des anti-D passifs. Un délai de 6 mois est suffisant pour cette nouvelle RAI. Elle sera proposée en priorité aux patientes chez lesquelles une hémorragie foëto-maternelle avait été décelée. Ce délai peut être ramené à 1 à 2 mois si à l'accouchement, on est face à une découverte d'une immunisation anti-D probable ou certaine, de constitution récente.

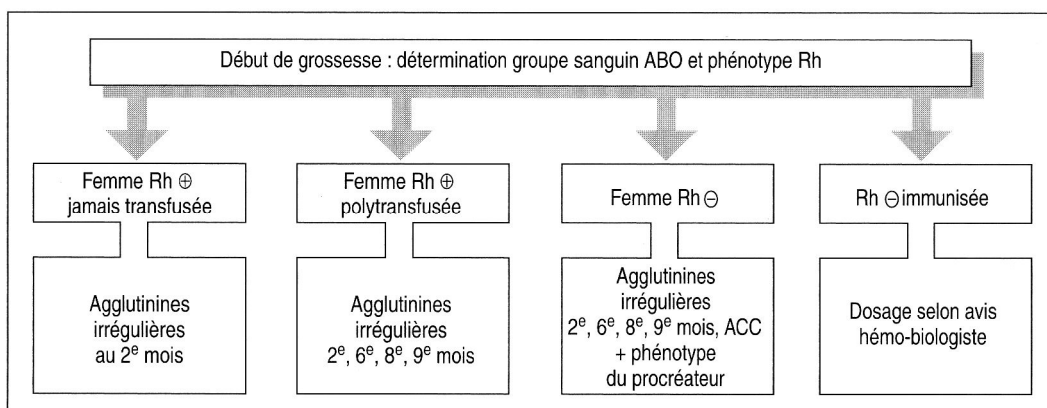
4.2.2. Chez la femme Rhésus positif

La Recherche d'Agglutinines Irrégulières ne s'effectue qu'une fois au 2^{ème} mois de la grossesse. Cependant, si la patiente a bénéficié antérieurement d'une transfusion, la surveillance doit être, chez elle, identique à celle des patientes Rhésus négatif du fait des possibles immunisations avec d'autres antigènes du système Rhésus [14].

De nombreux centres hospitaliers maintiennent toutefois la RAI du 9^{ème} mois et le plus près possible du terme en cas de besoin transfusionnel. En effet, la plupart ont comme stratégie de réaliser une RAI avant toute césarienne urgente ou programmée.

4.2.3. Chez la femme immunisée

Chez la femme immunisée, une programmation particulière des examens est nécessaire. Les dosages doivent être effectués à intervalles rapprochés en fonction du type d'anticorps, de leur concentration, du terme de la grossesse. Ce rythme sera fixé par les hémobiologistes [2]



Dépistage de l'Allo-immunisation fœto-maternelle [2]

4.3. Le test de Kleihauer

Le test de Kleihauer (TK) est un test cytochimique sur frottis permettant la quantification de l'HFM. Il permet de mettre en évidence la présence d'hématies fœtales parmi des hématies adultes maternelles.

Ce test est basé sur la résistance de l'hémoglobine fœtale (Hb F) à une solution acide. L'hémoglobine adulte (Hb A), moins résistante, est éluée des hématies adultes dont il ne reste que des stromas vides à la lecture au microscope, alors que les hématies fœtales restent colorées.

Le taux des hématies fœtales (qui contiennent de l'hémoglobine F) par rapport aux hématies adultes maternelles (qui contiennent de l'hémoglobine A) permet d'estimer le volume de sang fœtal présent dans la circulation maternelle. Ce taux est donné en nombre d'hématies fœtales pour 10 000 hématies adultes (HF/10 000 HA).

La quantité d'immunoglobulines injectée sera fonction du volume d'hémorragie fœto-maternelle estimé au TK **[annexe1, tableau2]**.

La quantification des hématies fœtales peut également être obtenue par immunocytométrie (cytométrie de flux, test immuno-or-argent...). La sensibilité des ces deux techniques est excellente mais la non détection d'hématies fœtales à un des deux tests ne signifie pas qu'elles soient totalement absentes.

Cette estimation permet aussi d'identifier la cause d'une anémie fœtale, ou d'apprécier la participation fœtale à une hémorragie utérine pendant une grossesse (en cas de placenta prævia par exemple) **[17]**.

5. La prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle en France : de ses débuts aux recommandations actuelles

5.1. Le principe de la prévention de l'incompatibilité

Rhésus anti-D

Le principe est d'injecter à une femme Rhésus négatif, jusqu'ici dépourvue d'anticorps anti-D, des gammaglobulines anti-D d'origine humaine (Ig Rh), chaque fois qu'elle risque d'avoir été en contact avec des globules rouges Rhésus positifs. Ceux-ci vont alors être détruits avant l'apparition des anticorps d'allo-immunisation. On injecte les gammaglobulines par voie intramusculaire ou intraveineuse. On admet qu'une ampoule de 100 µg neutralise 5 cc de sang foetal. La quantité de sang foetal qui a pu passer est évaluée par le test de Kleihauer. L'efficacité de la prévention est contrôlée par la disparition des hématies foetales du sang maternel 24 heures après injection d'Ig Rh [1].

Aujourd'hui, la seule immunoglobuline anti-D disponible sur notre territoire est le Rhophylac®. Il dispose d'une autorisation de mise sur le marché depuis le 15 juin 2004. Ce produit, classé sur la liste I par la pharmacologie, existe en deux conditionnements : Rhophylac® 200 µg solution injectable avec seringue pré-remplie 2 ml et Rhophylac® 300 µg solution injectable pré-remplie 2 ml. Ce médicament est un produit d'origine sanguine humaine, fabriqué par le Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB) en plusieurs étapes, à partir de plasma humain provenant de donneurs et donneuses hyperimmunisés (rémunérés) provenant d'Amérique du Nord [18].

L'utilisation d'un produit d'origine humaine rend nécessaire une information préalable (Document d'information pour les femmes enceintes [11]) ainsi qu'une traçabilité.

5.2. Les débuts de la prophylaxie de l'allo-immunisation foëto-maternelle anti-D

Avant 1945, il n'existait aucune mesure efficace pour prévenir la Maladie Hémolytique du Nouveau-Né (MHNN). En cas de maladie Rhésus, la moitié des enfants mouraient.

Le principe qui consiste à injecter des anticorps pour prévenir une immunisation par un antigène spécifique était connu trente ans avant l'introduction de la prévention de l'allo-immunisation Rhésus. L'évaluation de cette méthode a en effet débuté au début des années 1960. Des volontaires Rhésus négatifs ayant reçu préalablement des immunoglobulines anti-D n'ont pas développé d'immunisation lors de transfusion de sang Rhésus positif [19].

En 1961, Stern démontre que l'injection d'immunoglobulines anti-D prévient l'allo-immunisation RhD [20].

En 1968, a débuté l'administration systématique d'anti-D chez les patientes Rhésus négatif, à la naissance d'un enfant Rhésus positif ou dans les 72 h suivantes.

5.3. Une prévention ciblée de l'allo-immunisation foëto-maternelle en France à partir de 1970

En France, c'est en 1970 qu'on commence à administrer des immunoglobulines anti-D, en cas de passage potentiel d'hématies foëtales à travers le placenta. La prophylaxie ciblée concerne d'abord le post-partum, où elle doit être réalisée chez les mamans Rhésus D négatif dont le nouveau-né est de Rhésus D positif. Cette mise en application de la prophylaxie de l'allo-immunisation foëto-maternelle anti-D dans le post-partum a contribué à faire baisser considérablement l'incidence et la mortalité périnatale liée à cette affection. La prophylaxie a ensuite été étendue aux avortements (spontanés ou volontaires) puis aux situations anténatales à risque d'hémorragie foëto-maternelle [annexe1, tableau 1] [21].

Jusqu'en Février 2006, la prévention ciblée reposait sur une attitude consensuelle et était réalisée (ou non) sous la responsabilité de chaque professionnel (en l'absence de référentiel type RPC ou Recommandations pour la Pratique Clinique). Néanmoins cette pratique s'est suffisamment généralisée pour permettre une réduction par un facteur 6 à 10 des allo-immunisations anti-D (d'environ 6 à 10 pour mille à environ 1 pour mille naissances vivantes) en 30 ans, toutes gravités confondues [13].

Malgré cette prévention ciblée, il persiste néanmoins une allo-immunisation résiduelle.

Il n'existe pas en France de registre national exhaustif des allo-immunisation anti-D. Cependant, selon le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF), les incompatibilités RhD résiduelles concerneraient 730 à 750 femmes par an en France [13].

Plusieurs facteurs peuvent rendre compte des immunisations résiduelles observées malgré cette politique de prévention : les mauvaises mises en œuvres de la prophylaxie et les échecs d'une prophylaxie bien conduite.

♦ Dans près de 2/3 des cas d'immunisations résiduelles, on retrouve une erreur dans la mise en œuvre de la prophylaxie. Il peut s'agir soit :

- d'une administration trop tardive des immunoglobulines au-delà de la 72^{ème} heure,
- soit d'un oubli,
- soit enfin d'une administration quantitativement inadaptée : mauvaise adaptation des posologies, absence de réinjection à temps en cas de répétition de situations à risque.

Une injection plus tardive, au-delà de 72 heures, semble cependant conserver une certaine efficacité, certes moindre et non clairement évaluée. Il peut donc être utile d'administrer des immunoglobulines même chez les patientes consultant tardivement, jusqu'à 14, voire 28 jours après la situation potentiellement immunisante [21].

♦ Dans 1/3 des cas, on retrouve également des immunisations résiduelles malgré une prévention bien conduite. Ces échecs de préventions seraient liés à des allo-immunisations anti-D spontanées et sans facteur de risque identifiable qui échapperaient 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 deuxième trimestre, 45% au troisième trimestre [13].

5.4. Une prévention systématique et ciblée de l'allo-immunisation fœto-maternelle en France depuis 2006

Initialement testée au Canada il y a quarante ans, l'immunoprophylaxie Rhésus anténatale systématique du 3^{ème} trimestre de grossesse (PARAD : Prévention Anténatale de Routine par Anti-D) est venue progressivement compléter dans de nombreux pays les indications traditionnelles ciblées d'immunoprophylaxie Rh [22].

En France, c'est en 2006 que s'est dégagé un consensus, à l'initiative du CNGOF et du CNRHP (Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale), pour recommander l'administration de principe, à 28 SA, d'une dose de 300µg d'immunoglobulines IgG anti-D chez toutes les patientes Rhésus négatif en complément de la prophylaxie ciblée.

Chilcott et al ont réalisé en 2002, sous l'égide du *National Institute for Health and Clinical Excellence* (NICE), une revue exhaustive de la littérature portant sur 601 publications traitant de la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D. L'objectif de cette revue systématique était d'évaluer l'efficacité clinique de la prophylaxie anténatale systématique chez les femmes Rhésus négatif non immunisées, en comparaison avec l'absence de prophylaxie anténatale systématique (prévention ciblée seule). Malgré de nombreux biais, les auteurs de la méta-analyse concluent finalement que la prophylaxie systématique anténatale fait passer le risque d'allo-immunisation

foeto-maternelle anti-RhD de 1,5 à 0,2% (soit un risque divisé par 7,5) pour les doses utilisées de 100 µg d'immunoglobulines anti-RhD [4,21].

5.4.1. Deux schémas thérapeutiques

Deux types de protocoles sont utilisés dans le monde. Le premier repose sur deux injections successives de 100 µg au cours du troisième trimestre : une à 28 SA et l'autre à 34 SA (Royaume Uni).

Le second s'appuie sur une seule injection de 300 µg à 28 SA (Etats-Unis, Canada, Allemagne) ou 200 µg à 30 SA (Pays-Bas).

Le premier protocole avait été validé en France. Cependant, pour l'heure en France, seul le second protocole est possible dans la mesure où le prescripteur ne dispose plus depuis mai 2005 que d'une présentation à 300 µg avec AMM pour cette indication [17].

5.4.2. Les recommandations pour la pratique clinique

En 2006, le CNGOF recommande de proposer à toute femme enceinte Rhésus négatif, non immunisée contre l'antigène D et dont le fœtus est connu ou présumé RhD positif, une injection d'immunoglobulines anti-D de 300 µg par voie intramusculaire ou intraveineuse à 28 SA (+/- 1 semaine). La voie intramusculaire est cependant contre-indiquée en cas de thrombopénie ou de troubles de l'hémostase. **Cette prévention anténatale systématique n'exclut bien sûr pas une prévention ciblée supplémentaire en cas de situation à risque.**

Après cette injection de 300 µg d'anti-D, il n'est pas nécessaire de répéter, par la suite, les RAI en vue de dépister une immunisation anti-D et ce, jusqu'à l'accouchement.

Cependant, si la patiente n'a pas reçu d'injection de 300 µg d'anti-D à 28 SA, les RAI du 8^{ème} et 9^{ème} mois doivent être maintenues et la prophylaxie ciblée reste identique à celle du second trimestre [16].

S'il existe un risque de passage important d'hématies fœtales dans la circulation maternelle dans les 12 semaines suivant l'injection, un test de

Kleihauer est réalisé. Si ce test est négatif, il est possible de se passer d'une injection complémentaire.

A l'accouchement, un prélèvement de sang au cordon peut être réalisé pour connaître le Rhésus de l'enfant. Si celui-ci est Rhésus positif, un test de Kleihauer est effectué au minimum 30 minutes après la délivrance et une nouvelle injection de Rhophylac® est faite, la quantité injectée étant fonction du volume d'hémorragie fœto-maternelle estimée **[23] [annexe1, tableau2]**.

Lors de toute injection d'immunoglobulines, le nom du produit et le numéro de lot doivent être notés dans le dossier patient et remis à la patiente afin de conserver une traçabilité précise du produit injecté (*texte de la Circulaire du 9 avril 1998*).

L'efficacité de la prévention est essentiellement mesurée par le taux d'immunisation maternelle, quelle que soit la gravité des conséquences fœtales. Peu de données sont disponibles sur le devenir neurocomportemental des enfants et sur le bénéfice périnatal réel de la prévention systématique, qui est pourtant l'objectif principal recherché. On peut cependant estimer que la réduction de la prévalence des femmes immunisées lors des grossesses suivantes s'accompagnera d'une réduction de l'incidence des allo-immunisations fœto-maternelles sévères.

L'efficacité n'est pas le seul critère à considérer pour déterminer une stratégie de prévention. Le taux d'adhésion à la stratégie, le coût, les risques biologiques d'une administration à large échelle d'un produit dérivé sanguin, les possibilités d'approvisionnement en immunoglobulines ainsi que les modifications des pratiques de surveillance des femmes Rhésus négatif, doivent également être pris en compte.

5.4.3. Les risques biologiques

Les effets indésirables comportent de très rares réactions allergiques et d'hypersensibilité (prurit, urticaire, dyspnée, hypotension...).

Quant au risque viral lié à l'utilisation des immunoglobulines, il est faible du fait des traitements appliqués pour éliminer les virus **[13]**.

En effet, les Recommandations pour la Pratique Clinique (RPC) insistent sur l'importance de la sécurité biologique par rapport aux virus. Cette sécurité est liée à la sélection des donneurs, l'inactivation virale par solvant-détergent et la nano filtration.

Si la composition et la fabrication de produits de type Rhophylac® sont très réglementées et tracées, **il n'est cependant pas impossible que d'autres virus ou prions inconnus à ce jour puissent être injectés à la population. C'est pourquoi les RPC indiquent que l'exposition inutile à des produits dérivés du sang doit être évitée autant que possible.**

Par ailleurs, les laboratoires utilisent d'autres produits en association, et notamment des conservateurs. Ainsi, le thimérosal a longtemps été utilisé comme conservateur. Ce produit contenant du mercure, est incriminé, notamment dans l'augmentation du risque d'autisme.

Avec le Rhophylac®, ne sont pas injectés que des anti-D. On y retrouve par exemple 30 mg/ml de protéines humaines. D'autres immunoglobulines sont également retrouvées comme des anti-C et des anti-E.

Il est raisonnablement possible d'imaginer que des pathologies non infectieuses puissent être transmises par l'intermédiaire d'une injection d'immunoglobulines. Ce qui pourrait être valable pour l'autisme peut également l'être pour d'autres maladies dont les causes ne sont pas connues à ce jour [23].

5.4.4. Coût financier de la prévention systématique

La prévention de l'allo-immunisation anti-D chez la femme enceinte RhD négatif semble avoir quasiment fait disparaître les formes graves d'incompatibilité foëto-maternelle. Néanmoins, si pour le clinicien- et à plus forte raison le patient- une vie sauvée n'a pas de prix, pour l'économiste de santé, toute politique de prévention a un coût financier qu'il faut évaluer.

L'analyse économique s'intéresse à plusieurs formes de coût :

- les coûts directs c'est-à-dire les traitements (Ici le Rhophylac®) ;
- les coûts indirects (le coût du suivi des grossesses immunisées).

Il existe plusieurs types d'évaluation en économie de la santé.

♦L'analyse coût/efficacité est la plus utilisée. Elle compare des médicaments ou des interventions ayant des résultats standardisés (année de vie gagnée...). Les résultats sont classiquement présentés sous forme de ratio (coût par vie sauvée).

♦L'analyse coût/utilité 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 année gagnée ajustée par la qualité de vie (quality adjusted life-years ou QALY). Les bénéfices mesurés évaluent à la fois le nombre d'années de vie gagnée et la qualité de cette vie. L'utilisation des QALY est souvent contestée. Quand on utilise les résultats d'une étude sur deux traitements A et B, le choix thérapeutique est simple si A est à la fois plus efficace et moins coûteux. En revanche si A est plus efficace mais plus coûteux, il faut bien évaluer l'importance des bénéfices obtenus par rapport à l'excès de dépense engendré. On doit donc décider si les bénéfices valent bien les frais nécessaires. Il est difficile de fixer un seuil au-delà duquel le coût par QALY devient excessif bien que certains économistes considèrent que la limite pourrait être de l'ordre de 50 000€.

♦L'analyse coût/bénéfice tente d'évaluer toutes les conséquences d'une intervention ainsi que les prix encourus. Si les bénéfices sont supérieurs aux coûts, l'intervention est acceptable. 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 d'application difficile.

Les choix de santé publique sont donc difficiles et bien que les méthodes d'évaluation économique soient limitées, elles permettent d'avoir une vision plus claire de l'impact des décisions de santé.

Aucune étude économique de la prévention Rhésus n'a été menée en France. Cependant de nombreux articles sur ce sujet ont été publiés dans la littérature internationale. En 2006, à l'occasion des recommandations pour la pratique clinique (RPC), l'analyse de neuf études internationales a été présentée.

Parmi elles, l'étude de Chilcott et al. [24] 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 Rhésus négatif avec un prix par dose de Rhophylac® 300 µg de 85,16€ et un prix de l'injection par une 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 la transposition de cette étude anglaise à notre système français comporte de nombreux écueils du fait des coûts de santé différents.

Une révision du modèle de Chilcott et al. a été publiée en février 2009 par Pilgrim et al. [25] avec intégration de nouveaux paramètres économiques et l'extension de l'analyse à un éventail élargi de protocoles de PARAD (Prévention Anténatale de Routine par Anti-D), en particulier le protocole utilisant Rhophylac® 300 en injection unique à 28 SA (tel que pratiqué aujourd'hui en France). Il ressort de ce travail que si le rapport coût/bénéfice de la PARAD appliquée aux primipares RhD négatif est plutôt favorable, il est nettement moins avantageux chez les femmes multipares. Ceci tiendrait au fait que le **risque de survenu d'une primo-immunisation anti-D pourrait être plus faible chez la femme multipare ayant déjà bénéficié d'une PARAD lors de sa première grossesse.** Ce point mériterait cependant d'être étayé par d'autres études, de même que devrait être vérifiée la constatation d'une **sévérité clinique atténuée des immunisations anti-D chez la multipare ayant déjà bénéficié d'une PARAD lors de sa première grossesse.**

Pour l'instant, cette réactualisation économique de la PARAD ne conduit pas à la récuser chez la multipare qui est toujours éligible à ce traitement [22].

Mais sachant qu'environ 40% des femmes Rhésus négatif sont enceintes d'enfants Rhésus négatif, **le nombre d'injections d'immunoglobulines pourrait être diminué d'autant si la détermination du groupe du fœtus était connue avec certitude. Ceci permettrait donc de cibler au plus juste la prévention sans diminuer son efficacité.**

Or actuellement, la détermination du génotype *RhD* fœtal est possible à partir d'un simple prélèvement sanguin maternel. La technique repose sur l'amplification par *polymerase-chain-reaction* (PCR) du gène *RhD* contenu dans l'ADN fœtal circulant présent dans le plasma/sérum maternel.

L'intérêt de cette nouvelle technique mérite d'être évalué. Différentes études sont déjà parues sur le sujet, nous nous proposons maintenant d'en faire la présentation, avant de passer à une analyse comparative et critique.

PARTIE 2 :
PRÉSENTATION DES ÉTUDES ET DE
LEURS RÉSULTATS



1. Méthodologie de recherche

1.1. Le choix du thème

Ce travail m'a permis de rassembler des informations sur le génotypage fœtal Rhésus sur sang maternel. J'étais très désireuse d'approcher cette nouvelle technique, de la faire connaître et d'étudier ses chances de réussite.

La question est d'actualité. Elle pose débat et méritait donc d'être analysée. En effet, son adoption pourrait entraîner un changement radical dans les pratiques à venir.

Il m'intéressait également d'étudier les conditions qui permettent de passer d'une innovation technique à une pratique généralisée.

1.2. Les objectifs de l'étude

Mes objectifs sont :

- de démontrer en quoi l'application de la technique de génotypage fœtal sur sang maternel constituerait un progrès dans la prise en charge obstétricale des patientes Rhésus négatif,
- d'étudier les conditions de sa mise en application et de sa généralisation,
- d'évaluer si une confrontation coût/bénéfice serait favorable à l'adoption de cette technique.

1.3. Les hypothèses de recherche

Je pars des présupposés suivants :

- le génotypage fœtal Rhésus sur sang maternel représente une technique innovante et fiable, un progrès,
- les expérimentations actuelles permettent d'envisager son adoption future dans les pratiques cliniques,
- le frein à sa mise en application relève d'une question économique.

1.4. Description de l'étude

Mon étude est une monographie. Il s'agit d'utiliser différentes études publiées sur la question pour en faire ensuite une lecture critique avant d'en confronter les résultats.

Le choix d'une monographie s'imposait du fait de l'impossibilité de mener moi-même de telles investigations. Ma recherche ne pouvait donc que s'appuyer sur la bibliographie existante.

J'espère ainsi faire un bilan et dégager des conclusions personnelles.

1.4.1. *Durée de l'étude*

Seuls les documents antérieurs au 31 décembre 2009 ont été pris en compte ici.

1.4.2. *Choix des études*

J'ai effectué ma recherche bibliographique dans les bases de données spécialisées suivantes : Pubmed, Mesh, Cismef et BDSP ainsi que sur Google Scholar et Science Direct.

J'ai également contacté :

- différentes institutions réfléchissant à cette question : Institut National des Transfusions Sanguines (INTS), Etablissement français du sang (EFS), Institut de Biotechnologies de Reims, Centre National de Référence en Hémiobiologie Périnatale (CNRHP), Conseil National des Gynécologues et obstétriciens Français (CNGOF)...
- ainsi que des spécialistes ayant publié sur ce thème.

Une étude exhaustive des publications sur le sujet était à l'évidence impossible. En effet, l'étendue des analyses à faire aurait largement excédé les contraintes du mémoire.

J'ai donc dans un premier temps limité mon analyse aux études en libre accès sans aucune restriction linguistique (j'ai cependant exclu une étude en espagnol).

Dans un deuxième temps, j'ai limité mon analyse à une étude par équipe de recherche. En effet, lorsqu'une même équipe avait publié plusieurs études, je n'en ai retenu qu'une : la plus récente et/ou la plus représentative afin de ne pas créer de biais.

2. Présentation des études et de leurs résultats

J'ai donc retenu 8 études (dont 7 en anglais) :

- 1) **L'étude de Lo et al. [26]**, publiée en 1998 et intitulée « *Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma* »
- 2) **L'étude de Costa et al. [27]**, publiée en 2002 et intitulée « *Fetal RhD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy* »
- 3) **L'étude de Hromadnikova et al. [28]**, publiée en 2005 et intitulée : « *Non Invasive fetal RhD and RhCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies* »
- 4) **L'étude de González et al. [29]**, publiée en 2005 et intitulée : « *Application of fetal DNA detection in maternal Plasma: A prenatal diagnosis unit experience* »
- 5) **L'étude de Dif-Couvreux et al. [30]**, publiée en 2006 et intitulée : « *Evaluation de la détermination du statut Rhésus-D fœtal sur plasma maternel par la technique d'hemi-nested PCR* »

- 6) **L'étude de Rouillac et al. [31]**, publiée en 2007 et intitulée: « *Non invasive fetal RhD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD* »

- 7) **L'étude de Finning et al. [32]**, publiée en 2008 et intitulée : « *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* »

- 8) **L'étude de Minon et al. [33]**, publiée en 2008 et intitulée: « *Routine fetal RhD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium* ».

2.1. Étude de Lo et al

L'étude de Lo et al. a été réalisée en 1998 à l'Hôpital John Radcliffe à Oxford (Royaume-Uni).

2.1.1. Matériel et méthodes

♦**Patientes**: 57 prélèvements sanguins veineux issus de patientes caucasiennes RhD négatif, porteuses d'une grossesse unique ont été réalisés.

Parmi ces 57 patientes (dont 10 étaient primipares) :

- 12 patientes étaient au 1^{er} trimestre de grossesse et le prélèvement sanguin a été réalisé à l'occasion d'un bilan sanguin prénatal de routine ;
- 30 patientes étaient au 2^{ème} trimestre de grossesse et le prélèvement sanguin a été effectué avant la réalisation d'une amniocentèse. Lors de cette amniocentèse, 10 ml de liquide amniotique ont été recueillis pour réaliser un génotypage fœtal Rhésus ;
- 15 patientes étaient au 3^{ème} trimestre de grossesse et le prélèvement sanguin a été réalisé avant l'accouchement.

Pour les patientes aux 1^{er} et 3^{ème} trimestres de grossesse, un prélèvement de sang au cordon a été effectué après l'accouchement afin de déterminer le statut Rhésus du nouveau-né par une méthode sérologique.

◆Préparation des prélèvements :

- 10 ml de sang collectés par patiente dans des tubes EDTA,
- Centrifugation à 3000 g,
- Récupération du plasma et conservation à -20°C jusqu'à utilisation.

◆Extraction de l'ADN : l'ADN est extrait de chaque échantillon de plasma (800µL) et de Liquide Amniotique (LA) à l'aide d'un kit QIAamp® (Allemagne) et selon le protocole recommandé par le fabricant.

◆Analyse par PCR : une technique de PCR en temps réel ciblée sur l'exon 10 du gène RhD a été utilisée ici [**annexe2**] à l'aide d'un Perkin-Elmer Sequence Detector® (modèle 7700).

Le gène de la β-globine a servi de témoin pour confirmer la présence et la qualité de l'ADN dans chaque échantillon. Le signal a été positif pour les 57 échantillons de plasma maternel.

Durant chaque cycle, une faible quantité d'ADN isolée à partir de témoins RhD positifs a été utilisée comme contrôle positif. De même, l'ADN isolé de témoins RhD négatifs a été utilisé comme contrôle négatif.

◆Mesures strictes : des strictes précautions ont été utilisées lors de cette technique afin de limiter le risque de contamination et donc de lutter contre les faux positifs. Des filtres ont été utilisés sur les embouts à pipette lors de chaque prélèvement et différentes zones du laboratoire ont été utilisées afin de séparer les différents temps de la technique.

2.1.2. Résultats

Pour une visualisation rapide et globale des résultats de l'étude de Lo et al., j'ai réalisé le tableau suivant.

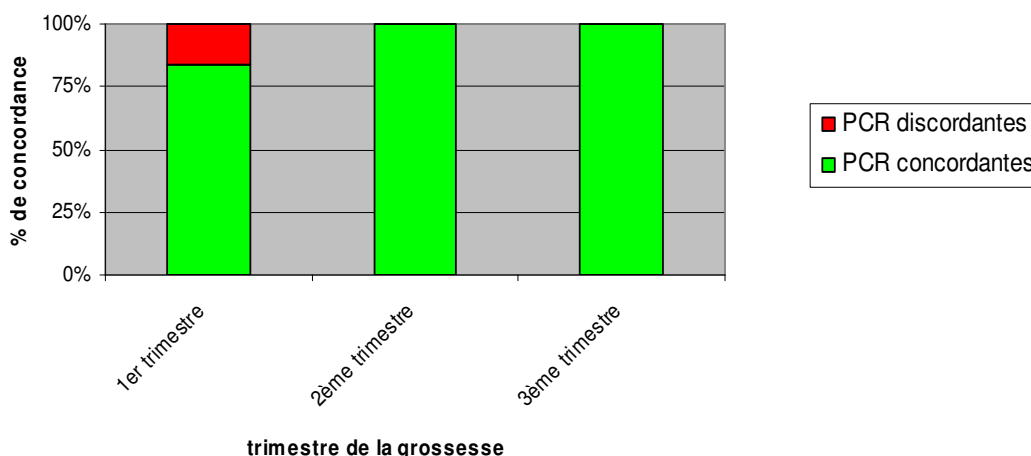
Tableau I : Résultats du génotypage foetal RhD sur sang maternel (Lo et al.) :

Trimestre de grossesse	Nombre de patientes ayant bénéficié d'un prélèvement sanguin	Phénotype Rhésus du nouveau-né (Nv-né)	Génotypage foetal Rhésus sur plasma maternel par PCR en temps réel		% de concordance du génotypage foetal Rhésus avec le phénotype Rhésus des nouveau-nés
			PCR+	PCR -	
1^{er} trimestre	12	Nv-né RhD+ (n=9)	7	2	83.4%
		Nv-né RhD- (n=3)	0	3	
2^{ème} trimestre	30	Nv-né RhD+ (n=22)	22	0	100%
		Nv-né RhD- (n=8)	0	8	
3^{ème} trimestre	15	Nv-né RhD+ (n=8)	8	0	100%
		Nv-né RhD- (n=7)	0	7	
Total	57	Nv-né RhD+ (n=39)	37	2	96.4%
		Nv-né RhD- (n=18)	0	18	

Lo et al. précisent que les deux résultats faux-négatifs ont été observés chez des patientes à 10 et 11 SA.

A partir du tableau ci-dessus, j'ai pu réaliser le graphique suivant :

Pourcentage de concordance, en fonction de l'âge de la grossesse, du génotypage foetal Rhésus avec le phénotype Rhésus des nouveau-nés



2.2. Étude de Costa et al

L'étude de Costa et al. a été réalisée en 2002 au Centre de Diagnostic Prénatal de l'Hôpital Américain de Paris et à l'Hôpital-Maternité Notre-Dame de Bon Secours à Paris (France).

2.2.1. Matériel et méthodes

◆Patientes: 106 prélèvements sanguins veineux issus de patientes caucasiennes RhD négatif, porteuses d'une grossesse unique ont été réalisés au premier trimestre de la grossesse.

L'âge gestationnel moyen était de 12.7 SA.

Les prélèvements sanguins ont été effectués avant la réalisation d'une amniocentèse ou d'un prélèvement de villosités chorales dans le cadre du diagnostic prénatal de maladies génétiques ou d'anomalies chromosomiques.

◆Préparation des prélèvements :

- 5 ml de sang collectés par patiente dans des tubes EDTA,
- Centrifugation à 3000 g pendant 10 min, à 4°C,
- Récupération du plasma et conservation à -30°C,

◆Extraction de l'ADN : l'ADN est extrait de chaque échantillon de plasma (200 µL) et de Liquide Amniotique à l'aide d'un kit de préparation pour PCR (Société Roche Biochemicals, Meylan, France).

◆Analyse par PCR : une technique de PCR duplexe en temps réel ciblée sur l'exon 10 du gène RhD a été utilisée ici [**annexe 2**]. En effet, afin de contrôler l'amplification de l'ADN extrait du sang maternel et du liquide amniotique, le gène RhD et un second gène autosomique de référence (le gène de la superoxyde dismutase ou gène SOD) ont été co-amplifiés dans un LightCycler® (Roche Biochemicals).

Chaque échantillon a été analysé en double.

Durant chaque cycle, une faible quantité d'ADN isolée à partir de témoins RhD positifs a été utilisée comme contrôle positif. De même, le tampon d'élution pour l'extraction de l'ADN a été utilisé comme contrôle négatif.

Chacun des produits de PCR a été détecté simultanément et de façon spécifique.

Un échantillon a été considéré comme RhD positif lorsque le signal fluorescent était détecté à la fois pour le gène RhD et le gène SOD tandis qu'un échantillon a été considéré comme RhD négatif lorsque le signal fluorescent n'était détecté que pour le gène SOD.

2.2.2. Résultats

Les résultats de l'étude de Costa et al. sont reportés dans le tableau suivant.

Tableau II : Résultats du génotypage fœtal RhD sur sang maternel au 1^{er} trimestre (Costa et al.) :

Nombre de patientes ayant bénéficié d'un prélèvement sanguin	Phénotype Rhésus du nouveau-né (Nv-né)	Génotypage fœtal Rhésus sur plasma maternel par PCR duplexe en temps réel		% de concordance du génotypage fœtal Rhésus avec le phénotypage Rhésus des nouveau-nés
		PCR +	PCR -	
106	Nv-né RhD+ (n=62)	62	0	100%
	Nv-né RhD- (n=40)	0	40	100%

Chez 4 patientes, la détermination sérologique du Rhésus du nouveau-né n'a pas pu être effectuée car une Interruption Médicale de Grossesse (IMG) a été réalisée suite à la découverte d'une anomalie chromosomique ou génétique du fœtus.

Cependant, chez ces 4 patientes, la détermination du Rhésus du fœtus sur liquide amniotique concordait avec la détermination du Rhésus du fœtus sur plasma maternel.

2.3. Étude de Hromadnikova et al

L'étude Hromadnikova et al. a été réalisée en 2005 au Centre hospitalier universitaire de Motol à Prague (République Tchèque). L'objectif de cette étude était d'évaluer la faisabilité du génotypage RhD, RhC et RhE par PCR en temps réel de l'ADN extrait d'échantillons plasmatiques de femmes enceintes RhD négatif, homozygotes pour les allèles c et/ou e du gène RhCE.

En effet le locus Rh, localisé sur le chromosome 1, est composé de deux gènes fortement homologues : RhD et RhCE, l'un codant pour l'antigène D et l'autre à la fois pour les polypeptides C/c et E/e.

2.3.1. Matériel et méthodes

◆Patientes: 45 prélèvements sanguins veineux issus de patientes caucasiennes RhD négatif, porteuses d'une grossesse unique ont été réalisés. 41 de ces femmes présentaient un phénotype : ccddEe tandis que 4 autres présentaient un phénotype : Ccddee.

L'âge gestationnel des femmes incluses dans l'étude allait de 12 à 41 SA.

◆Préparation des prélèvements :

- 10 ml de sang collectés par patiente dans des tubes EDTA,
- Centrifugation à 1200 g puis à 3000 g pendant 10 min,
- Récupération du plasma et conservation à -80°C jusqu'à utilisation.

◆Extraction de l'ADN : l'ADN est extrait de chaque échantillon de plasma (400µL) à l'aide d'un kit QIAamp® (Allemagne) et selon le protocole recommandé par le fabricant.

◆Analyse par PCR : une technique de PCR multiplexe en temps réel a été utilisée ici [annexe2] à l'aide d'un ABI PRISM 7700 Sequence Detection System®.

La PCR est ciblée sur les exons 7 et 10 du gène RhD et sur les exons 2 et 5 du gène RhCE.

Le gène de la β -globine a servi de témoin pour confirmer la présence et la qualité de l'ADN dans chaque échantillon.

Durant chaque cycle, des échantillons de sang provenant de donneurs caucasiens avec phénotype D-négatif (ccddee, Ccddee, ccddEe) et D-positif (CCDee, ccDEE, ccDee) ont été utilisés pour établir et valider l'efficacité du test.

2.3.2. Résultats

Le génotypage fœtal RhD, RhC et RhE a été réalisé sur les 45 échantillons de plasma des femmes incluses dans l'étude. Les résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenus après analyse sérologique sur sang au cordon. Seuls les résultats du génotypage fœtal RhD sont transcrits dans le tableau suivant.

Tableau III : Résultats du génotypage fœtal RhD sur sang maternel (Hromadnikova et al).

Nombre de patientes ayant bénéficié d'un prélèvement sanguin	Phénotype Rhésus du nouveau-né (Nv-né)	Génotypage fœtal Rhésus sur plasma maternel par PCR en temps réel		% de concordance du génotypage fœtal Rhésus avec le phénotypage Rhésus des nouveau-nés
		PCR +	PCR -	
45	Nv-né RhD+ (n=24)	24	0	100%
	Nv-né RhD- (n=21)	0	21	100%

De même les résultats du génotypage RhC et RhE sont en concordance parfaite avec les résultats de l'analyse sérologique sur sang au cordon.

En parallèle, Hromadnikova et al. ont réalisé l'analyse par PCR en temps réel du gène SRY (Sex-determining Region of Y chromosome). Les résultats se sont montrés en concordance parfaite avec le sexe du fœtus.

2.4. Étude de González et al

L'étude de González et al. a été réalisée en 2005 à l'Hôpital Fundación Jiménez Díaz à Madrid (Espagne).

2.4.1. Matériel et méthodes

◆Patientes :

- Dans une 1^{ère} étude, 13 prélèvements sanguins veineux ont été réalisés chez une femme enceinte caucasienne RhD négatif, porteuse d'une grossesse unique, de la 10^{ème} semaine d'aménorrhée jusqu'à 24 heures après l'accouchement. Cette étude avait uniquement pour objectif d'étudier le comportement de l'ADN fœtal pendant la grossesse.
- Dans une 2^{ème} étude, 20 prélèvements sanguins veineux issus de patientes caucasiennes RhD négatif, porteuses d'une grossesse unique ont été réalisés. L'âge gestationnel des femmes incluses dans l'étude allait de 13 à 18 SA. Tous les échantillons ont été prélevés (10 ml par patiente dans des tubes EDTA) avant la réalisation d'une amniocentèse ou d'un prélèvement de villosités chorales (PVC).

◆Extraction de l'ADN : l'ADN est extrait de 0.8 à 2 ml de chaque échantillon de plasma à l'aide d'un kit QIAamp® (Allemagne) et selon le protocole recommandé par le fabricant. L'ADN a également été extrait des échantillons de liquide amniotique et de villosités chorales pour confirmer ou infirmer les résultats.

◆Analyse par PCR : une technique de PCR quantitative en temps réel ciblée sur l'exon 7 du gène RhD a été utilisée ici [**annexe2**] à l'aide d'un ABI PRISM 310 Genetic Analyzer® utilisant le logiciel d'analyse Genescan.

Le gène de la β -globine a servi de témoin pour confirmer la présence et la qualité de l'ADN dans chaque échantillon.

◆Mesures strictes : de strictes précautions ont été utilisées lors des différentes procédures afin de limiter le risque de contamination et donc de lutter contre les faux positifs. Des filtres ont été utilisés sur les embouts à pipette lors de chaque prélèvement et différentes zones du laboratoire ont été utilisées afin de séparer les différents temps de la technique.

2.4.2. Résultats

● Les résultats de la détection de l'ADN foetal sur les 13 échantillons de plasma de la femme de la première étude sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau IV : comportement de l'ADN foetal au cours de la grossesse (González et al.) :

Age gestationnel en SA	Présence ou absence d'ADN foetal
10	absence
12	présence
15	absence
18	présence
20	présence
22	présence
24	présence
26	présence
29	absence / présence
34 SA+ 4 jours	présence
37 SA + 1 jours	présence
24 heures après l'accouchement	absence

Dans 2 des 13 échantillons, González et al. n'ont pas été en mesure de détecter l'ADN du foetus. Une deuxième analyse a été effectuée mais la présence d'ADN foetal n'a été détectée que pour l'échantillon de la 29^{ème} semaine.

•Le génotypage fœtal RhD a été réalisé sur les 20 échantillons de plasma des femmes incluses dans la 2^{ème} étude de González et al. Les résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenu après analyse du liquide amniotique ou des villosités choriales.

Tableau V : Résultats du génotypage fœtal RhD sur sang maternel (González et al.) :

Échantillon n°	Age gestationnel en SA	Technique invasive de génotypage fœtal	Résultats de la technique invasive	Résultats du génotypage fœtal RhD sur sang maternel
1	13	PVC	RhD négatif	RhD négatif
2	13 SA + 6 jours	PVC	RhD négatif	RhD négatif
3	13	PVC	RhD positif	RhD positif
4	17	Amniocentèse	RhD positif	RhD positif
5	17	Amniocentèse	RhD négatif	RhD négatif
6	17	Amniocentèse	RhD positif	RhD positif
7	17	Amniocentèse	RhD positif	RhD positif
8	17	Amniocentèse	RhD positif	RhD positif
9	17	Amniocentèse	RhD positif	RhD positif
10	18	Amniocentèse	RhD négatif	RhD négatif
11	17	Amniocentèse	RhD positif	RhD négatif
12	17	Amniocentèse	RhD négatif	RhD négatif
13	17	Amniocentèse	RhD positif	RhD positif
14	17	Amniocentèse	RhD positif	RhD positif
15	18	Amniocentèse	RhD négatif	RhD négatif
16	17	Amniocentèse	RhD positif	RhD négatif
17	17	Amniocentèse	RhD positif	RhD positif
18	17	Amniocentèse	RhD positif	RhD positif
19	17	Amniocentèse	RhD positif	RhD positif
20	17	Amniocentèse	RhD positif	RhD positif

2.5. Étude de Dif-Couvreux et al

L'étude de Dif-Couvreux et al. a été réalisée en 2006 dans le service de diagnostic anténatal de l'Hôpital Jeanne-de-Flandre à Lille (France). L'objectif de cette étude était d'évaluer la faisabilité de la détermination du statut RhD fœtal sur plasma maternel par la technique d'hemi-nested PCR classique.

2.5.1. Matériel et méthodes

◆Patientes: 99 prélèvements sanguins veineux issus de patientes caucasiennes RhD négatives, porteuses d'une grossesse unique ont été réalisés soit avant la réalisation d'une amniocentèse (n=30), soit dans le cadre d'une consultation prénatale (n=69).

Lors d'une amniocentèse, 4 ml de liquide amniotique ont été recueillis pour réaliser un génotypage fœtal Rhésus.

Parmi ces 99 patientes :

- 47 patientes étaient au 2^{ème} trimestre de grossesse (15 à 25 SA) ;
- 52 patientes étaient au 3^{ème} trimestre de grossesse (26 à 40 SA).

◆Témoins : des échantillons de plasma de donneurs RhD négatif et RhD positif ont été collectés pour servir de témoins négatifs et positifs.

◆Préparation des prélèvements :

- 20 ml de sang collectés par patiente dans des tubes EDTA,
- Centrifugation à 2950 g pendant 20 min,
- Récupération du plasma et conservation à -20°C jusqu'à utilisation.

◆Extraction de l'ADN : l'ADN est extrait de chaque échantillon de plasma (400µL) à l'aide d'un kit QIAamp® (Allemagne) et selon le protocole recommandé par le fabricant. La technique a été réalisée en parallèle par 2 opérateurs différents.

♦Analyse par PCR : une technique de PCR hemi-nested classique a été utilisée ici [annexe 2] à l'aide d'un classique cycler PTC 200®.

Une première PCR a amplifié simultanément deux séquences : la première spécifique à la fois des gènes RhCE et RhD située sur le chromosome 1 (exon 4), et la seconde séquence, exclusivement spécifique du gène RhD sur l'exon 10. Les produits d'amplifications ont été respectivement de 110 paires de bases et de 291 paires de bases.

Une seconde PCR, caractérisant l'hemi-nested, a amplifié le produit d'amplification à 291 paires de bases obtenu de la première PCR pour donner un produit d'amplification final à 262 paires de bases.

Pour chacune des deux PCR, le programme suivant a été utilisé : dénaturation initiale 5 min à 94°C, dénaturation 20 sec à 94°C, hybridation 20 sec à 58°C, élongation 30 sec à 72°C, élongation finale 10 min à 72°C, stockage à +4°C.

35 cycles ont été réalisés à chaque PCR et les produits d'amplification ont été relevés après migration sur gel d'agarose et lecture sous lampe UV.

♦Mesures strictes : des strictes précautions ont été utilisées afin de limiter le risque de contamination et donc de lutter contre les faux positifs. Des filtres ont été utilisés sur les embouts à pipette lors de chaque prélèvement et différentes zones du laboratoire ont été utilisées afin de séparer les différents temps de la technique.

2.5.2. Résultats

Les résultats du génotypage foetal sur sang maternel ont été comparés au phénotype de l'enfant à la naissance (obtenu après prélèvement sanguin) ou au génotypage foetal réalisé sur liquide amniotique. Les résultats ont été rendus si retrouvés identiques par les 2 opérateurs. En cas de discordance entre les 2 opérateurs, une nouvelle détermination a été réalisée sur le même échantillon maternel et le résultat a été validé si concordant.

15 des 99 plasmas maternels analysés ont été retrouvés discordants entre les 2 opérateurs. Dif-Couvreux et al. ont étudié la relation entre la présence de résultats discordants entre les deux opérateurs et l'âge

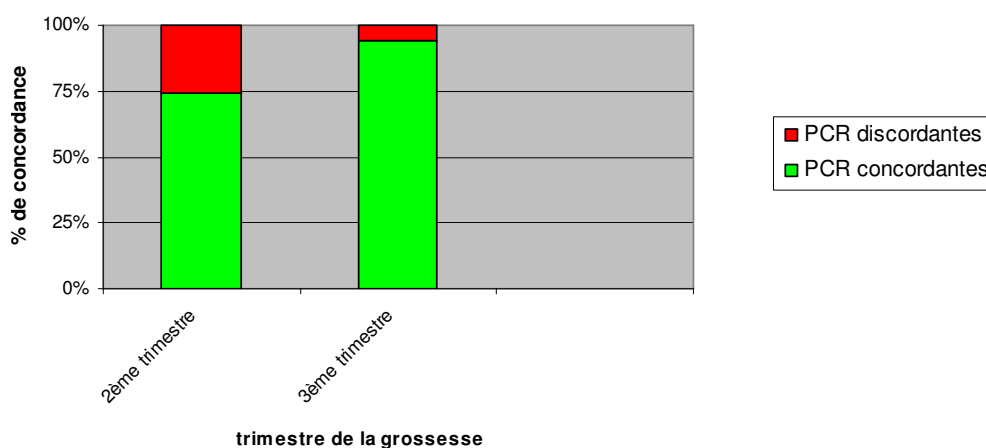
gestationnel au cours duquel a été réalisé le prélèvement sanguin maternel. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant.

Tableau VI : Résultats discordants entre les 2 opérateurs en fonction de l'âge gestationnel lors du prélèvement maternel (Dif-Couvreux et al.) :

Trimestre de grossesse	PCR concordantes	PCR discordantes	Taux de discordance	Taux de concordance
2 ^{ème} trimestre	35	12	25.5 %	74.5%
3 ^{ème} trimestre	49	3	5.8 %	94.2 %

A partir du tableau précédent, j'ai pu réaliser le graphique suivant :

Pourcentage de discordance, en fonction de l'âge de la grossesse lors du prélèvement maternel



Une seconde détermination a donc été réalisée sur ces 15 prélèvements discordants et le résultat final est présenté dans ce tableau.

Tableau VII : Résultats du génotypage foetal RhD sur sang maternel après 2 déterminations (Dif-Couvreux et al.) :

Nombre de patientes ayant bénéficié d'un prélèvement sanguin	Phénotype Rhésus du nouveau-né (Nv-né)	Génotypage foetal Rhésus sur plasma maternel par PCR classique	
		PCR +	PCR -
99	Nv-né RhD+ (n=68)	68	0
	Nv-né RhD- (n=30)	4	26

Aucune conclusion n'a pu être possible pour une patiente prélevée à 18 SA malgré deux déterminations réalisées en parallèle par les deux opérateurs.

Dif-Couvreux et al. se sont alors intéressés à la relation entre les résultats faussement positifs et les statuts RhD foetal d'une part et les phénotypes maternels d'autres parts. Dans trois cas, les phénotypes maternels et ceux des nouveau-nés ont été retrouvés ddccee. Dans un cas, un phénotype spécial a été retrouvé à la fois chez la mère (ddccEe) et chez le nouveau-né (ddCcee). D'autre part l'analyse du liquide amniotique a révélé pour deux des quatre faux-positifs des résultats RhD négatif.

2.6. Étude de Rouillac et al

L'étude de Rouillac et al. a été réalisée en 2008 au Centre Hospitalier intercommunal de Poissy-St-Germain (France). L'objectif de cette étude était de comparer deux méthodes de détection des produits d'amplification : soit par incorporation du colorant SYBR Green I, soit à l'aide d'une nouvelle trousse diagnostic Free DNA Fetal Kit RhD® (Institut de Biotechnologies Jacques-Boy, Reims, France).

2.6.1. Matériel et méthodes

◆Patientes : 300 prélèvements sanguins veineux issus de patientes RhD négatif ont été effectués soit 1 ou 2 semaines avant la réalisation d'une amniocentèse pour caryotype soit à la visite anténatale de 28 SA.

L'âge gestationnel des femmes incluses dans l'étude allait de 12 à 36 SA.

10 de ces patientes étaient porteuses d'une grossesse gémellaire.

◆Préparation des prélèvements :

- 5 à 10 ml de sang collectés par patiente dans des tubes EDTA ;
- Acheminement vers le laboratoire en moins de 48 heures ;

- Centrifugation à 1730 g pendant 10 min à température ambiante ;
- Récupération du plasma et conservation à -20°C jusqu'à utilisation ;

◆Extraction de l'ADN : L'ADN est extrait à partir de 500 µl d'échantillon de plasma (contenant 5 µl d'ADN de maïs dilué) à l'aide d'un kit QIAamp® MinElute® Virus Vacuum et selon le protocole recommandé par le fabricant. L'ADN a été élué l'aide de 30 µl de la solution tampon fourni avec le kit.

Pour chaque série d'extraction et d'amplification, trois contrôles ont été ajoutés : des témoins (plasma RhD positif et RhD négatif) fournis avec le kit et un dernier contrôle blanc pour lequel 500 µl d'eau sont utilisés à la place du plasma.

5 µl de contrôle interne d'extraction (ADN de maïs) est ajouté dans chaque échantillon de plasma à extraire et dans chacun des trois témoins de contrôle. L'ajout d'ADN étranger permet de valider l'extraction et de vérifier l'absence d'inhibition de la PCR.

◆Analyse par PCR : une technique de PCR duplexe en temps réel a été utilisée ici [**annexe 2**] à l'aide d'un LightCycler® 1.5 ou 2.

La PCR est ciblée sur deux régions distinctes du gène RhD : les exons 7 et 10, afin de détecter très spécifiquement le plus grand nombre de variants du gène RhD. Les amplicons sont révélés grâce à des sondes d'hydrolyse spécifiques de chaque exon amplifié.

L'analyse est interprétable après s'être assuré de :

- l'absence d'amplification des exons 7 et 10 du gène RhD pour le témoin négatif ;
- l'amplification des exons 7 et 10 du gène RhD pour le témoin positif à un Crossing Point (Cp) constant d'environ 35 cycles (le Cp est le point par nombre de cycles au-delà duquel la fluorescence d'un échantillon s'élève au-dessus de la fluorescence de fond : c'est le début de la phase exponentielle) ;

- l'amplification de l'ADN de maïs (contrôle interne) pour tous les échantillons, ce qui permet de valider l'efficacité de la phase d'extraction de l'ADN ainsi que l'absence d'inhibition de la réaction de PCR pour chaque échantillon testé.

L'interprétation de l'analyse par PCR doit se faire selon le tableau suivant :

Résultats de l'amplification	Interprétation RhD	Conclusions
exon 7+ et exon 10+	Génotype RhD positif	Génotype foetal RhD positif
exon 7- et exon 10- (un seul prélèvement après 12 SA)	Génotype RhD négatif	Génotype foetal RhD négatif (à vérifier sur un nouveau prélèvement maternel sous 2 semaines)
exon 7- et exon 10- (2ème prélèvement après 12 SA)	Génotype RhD négatif	Génotype foetal RhD négatif
exon 7- et exon 10+	Génotype RhD incertain, Variant possible de RhD	Génotype RhD foetal indéterminé (tester les phénotypes RhD et RhC, c, E, e chez le nouveau-né)
exon 10+ avec Cp précoce	Mère RhD négatif ayant un haplotype Cde avec exon 10+ => consulter le phénotype Rhésus de la patiente. Pour le génotype RhD foetal, seule la PCR de l'exon 7 est informative)	Génotype RhD foetal positif si la PCR de l'exon 7 est positive Génotype foetal indéterminé si la PCR de l'exon 7 est négative
exon 7+ Cp précoce et exon 10+ Cp précoce	Gène D maternel silencieux si phénotype RhD négatif Génotype foetal RhD non interprétable	Génotype RhD foetal indéterminé

2.6.2. Résultats

Les résultats du génotypage foetal sur sang maternel ont été comparés au phénotype de l'enfant à la naissance (obtenu après prélèvement sanguin) ou au génotypage foetal réalisé sur liquide amniotique. Ils sont reportés dans le tableau suivant.

Tableau VIII : Résultats du génotypage foetal RhD sur sang maternel (Rouillac et al.) :

Nombre de patientes ayant bénéficié d'un prélèvement sanguin	Phénotype Rhésus du nouveau-né (Nv-né)	Génotypage foetal Rhésus sur plasma maternel par PCR duplexe en temps réel	
		PCR +	PCR -
300	Nv-né RhD+ (n=229)	229	0
	Nv-né RhD- (n=81)	2	79

229 échantillons ont été correctement génotypés comme RhD-positifs et 79 comme RhD-négatif, avec des résultats concordants dans 100% des cas lorsque l'on compare la méthode utilisant le colorant SYBR Green I et la méthode utilisant la trousse diagnostic Free DNA Fetal Kit RhD®.

Deux résultats faux-positifs à 16 et 20 SA ont été retrouvés avec des Cp pour les exons 7 et 10 tous supérieurs à 39 cycles.

2.7. Étude de Finning et al

L'étude de Finning et al. a été réalisée en 2008 dans les centres hospitaliers de Birmingham et Sheffield (Royaume-Uni).

2.7.1. Matériel et méthodes

◆Patientes : 1997 prélèvements sanguins veineux issus de patientes RhD négatives ont été réalisés à la visite anténatale de 28 SA ou avant.

L'âge gestationnel moyen était de 27.9 SA.

La composition ethnique de ces femmes était la suivante : 55% de femmes caucasiennes, 8% d'asiatiques, 5% de noires, 0.5% de noires des Caraïbes, 1% de mixtes, 33% d'origine inconnue ou non donnée.

De nombreux variants du gène RhD existent. Ils sont relativement rares dans la population caucasienne mais un gène RhD inactif, appelée RhD Ψ est présent chez 66% des femmes RhD négatif d'origine noire africaine.

◆Préparation des prélèvements :

- 4 à 6 ml de sang collectés par patiente dans des tubes ;
- Centrifugation pendant 10 min ;
- Récupération du plasma et conservation à -30°C jusqu'à utilisation.

◆Extraction de l'ADN : l'ADN est extrait de 0,56 ml de chaque échantillon de plasma à l'aide d'un MDx BioRobot®.

◆Analyse par PCR : une technique de PCR quantitative duplexe en temps réel ciblée sur les exons 5 et 7 du gène RhD a été utilisée ici [**annexe 2**] à l'aide d'un ABI Prism® 7900HT.

Le gène CCR5 (gène ubiquitaire d'un récepteur aux chémokines) a servi de témoin pour confirmer la présence et la qualité de l'ADN dans chaque échantillon.

Durant chaque cycle, une faible quantité d'ADN isolée à partir de témoins RhD positifs, RhD négatifs et RhD Ψ a été utilisée pour contrôle.

Chacun des produits de PCR a été détecté simultanément et de façon spécifique.

L'amplification de l'exon 7 était observée à la fois pour les gènes RhD et RhD Ψ tandis que l'amplification de l'exon 5 était uniquement observée pour le gène RhD.

2.7.2. Résultats

Les résultats du génotypage fœtal RhD sur sang maternel ont été comparés au phénotype RhD de l'enfant à la naissance (obtenu après prélèvement de sang au cordon) et sont reportés dans le tableau suivant.

Seuls 1869 phénotypes RhD étaient disponibles car 124 échantillons de sang au cordon ont été perdus et il y a eu 4 MFIU.

Tableau IX : Résultats du génotypage fœtal RhD sur sang maternel (Finning et al.) :

Nombre de patientes ayant bénéficié d'un prélèvement sanguin	Phénotype Rhésus du nouveau-né (Nv-né)	Génotypage fœtal Rhésus sur plasma maternel par PCR en temps réel	
		PCR +	PCR -
1869	Nv-né RhD+ (n=1121)	1118	3
	Nv-né RhD- (n=684)	14	670

Pour 64 patientes (3.4%) Finning et al. n'ont pas pu tirer de conclusions, et les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau X : Détail des 64 résultats non concluants (Finning et al.) :

Génotypage fœtal Rhésus sur plasma maternel par PCR duplexe en temps réel	Phénotype Rhésus du nouveau-né	Nombre	Conclusion
Variant de RhD	4 RhD positif/ 4 RhD négatif	8	Non déterminée
Indéterminé	13 RhD positif*/ 18 RhD négatif	31	Non déterminée
Indéterminé†	18 RhD positif/ 7 RhD négatif	25	Non déterminée

* un des résultats non concluant est dû à un échec d'extraction de l'ADN

† RhD détecté dans l'ADN maternel

2.8. Étude de Minon et al

L'étude de Minon et al. publiée en 2008 est une étude prospective réalisée entre novembre 2002 et décembre 2006 au Centre Hospitalier Régional de la Citadelle à Liège (Belgique). L'objectif de cette étude était d'évaluer la valeur diagnostique du génotypage fœtal RhD sur sang maternel utilisé en routine clinique dès 12 SA.

2.8.1. Matériel et méthodes

◆Patientes : 563 prélèvements sanguins veineux issus de patientes RhD négatives ont été effectués avant la réalisation de procédures invasives.

Parmi ces patientes (dont 18 ont eu une grossesse gémellaire) :

- 40 patientes étaient au 1^{er} trimestre de grossesse (dont 1 grossesse gémellaire) ;
- 409 patientes étaient au 2^{ème} trimestre (dont 13 grossesses gémellaires) ;
- 114 patientes étaient au 3^{ème} trimestre (dont 4 grossesses gémellaires).

L'âge gestationnel moyen était de 21,7 SA.

22 de ces patientes sont d'origine noire africaine, les autres sont toutes caucasiennes.

◆Préparation des prélèvements :

- Echantillons de sang collectés dans des tubes EDTA ;
- Centrifugation à 1700 g pendant 10 min à moins de 48 heures après le prélèvement ;
- Récupération du plasma et conservation à -20°C jusqu'à utilisation ;
- Récupération de la couche leuco-plaquettaire et conservation à -20°C également.

◆Extraction de l'ADN : l'ADN est extrait à partir de 850 µl de plasma maternel à l'aide d'un système automatisé Cobas Amplipred®.

Deux contrôles internes ont été ajoutés à chaque série d'extraction : la couche leuco-plaquettaire d'un homme RhD positif était utilisée comme témoin positif et le plasma d'une femme RhD négatif comme contrôle négatif.

◆Analyse par PCR : une technique de PCR quantitative en temps réel ciblée sur les exons 4, 5 et 10 du gène RhD a été utilisée ici [**annexe 2**] à l'aide d'un ABI Prism 7700®.

Pour évaluer l'efficacité de la procédure d'extraction d'ADN et confirmer que l'ADN des fœtus mâles était présent dans le plasma maternel, les gènes CCR5

(gène ubiquitaire d'un récepteur aux chémokines) et SRY (Sex-determining Region of Y chromosome) ont été co-amplifiés.

Pour améliorer la sensibilité, chaque échantillon a été analysé en double.

Le fœtus a été considéré comme RhD positif lorsqu'une amplification concomitante des trois exons du gène RhD était observée pour au moins une des deux PCR.

Pour éviter des faux-positifs dus aux gènes hybrides RhD Ψ ou RhD-RhCE, les fœtus ont été considérés comme RhD négatif en l'absence d'amplification des exons 4 et 5 du gène RhD quelle que soit la PCR de l'exon 10.

RhD Ψ est en fait un pseudogène qui n'est pas traduit en protéine RhD et qui est donc non fonctionnel.

Quant au gène RhD-RhCE, il s'agit d'un gène hybride avec perte d'expression de l'antigène RhD ; il est donc susceptible de donner des réactions faussement positives avec l'exon 10 spécifique du gène RhD.

2.8.2. Résultats

Les résultats du génotypage fœtal sur sang maternel ont été comparés au phénotype de l'enfant à la naissance (obtenu après analyse du sang au cordon) ou au génotypage fœtal réalisé sur liquide amniotique (après amniocentèse).

En parallèle, Minon et al. ont réalisé l'analyse par PCR en temps réel du gène SRY. Seuls les résultats du génotypage fœtal RhD pour les grossesses uniques sont reportés dans le tableau suivant.

Tableau XI : Résultats du génotypage fœtal RhD sur sang maternel chez les patientes porteuses d'une grossesse unique (Minon et al.) :

Trimestre de grossesse	Nombre de patientes ayant bénéficié d'un prélèvement sanguin	Phénotype Rhésus du nouveau-né (Nv-né)	Génotypage fœtal Rhésus sur plasma maternel par PCR en temps réel		% de concordance du génotypage fœtal Rhésus avec le phénotypage Rhésus des nouveau-nés
			PCR+	PCR -	
1^{er} trimestre	39	Nv-né RhD+ (n=26)	26	0	100%
		Nv-né RhD- (n=13)	0	13	
2^{ème} trimestre	396	Nv-né RhD+ (n=260)	260	0	100%*
		Nv-né RhD- (n=136)	1	135	
3^{ème} trimestre	110	Nv-né RhD+ (n=74)	74	0	100%
		Nv-né RhD- (n=36)	0	36	
Total	545	Nv-né RhD+ (n=360)	360	0	100%*
		Nv-né RhD- (n=185)	1	184	

*100% de concordance si l'on exclut la patiente ayant bénéficié d'une greffe de rein d'un donneur mâle RhD positif.

Dans le cas d'une amplification isolée de l'exon 10, une PCR classique a été réalisée sur la couche leuco-plaquettaire (CLP) maternelle pour détecter les gènes RhD, RhD Ψ et les allèles C et c du gène RhCE afin de confirmer la présence d'un gène non fonctionnel.

Le partenaire a été analysé lorsque la PCR en temps réel de l'exon 10 réalisée sur la couche leuco-plaquettaire maternelle était négative.

Quand le Crossing Point (Cp) des trois exons était anormalement bas (inférieur au 5^{ème} percentile), une PCR en temps réel a été réalisée sur la couche leuco-plaquettaire maternelle pour évaluer la présence d'un gène RhD maternel. La PCR était considérée comme négative si aucun signal n'avait été observé avant le 45^{ème} cycle d'amplification.

Les résultats de l'analyse des dix patientes présentant une amplification isolée de l'exon 10 sont reportés dans le tableau suivant. Toutes les patientes sont d'origine noire africaine ou ont un partenaire d'origine noire africaine.

Tableau XII : Exploration des patientes présentant une amplification isolée de l'exon 10 (Minon et al.) :

Patiente	Origine	PCR en temps réel sur plasma maternel		PCR en temps réel sur CLP maternelle		Phénotype Rhésus maternel	PCR classique sur CLP maternelle et paternelle	Phénotype Rhésus du nouveau-né
		Exon 10	Exons 4 et 5	Exon 10	Exons 4 et 5			
1	A/A	+	-	+	-	ddccee	RhD Ψ maternel	ddccee
2	A/A	+	-	+	-	ddccee	RhD Ψ maternel	ddccee
3	A/A	+	-	+	-	ddccee	RhD Ψ maternel	ddccee
4	A/?	+	-	+	-	ddccee	RhD Ψ maternel	ddccee
5	C/A	+	-	-	-	ddccee	RhD Ψ paternel	ddccee
6	C/A	+	-	-	-	ddccee	RhD Ψ paternel	ddccee
7	C/A	+	-	-	-	ddccee	RhD Ψ paternel	ddccee
8	A/?	+	-	+	-	dd C cee	RhD-RhCE maternel	ddccee
9	A/A	+	-	+	-	dd C cee	RhD-RhCE maternel	dd C cee
10	A/A	+	-	-	-	ddccee	RhD-RhCE paternel	dd C cee

CLP= Couche leuco-plaquettaire

A= origine noire africaine

C= origine caucasienne

?= origine non connue

Les résultats du génotypage fœtal RhD sur sang maternel chez les grossesses gémellaires ont été reportés dans le tableau suivant. Une PCR en temps réel positive indique qu'au moins un des fœtus est RhD positif tandis que l'absence d'amplification du gène RhD exclut la présence de RhD.

Tableau XIII : Résultats du génotypage fœtal RhD sur sang maternel chez les patientes porteuses d'une grossesse gémellaire (Minon et al.) :

Patiente n°	Age gestationnel en SA	Génotypage fœtal Rhésus sur plasma maternel par PCR en temps réel	Phénotype Rhésus des nouveau-nés	
			Jumeau 1	Jumeau 2
1	36.2	PCR+	RhD-	RhD+
2	24.2	PCR -	RhD -	RhD -
3	15.1	PCR+	RhD+	RhD+
4	20.5	PCR+	RhD+	RhD -
5	18	PCR -	RhD -	RhD -
6	12	PCR+	RhD+	RhD+
7	30	PCR+	RhD+	RhD+
8	25.4	PCR+	RhD+	RhD+
9	17.1	PCR+	RhD+	RhD+
10	14	PCR+	RhD+	RhD+
11	16	PCR+	RhD+	RhD+
12	17	PCR+	RhD+	RhD+
13	14.2	PCR+	RhD+	RhD+
14	29	PCR-	RhD -	RhD -
15	29.4	PCR+	RhD+	RhD+
16	23	PCR+	RhD+	RhD+
17	16.2	PCR+	RhD+	RhD+
18	19.5	PCR-	RhD -	RhD -

2.9. Tableaux récapitulatifs des 8 études

Pour une vue d'ensemble des modalités des différentes études, j'ai réalisé les tableaux récapitulatifs suivants.

2.9.1. Tableau de la structure des populations étudiées

Études	Patientes Rhésus négatif							
	Nb	Trimestre de grossesse			Origine ethnique	Parité	Grossesse unique	Grossesse gémellaire
		1 ^{er}	2 ^{eme}	3 ^{eme}				
Etude 1 : Lo	57	12	30	15	Caucasienne	10 lp	57	0
Etude2 : Costa	106	106	0	0	Caucasienne	NP	106	0
Etude 3 : Hromadnikova	45	De 12 à 41 SA			Caucasienne	NP	45	0
Etude 4 : Gonzalez	1	De 10 SA jusqu'à l'accouchement			Caucasienne	NP	1	0
	20	De 13 à 18 SA			Caucasienne	NP	20	0
Etude 5 : Dif-Couvreux	99	0	47	52	Caucasienne	NP	99	0
Etude 6 : Rouillac	300	De 12 à 36 SA			NP	NP	290	10
Etude 7 : Finning	1997	28 SA en moyenne			55% caucasienne 8% asiatique 5% noire africaine 0.5% noire des Caraïbes 1% mixte 33% inconnue	NP	1997	0
Etude8 : Minon	563	40	409	114	541 caucasiennes 22 noires africaines	NP	545	18

NP= non précisé

lp= primipare

2.9.2. Tableau concernant la préparation des prélèvements sanguins et l'extraction de l'ADN

Etudes	Quantité de sang prélevée	Tubes	Délai acheminement vers laboratoire	Propriétés de la centrifugation			Conservation du plasma récupéré	Kit extraction
				Vitesse	Durée	t°		
Etude 1 : Lo	10 ml	EDTA	NP	3000 g	NP	NP	-20°C	Kit QIAamp® (Allemagne)
Etude 2 : Costa	5 ml	EDTA	NP	3000 g	10 min	4°C	-30°C	Kit de préparation pour PCR (France)
Etude 3 : Hromadnikova	10 ml	EDTA	< 24H	1200 g puis 3000 g	10 min	NP	-80°C	Kit QIAamp® (Allemagne)
Etude 4 : Gonzalez	10 ml	NP	> 48H pour certains échantillons	NP	NP	NP	NP	Kit QIAamp® (Allemagne)
Etude 5 : Dif-Couvreux	20 ml	EDTA	NP	2950 g	20 min	NP	-20°C	Kit QIAamp® (Allemagne)
Etude 6 : Rouillac	5 à 10 ml	EDTA	< 48H	1730 g	10 min	Amb	-20°C	Kit QIAamp® (Allemagne)
Etude 7 : Finning	4 à 6 ml	NP	> 48H pour certains échantillons	NP	10 min	NP	-30°C	MDx BioRobot® (Allemagne)
Etude 8 : Minon	NP	EDTA	< 48H	1700 g	10 min	NP	-20°C	Cobas Amplipred® (Belgique)

g= gets

Amb.= ambiante

2.9.3. Tableau des différentes techniques de PCR utilisées

Etudes	Technique de PCR	Exon(s) ciblé(s)	Appareil utilisé	Contrôles internes
Etude 1 : Lo	PCR en temps réel	Exon 10 (gène RhD)	Perkin Elmer-Detector	β-globine
Etude 2 : Costa	PCR en temps réel	Exon 10 (gène RhD)	LightCycler	Gène SOD
Etude 3 : Hromadnikova	PCR en temps réel	Exons 7 et 10 (gène RhD) Exons 2 et 5 (gène RhCE)	ABI Prism	β-globine, Gène RhCE, Gène SRY
Etude 4 : Gonzalez	PCR en temps réel	Exon 7 (gène RhD)	ABI Prism	β-globine
Etude 5 : Dif-Couvreux	PCR classique hemi-nested	Exons 4 (gène RhD et RhCE) Exon10 (gène RhD)	Classique Cycluser PTC 2000	NP
Etude 6 : Rouillac	PCR en temps réel	Exons7 et 10 (gène RhD)	LightCycler	ADN de maïs
Etude 7 : Finning	PCR en temps réel	Exons 5 et 7 (gène RhD)	ABI Prism	Gène CCR5
Etude 8 : Minon	PCR en temps réel	Exons 4, 5 et 10 (gène RhD)	ABI Prism	Gène CCR5, Gène SRY

PARTIE3 :
ANALYSE ET DISCUSSION



1. Analyse des différentes études

1.1. Interprétation des résultats de l'étude de Lo et al.

Dans l'étude de Lo et al., on observe **96,4% de concordance** entre les résultats du génotypage fœtal RhD sur plasma maternel et ceux obtenus par génotypage sur liquide amniotique ou par analyse sérologique du sang au cordon.

Parmi les femmes qui étaient dans le deuxième et troisième trimestre de grossesse, on observe une concordance parfaite entre les résultats du génotypage fœtal Rhésus sur plasma maternel et les résultats obtenus par génotypage sur liquide amniotique ou par analyse sérologique du sang au cordon.

Le génotypage fœtal Rhésus à partir de deux échantillons de plasma prélevés au premier trimestre de grossesse (à 10 et 11 SA) a abouti à deux résultats faux-négatifs. Pourtant l'amplification du gène de la β -globine était positive. Les résultats des dix autres femmes au premier trimestre de grossesse ont été concordants.

L'analyse par PCR en temps réel ciblée sur l'exon 10 du gène RhD à partir du plasma maternel semble donc fiable à partir du deuxième trimestre de grossesse. Par ailleurs, l'analyse de l'ADN fœtal ne semble pas être affectée par la persistance de cellules fœtales de grossesses antérieures puisqu'aucun résultat faux-positif n'a été observé chez des patientes multigestes.

1.2. Interprétation des résultats de l'étude de Costa et al.

Dans l'étude de Costa et al., on observe **100% de concordance** entre les résultats du génotypage fœtal RhD sur plasma maternel au premier trimestre et ceux obtenus par génotypage sur liquide amniotique ou par analyse sérologique du sang au cordon.

Chez 4 patientes, la détermination sérologique du Rhésus du nouveau-né n'a pas pu être effectuée car une Interruption Médicale de Grossesse (IMG) a été réalisée suite à la découverte d'une anomalie à l'amniocentèse. Cependant, chez ces 4 patientes, la détermination du Rhésus du fœtus sur liquide amniotique concordait avec la détermination du Rhésus du fœtus sur plasma maternel.

Ainsi l'analyse par PCR en temps réel ciblée sur l'exon 10 du gène RhD à partir du plasma maternel pourrait atteindre 100% de sensibilité et 100% de spécificité au premier trimestre de grossesse.

1.3. Interprétation des résultats de l'étude de Hromadnikova et al.

Dans l'étude de Hromadnikova et al., on observe **100% de concordance** entre les résultats du génotypage fœtal RhD sur plasma maternel entre 12 et 41 SA et ceux obtenus par analyse sérologique du sang au cordon.

En parallèle, l'amplification du gène SRY prouve la présence d'ADN fœtal dans l'échantillon de plasma maternel et permet de confirmer la spécificité des résultats négatifs pour les gènes RhD, RhC et RhE.

De même, en cas d'identification d'un fœtus RhD négatif de sexe féminin, l'amplification d'un autre allèle hérité du père (RhC positif et/ou RhE positif) prouve la présence d'ADN fœtal dans la circulation maternelle.

Cependant, dans d'autres cas (fœtus de sexe féminin avec phénotype ccddEe), la spécificité d'un résultat négatif pour le gène RhD reste incertaine dans la mesure où Hromadnikova et al. ne disposent pas, dans cette étude, d'autres marqueurs fiables pour confirmer la présence d'ADN fœtal dans la circulation maternelle.

Ainsi l'analyse par PCR en temps réel ciblée sur les exons 7 et 10 du gène RhD à partir du plasma maternel pourrait atteindre 100% de sensibilité et 100% de spécificité entre 12 et 41 SA.

1.4. Interprétation des résultats de l'étude de González et al.

•La première étude de González et al. montre que **l'ADN du fœtus peut être détecté** par PCR quantitative en temps réel dans le plasma maternel **à partir de 12 SA et ne l'est plus 24 heures après l'accouchement**. La quantité d'ADN fœtal présente dans le plasma maternel est par ailleurs d'autant plus grande que la grossesse est avancée.

•Dans la deuxième étude de González et al., on observe **90% de concordance** entre les résultats du génotypage fœtal RhD sur plasma maternel de 13 à 18 SA et ceux obtenus par analyse du liquide amniotique ou des villosités choriales.

En effet, **deux résultats faux-négatifs** ont été observés à 17 SA. González et al. précisent que **ces deux échantillons ont été traités à plus de 48 heures après le prélèvement sanguin maternel**. Dans ces deux échantillons, González et al. ont pu détecter la présence d'ADN maternel mais pas d'ADN fœtal.

1.5. Interprétation des résultats de l'étude de Dif-Couvreux et al.

Dans l'étude de Dif-Couvreux et al., on constate que **la technique d'hemi-nested PCR classique est opérateur-dépendante** puisque 15 résultats ont été retrouvés discordants entre les deux opérateurs.

Dif-Couvreux et al. ont alors étudié la relation entre la présence de résultats discordants entre les deux opérateurs et l'âge gestationnel au cours duquel a été réalisé le prélèvement maternel. Une différence significative est observée entre les échantillons prélevés avant et après 26 SA. **Le taux de résultats discordants entre les deux opérateurs est plus important pour les échantillons prélevés au deuxième trimestre de la grossesse.**

La sensibilité et la spécificité sont respectivement de 100% et de 86,7% après les deux PCR réalisées en parallèle par deux opérateurs différents.

En effet, on observe **quatre résultats faux-positifs**. Dans cette étude, la population est exclusivement caucasienne. Or l'association antigène RhD négatif/allèle D positif est rare dans la population caucasienne lorsque le phénotype est ddccee.

Dif-Couvreux et al. se sont intéressés à la relation entre les résultats faussement positifs et les statuts RhD fœtaux d'une part et les phénotypes maternels d'autre part. Pour trois des quatre résultats faux-positifs, les phénotypes Rh maternels et les phénotypes Rh des nouveau-nés sont ddccee. Il est donc peu probable que ces résultats positifs soient en relation avec la présence d'allèle particulier sur le génome maternel ou de l'enfant. De plus, l'analyse du liquide amniotique a révélé, pour deux de ces cas, des résultats RhD négatif. Ainsi ces résultats faussement positifs semblent être le fruit de contaminations malgré des conditions très strictes de manipulation. En effet, manipuler les produits d'amplification issus de la première PCR peut être source de contamination et donc de faux-positifs.

Ainsi si la technique d'hemi-nested PCR classique peut être utilisée dans la détermination du statut RhD fœtal sur plasma maternel, elle semble cependant difficilement applicable en routine clinique en raison de la nécessité de conditions techniques très strictes.

1.6. Interprétation des résultats de l'étude de Rouillac et al.

Dans l'étude de Rouillac et al. dont l'objectif était d'évaluer l'efficacité de la trousse diagnostic Free DNA Fetal Kit RhD® (Institut de Biotechnologies Jacques-Boy, Reims, France), on observe des **résultats concordants dans 100% des cas** lorsque l'on compare la méthode utilisant le colorant SYBR Green I et la méthode utilisant la trousse diagnostic.

Deux résultats faux-positifs ont été retrouvés avec des Cp pour les exons 7 et 10 tous supérieurs à 39 cycles, ce qui n'était pas en concordance

avec l'âge gestationnel de ces grossesses (16 et 20 SA). Une deuxième extraction a alors été réalisée, et aucune amplification n'a été observée, suggérant une contamination pendant le processus d'extraction de ces deux échantillons.

Cependant aucun résultat faux-négatif n'a été observé dans cette étude.

Ainsi la sensibilité du test est de 100% et la spécificité est supérieure à 99%. Ces résultats montrent la précision du génotypage foetal RhD à partir du plasma maternel basé sur la trousse Free DNA Fetal Kit RhD®. **Ce kit permettrait donc de déterminer le génotype RhD foetal sur du sang maternel prélevé lors du suivi prénatal des patientes RhD négatif sans nécessiter de prélèvement invasif.**

1.7. Interprétation des résultats de l'étude de Finning et al.

Dans l'étude de Finning et al., on observe **95,7% de concordance** entre les résultats du génotypage foetal RhD sur plasma maternel (à un âge gestationnel moyen de 28 SA) et ceux obtenus par analyse sérologique du sang au cordon.

● **14 résultats faux-positifs** (soit 0,75%) ont été observés. Leur incidence est compatible avec la prévalence des variants du gène RhD associés à un manque d'expression de l'antigène RhD.

● **3 résultats faux-négatifs** (soit 0,16%) ont été observés et Finning et al. pensent que ces résultats erronés sont la conséquence d'un retard dans l'acheminement du prélèvement vers le laboratoire.

● **3,4% des résultats n'ont pas été concluants.**

Ainsi ces résultats montrent que le génotypage foetal RhD à partir du plasma maternel peut être déterminé avec un niveau acceptable de précision à partir de 28 SA.

1.8. Interprétation des résultats de l'étude de Minon et al.

Dans l'étude de Minon et al., chez les patientes porteuses d'une grossesse unique, on observe **100% de concordance** entre les résultats du génotypage fœtal RhD à partir de 12 SA sur plasma maternel et ceux obtenus par analyse sérologique du sang au cordon ou par analyse du liquide amniotique (si l'on exclut la patiente ayant bénéficié d'une greffe de rein d'un donneur mâle RhD positif).

- Patiente avec antécédent de greffe d'organe : un résultat faux-positif a été observé chez une patiente RhD négatif, de 37 ans, gestante à 16,6 SA. La PCR en temps réel dans le plasma maternel indiquait que le fœtus était un garçon RhD positif tandis qu'aucune amplification des gènes RhD et SRY n'était observée dans les cellules amniotiques. L'anamnèse a révélé que la patiente avait reçu une greffe de rein d'un donneur mâle RhD positif. Une fille RhD négatif est née et Minon et al. ajoutent que RhD et SRY se trouvaient toujours dans le plasma maternel 3 jours après la naissance.

La spécificité des exons 4 et 5 est de 100% puisqu'aucun de ces deux exons n'a été amplifié chez des patientes porteuses d'un fœtus RhD négatif (si l'on exclut le faux-positif particulier obtenu chez la patiente ayant bénéficié d'une greffe de rein).

- Patientes d'origine africaine : la détermination du statut RhD du fœtus est précise malgré la présence de gènes maternels ou paternels non fonctionnels. Les dix patientes présentant une amplification isolée de l'exon 10 ont donné naissance à 10 nouveau-nés RhD négatif. Ces patientes étaient d'origine noire africaine ou avaient un partenaire d'origine noire africaine. Le génotypage RhD à partir de la couche leuco-plaquettaire maternelle ou paternelle confirme la présence du pseudogène RhD Ψ chez quatre patientes et trois partenaires et la présence du gène hybride RhD-RhCE a été suggérée chez deux patientes et un partenaire. Ce gène hybride est associé à l'haplotype Cde.

Minon et al. précisent que lorsque le gène silencieux était d'origine maternelle, le Crossing Point (Cp) était inférieur à 34,5 (5^{ème} percentile) alors que lorsqu'il était d'origine paternelle, le Cp était supérieur à 34,5.

- Les patientes porteuses d'une grossesse gémellaire : les résultats du génotypage foetal RhD sur plasma maternel chez les 18 patientes porteuses d'une grossesse gémellaire ont également été reportés. Ces génotypages ont été concordants dans 100% des cas avec les phénotypes sérologiques des nouveau-nés. Ils ont en effet permis d'exclure la présence du gène RhD chez les deux foetus d'une grossesse gémellaire (absence de faux-négatif) ou d'indiquer la présence d'au moins un gène RhD chez un des deux foetus.

Ainsi l'analyse par PCR en temps réel ciblée sur les exons 4, 5 et 10 du gène RhD à partir du plasma maternel est très sensible et précise dès 12 SA, que les patientes soient porteuses d'une grossesse unique ou d'une grossesse gémellaire. Cependant, il conviendra d'être vigilant en présence de patientes greffées ainsi que de patientes d'origine non caucasienne.

2. Discussion

2.1. Utilisation de l'ADN foetal libre circulant dans le plasma maternel

Dans son approche conventionnelle, le diagnostic prénatal repose sur l'analyse d'un matériel biologique foetal obtenu par les actes invasifs que sont la choriocentèse, l'amniocentèse ou la cordocentèse. L'utilisation de ces techniques invasives est associée à un risque de perte foetale ou d'aggravation d'une allo-immunisation préexistante. C'est ce risque de perte foetale qui a incité depuis longtemps la recherche de moyens non invasifs de diagnostic prénatal.

Pendant de très nombreuses années, la seule voie non invasive envisagée et envisageable a reposé sur l'analyse des cellules fœtales circulant dans le sang maternel. En raison du faible nombre de cellules fœtales dans la circulation maternelle, des méthodes très sensibles d'isolement cellulaire et de détection sont nécessaires. La faible reproductibilité de ces techniques ne permet pas leur utilisation en pratique clinique.

La présence d'ADN fœtal libre circulant dans le plasma maternel a été mise en évidence. L'origine de cet ADN fœtal reste encore une énigme même si de nombreuses hypothèses sont émises. Son turn-over extrêmement rapide suggère notamment que d'importantes quantités sont libérées continuellement dans la circulation sanguine maternelle. Les cellules fœtales circulantes (environ 1 par ml de sang) ne peuvent pas à elles seules, en être l'origine ; la libération continue à partir des cellules du trophoblaste semble être l'hypothèse la plus vraisemblable.

En raison de la forte concentration d'ADN fœtal dans le sang maternel, les résultats du génotypage fœtal à partir de l'ADN extrait du plasma maternel sont plus fiables que ceux obtenus par analyse génétique de la fraction cellulaire du sang maternel. En effet, l'analyse de l'ADN fœtal ne se fonde pas sur l'isolement des cellules fœtales qui nécessite l'utilisation de techniques spécialisée telles que le tri cellulaire et les micromanipulations.

2.2. La population étudiée

2.2.1. *Age gestationnel*

Plusieurs événements cliniques peuvent causer des allo-immunisations très tôt dans la grossesse (IVG, FC, métrorragies...), le génotypage fœtal RhD sur sang maternel serait donc de grand intérêt au cours du premier trimestre.

Mais si l'étude de Costa et al. montre que le génotypage fœtal RhD sur sang maternel peut atteindre 100% de sensibilité et de spécificité au cours du premier trimestre de la grossesse, les autres études publiées à ce jour, comme celle de Lo et al. démontrent tout de même un manque de sensibilité durant le premier trimestre. Ce manque de sensibilité pourrait être le résultat d'une

quantité d'ADN fœtal dans le plasma maternel trop faible en début de grossesse.

En effet, l'étude de Gonzalez et al. démontre que la quantité d'ADN fœtal dans le plasma maternel est d'autant plus importante que la grossesse est avancée. Dans cette problématique, la compétition au cours de l'amplification génique de l'ADN maternel majoritaire entraîne obligatoirement une moindre sensibilité en début de grossesse.

Enfin, au vu des résultats des 8 études analysées, nous pouvons conclure que **le génotypage fœtal RhD sur sang maternel peut atteindre 100% de sensibilité et de spécificité à partir de 12 SA.**

Cette technique non invasive d'exploration du statut RhD fœtal chez des patientes RhD négatif est aussi fiable, sensible et spécifique que les techniques invasives actuelles.

2.2.2. Parité et gestité des patientes

L'étude de Lo et al. nous a permis d'évaluer la fiabilité du génotypage fœtal RhD sur sang maternel chez des patientes multipares ou multigestes. Aucun résultat faux-positif n'a été observé chez des patientes multigestes ou ayant déjà accouché d'enfants RhD positifs.

L'étude de Gonzalez et al. démontre que l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel est très rapidement éliminé après l'accouchement (dans les 24 heures). Cette observation est capitale puisqu'elle signifie que l'ADN fœtal libre ne persiste pas dans la circulation maternelle contrairement aux cellules fœtales qui peuvent persister pendant plusieurs années après l'accouchement.

Ainsi l'analyse de l'ADN fœtal n'est pas compromise par l'existence de grossesses antérieures.

2.2.3. Grossesses gémellaires versus grossesses uniques

L'étude de Minon et al. montre que **le génotypage fœtal RhD sur sang maternel chez des patientes porteuses d'une grossesse gémellaire est fiable.** Il permet soit d'exclure la présence du gène RhD chez les fœtus d'une

même grossesse soit d'indiquer la présence d'au moins un gène RhD chez un des deux fœtus.

En cas de grossesse dizygote, la présence du gène RhD dans le sang maternel ne nous permet cependant pas de préciser si les deux fœtus sont RhD positif ou si un seul l'est.

2.2.4. Origine ethnique

Des erreurs du génotypage fœtal RhD sur sang maternel peuvent être causées, par l'existence de variants du gène RhD. En effet, le système Rhésus est le plus polymorphe des systèmes de groupe sanguin humain. Il présente une grande variété antigénique.

Le locus Rh est localisé sur le bras court du chromosome 1. Il est composé de deux gènes étroitement liés : le gène RhD et le gène RhCE qui présentent 96% d'homologie.

Des remaniements sont à l'origine de la complexité génétique du système et de son polymorphisme. Des réarrangements géniques donnent naissance à des gènes hybrides RhD-RhCE dans lesquels des segments d'un gène sont remplacés par les segments homologues de l'autre gène.

Si le gène RhD est absent chez les individus caucasiens qui appartiennent au groupe sanguin Rhésus négatif, chez les Africains le polymorphisme RhD négatif est souvent lié à la présence de gènes RhD inactifs. Les deux principaux allèles silencieux trouvés dans les populations d'origine africaine sont : le pseudogène RhD Ψ et le gène hybride RhD-RhCE.

Ainsi, certains résultats faux-positifs peuvent être expliqués en raison d'un gène RhD non fonctionnel et certains résultats faux-négatifs peuvent être expliqués par la présence de réarrangements sur le gène RhD.

De plus l'expression phénotypique de l'antigène D est variable puisque nous avons vu précédemment qu'il existait des sujets D faibles (appelés Du+). Les sujets Du+ présentent des diminutions de la quantité de molécules RhD sur leurs membranes érythrocytaires. Ils ne produisent qu'exceptionnellement des

anticorps anti-D lorsqu'ils sont en contact avec le sang d'individus RhD positifs. Vu la rareté d'allo-immunisation des patientes RhD faible et le manque de preuve de l'efficacité d'une injection d'immunoglobulines anti-D dans cette indication, les patientes Du+ peuvent être considérées comme des patientes RhD positif [34].

En raison de la complexité du locus D, les résultats de la détermination du statut RhD fœtal sur plasma maternel doivent prendre en considération l'origine ethnique des patientes afin d'assurer un résultat le plus fiable possible.

2.2.5. Anamnèse

Dans l'étude de Minon et al. une patiente RhD négatif, greffée rénale, chez qui la recherche du RhD fœtal sur sang maternel était positive, a accouché d'un enfant RhD négatif. Dans ce cas de discordance génotypo-phénotypique, la PCR amplifiait les exons du gène RhD du greffon. **En effet, chez les receveurs d'organes, un microchimérisme peut être présent dans le sang périphérique et le plasma.**

Il est important de **connaitre les antécédents médico-chirurgicaux** de la patiente. Ainsi une anamnèse approfondie est fortement recommandée avant d'effectuer les analyses, incluant les questions de greffe d'organe ou de transplantations de cellules souches.

2.3. Préparation des prélèvements

Comprendre les paramètres qui affectent la fiabilité de la détection de l'ADN fœtal dans le plasma maternel est très important pour son utilisation en routine clinique.

2.3.1. Tubes à prélèvements sanguins

Les échantillons de sang doivent être prélevés sur des tubes anticoagulants : tubes EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique) ou tubes citratés. Les tubes héparinés quant à eux, ne doivent pas être utilisés car **l'héparine inhibe la PCR**. En effet, au cours des processus d'amplification qui sont de nature enzymatique, il existe un risque de réduction de l'efficacité de l'amplification si des substances inhibitrices sont présentes dans l'échantillon.

2.3.2. Délai d'acheminement vers le laboratoire

Différentes études indiquent que **l'ADN foetal serait stable pendant 24 heures** après le prélèvement sanguin [29]. Le temps passé par un échantillon dans le tube avant traitement, affecterait non seulement la quantité d'ADN total présente dans le plasma (apoptose des cellules maternelles et libération d'ADN) mais aussi la stabilité de l'ADN foetal circulant. La grande quantité d'ADN maternel va alors interférer avec l'amplification de l'ADN foetal, ce qui constitue un inconvénient pour l'analyse par PCR tout comme la dégradation de l'ADN foetal.

Il semble donc primordial de considérer le temps de traitement des échantillons comme un facteur important. Il serait donc nécessaire d'établir des protocoles pour l'acheminement vers le laboratoire des échantillons de sang provenant de lieux éloignés.

2.4. Analyse par PCR

2.4.1. PCR en temps réel versus PCR classique

L'étude réalisée par Dif-Couvreux et al. nous a permis d'évaluer la faisabilité de la détermination du statut RhD foetal sur plasma maternel par la technique de PCR classique hemi-nested. Les résultats présentés en deuxième partie démontrent que cette technique est opérateur dépendante, ce qui constitue un premier obstacle à l'utilisation en routine clinique de cette technique.

De plus, la manipulation des produits d'amplification issus de la première PCR semble être source de contamination puisque malgré le respect de conditions très strictes, 4 résultats faux-positifs ont été observés.

Ainsi, si la technique de PCR classique hemi-nested peut être utilisée dans la détermination du statut RhD fœtal sur plasma maternel, celle-ci paraît difficilement applicable en routine clinique en raison de la nécessité de conditions techniques très strictes.

La technique de PCR quantitative en temps réel est basée sur un système optique de détection qui permet d'éviter la nécessité d'éventuelles manipulations post-amplification ou analyse des échantillons. La PCR en temps réel offrirait donc un plus haut niveau de sécurité et représenterait la procédure la plus sûre d'amplification. En effet, les risques de contaminations sont réduits puisque les produits amplifiés restent dans un tube fermé.

Ainsi la technique de PCR quantitative en temps réel semble préférable même si l'existence de résultats faux-positifs et faux-négatifs reste possible en raison du polymorphisme du gène RhD détaillé précédemment.

2.4.2. PCR multiplexe en temps réel

Les réactions multiplexes apportent de nombreuses informations sur un même échantillon tout en économisant les réactifs. Elles sont utiles dans le cas d'échantillons rares, ou pour inclure un contrôle interne qui valide la PCR en écartant les faux négatifs, l'erreur technique ne pouvant être exclue.

Pour éviter des résultats faux-positifs et faux-négatifs en raison de l'existence de variants du gène RhD, **l'amplification d'au moins deux régions (exons) du gène RhD semble préférable.**

Certaines équipes telles que Lo et al., Costa et al., ou encore Gonzalez et al. ont déjà réussi à déterminer le génotype RhD fœtal à l'aide d'une seule région du gène. Mais un résultat faux-positif ne peut être exclu même si une telle situation est exceptionnelle dans la population caucasienne et sans conséquence médicale.

De plus l'utilisation de la technique de PCR multiplexe en temps réel permet d'intégrer des contrôles internes afin de réduire le nombre de résultats erronés.

Cependant aucun contrôle universel interne de l'ADN fœtal n'est encore disponible. L'une des limites potentielles du génotypage est l'absence de contrôle positif prouvant la présence d'ADN fœtal, surtout en cas de génotypage RhD négatif.

L'utilisation d'un gène endogène comme la β -globine ou le gène CCR5 (gène ubiquitaire d'un récepteur aux chémokines) semble inappropriée car son amplification indique la présence d'ADN dans l'échantillon, sans en spécifier son origine maternelle ou fœtale. L'ajout d'une faible quantité d'un ADN hétérologue pour le contrôle interne, comme proposé dans la trousse diagnostic « Free DNA Fetal Kit RhD », serait plus sensible pour la surveillance des étapes d'extraction et d'amplification.

Plusieurs stratégies ont été proposées afin de confirmer la présence d'ADN fœtal dans le plasma maternel.

- L'une est basée sur la détection de séquences du gène SRY mais ne s'applique évidemment pas aux 50% des grossesses avec fœtus féminin. En effet, l'absence d'amplification des différentes séquences spécifiques des gènes RhD et SRY peut soit être prédictive d'un fœtus féminin, soit être le résultat d'un faux-négatif lié à l'absence ou à une faible concentration d'ADN fœtal dans l'extrait étudié.

- Une approche complètement différente dans le développement d'un marqueur universel de l'ADN fœtal consiste à exploiter les différences épigénétiques entre les molécules d'ADN fœtal et maternel présents dans le plasma maternel.

L'un des meilleurs marqueurs épigénétiques étudiés est la méthylation de l'ADN [31]. Il a été montré que le gène Maspin (tumor suppressor gene mammary serine protease inhibitor) est hypométhylé dans les cellules du placenta, source principale d'ADN fœtal dans le plasma maternel et hyperméthylé dans les cellules sanguines maternelles. Toutefois, un traitement au bisulfite est nécessaire pour détecter des séquences non méthylées (d'origine fœtale) dans un océan de séquences hyperméthylées d'origine

maternelle et il a été démontré que ce traitement a pour effet secondaire la dégradation de l'ADN, ce qui a un impact sur le seuil de détection de la méthode.

Plus récemment, la région promotrice du gène RASSF1A (tumor suppressor gene Ras association domain family 1A) a été sélectionnée ; son profil de méthylation est à l'opposé de celui de Maspin. En effet, RASSF1A est hyperméthylé dans les cellules du placenta et hypométhylé dans les cellules sanguines maternelles. Dans ce cas, l'analyse de la méthylation est réalisée en utilisant une endonucléase de restriction sensible à la méthylation. Celle-ci coupe les séquences hypométhylées de RASSF1A d'origine maternelle mais laisse intactes les séquences hyperméthylées placentaires. **Ainsi, RASSF1A pourrait représenter un marqueur universel de l'ADN fœtal dans le sang maternel. Cette technique en cours d'évaluation pourrait permettre dans un avenir proche de simplifier et d'augmenter la sensibilité des méthodes actuelles.**

2.4.3. Mesures strictes nécessaires

Afin de limiter le risque de contamination et de lutter contre les résultats faux-positifs lors des différentes procédures, de strictes précautions doivent être respectées. Des pipettes et embouts spécifiques à filtre pour PCR doivent être utilisés et les techniques de travail propres aux laboratoires de biologie moléculaire doivent être appliquées dans le respect des exigences du GBEA.

L'opérateur doit se laver soigneusement les mains après manipulation des réactifs et des échantillons. Les flacons doivent être rebouchés immédiatement après utilisation afin d'éviter les inversions de bouchons et les contaminations des réactifs par des micro-organismes ou par des nucléases. De même, les flacons sont placés au réfrigérateur ou au congélateur après utilisation.

2.4.4. Résultats faux-négatifs et faux-positifs

Comme dans toute démarche diagnostique, la sensibilité (faux-négatifs) et la spécificité (faux-positifs) doivent être considérées.

Un résultat **faux-positif** pourrait conduire à poser des actes médicaux inutiles, voire nuisibles, lors de la prise en charge d'une grossesse faussement à risque de MHNN ou à injecter des immunoglobulines anti-D non nécessaires.

Le risque de **faux-négatif** consiste à déclarer un fœtus RhD négatif alors qu'il est RhD positif et, dès lors, à ne pas surveiller la grossesse comme elle devrait l'être ou omettre la prophylaxie par immunoglobulines anti-D lors d'événements potentiellement sensibilisants.

2.4.5. La Trousse "Free DNA Fetal Kit RhD"

L'analyse de ces 8 études montre bien qu'il existe des différences notables entre les techniques utilisées concernant l'extraction de l'ADN, les sondes et amorces utilisées, les conditions de PCR, la détection des produits amplifiés...

L'élaboration d'un protocole standard est utile pour garantir la reproductibilité, la sensibilité et la spécificité entre les laboratoires. En conséquence, un kit de génotypage fœtal sur plasma maternel a été développé en France, par les laboratoires Jacques Boy de Reims (Free DNA Fetal Kit® RhD).

L'étude de Rouillac et al. nous a permis d'évaluer l'efficacité de cette trousse diagnostic. Les résultats montrent que **ce kit permet de déterminer avec précision le génotype RhD fœtal sur sang maternel**.

Ce kit de génotypage disponible depuis juillet 2007 a reçu le marquage CE (relatif à la directive européenne 98/99/CE) et détient actuellement la licence exclusive pour le génotypage RhD fœtal sur plasma maternel en Europe (licence ISIS Innovation Ltd Oxford University).

L'utilité du test est en cours d'examen par la Haute Autorité de Santé.

2.5. Le coût financier du génotypage fœtal RhD sur sang maternel

La possibilité de connaître le statut RhD fœtal grâce au génotypage RhD fœtal sur sang maternel dans le suivi prénatal modifie les calculs économiques réalisés précédemment. Le calcul coût/efficacité de cette approche dépend bien évidemment du coût du génotypage RhD fœtal.

La connaissance du statut RhD du fœtus permet de supprimer non seulement l'injection préventive d'immunoglobulines anti-D systématique à 28 SA mais aussi celle ciblée dans les situations à risque d'hémorragie foeto-maternelle, chez environ 40% des femmes RhD négatif (dont le fœtus est également RhD négatif).

Elle permet en conséquence de réduire d'au moins 40% les surcoûts en évitant les injections de Rhophylac® à ces mères RhD négatif avec fœtus RhD négatif. Mais l'économie d'immunoglobulines qui résulterait de ce génotypage ne viendra compenser que très partiellement la dépense engendrée par la nouvelle technique de génotypage fœtal RhD sur sang maternel.

En effet, le prix du génotypage fœtal RhD par patiente s'établit actuellement bien au-dessus des 40% d'une dose de Rhophylac® 300, soit $(40 \times 85,16 \text{ €}) / 100 = 34,064 \text{ €}$.

Il est actuellement facturé en France hors nomenclature par les laboratoires à un taux variable, de 54 € à 189 € [22]. ; la valeur qui pourrait être retenue lors de son inscription à la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) se situera probablement entre ces deux extrêmes. Ce test n'étant pas encore inscrit à la nomenclature, il n'est par conséquent pas remboursé par la sécurité sociale.

Une étude médico-économique (l'étude GENIFERH) est en cours, touchant environ 3000 femmes enceintes RhD négatif recrutées dans cinq centres français (Lille, Marseille, Nantes, Paris et Poissy).

Les résultats de cette étude sont attendus pour 2011, mais il est cependant fort probable que le coût de la PARAD s'alourdira et il sera alors nécessaire de la réévaluer selon plusieurs scénarios.

L'analyse devra aussi tenir compte des autres bénéfices potentiels du génotypage RhD fœtal, à savoir l'amélioration possible de la compliance à la PARAD des patientes et des obstétriciens, la réduction du nombre de certains examens immuno-hématologiques qui ne sont pas nécessaires chez la femme RhD négatif enceinte de fœtus RhD négatif (RAI, dosage pondéraux et peut-être bilan immuno-hématologique mère-enfant de prévention Rh à l'accouchement) et du soulagement, monétairement inquantifiable, apporté à certaines patientes d'apprendre qu'elles portent un enfant RhD négatif [22].

2.6. Proposition de stratégie de prise en charge

Si les différentes études en cours (GENIFERH et HAS) concluent à la validité du test, son adoption pourrait entraîner un changement radical dans les pratiques à venir.

La prise en charge des patientes RhD négatif, inspirée du schéma proposé par l'équipe de Minon et al. [34], reposant sur la recherche du gène RhD fœtal sur sang maternel pourrait s'établir comme suit :

- Demande de RAI au 2^{ème} mois de la grossesse.

- Recherche systématique, à partir de 12SA, du génotypage fœtal RhD sur sang maternel à l'aide du kit des laboratoires Jacques Boy (Free DNA Fetal Kit® RhD), seul kit portant le marquage CE à l'heure actuelle.

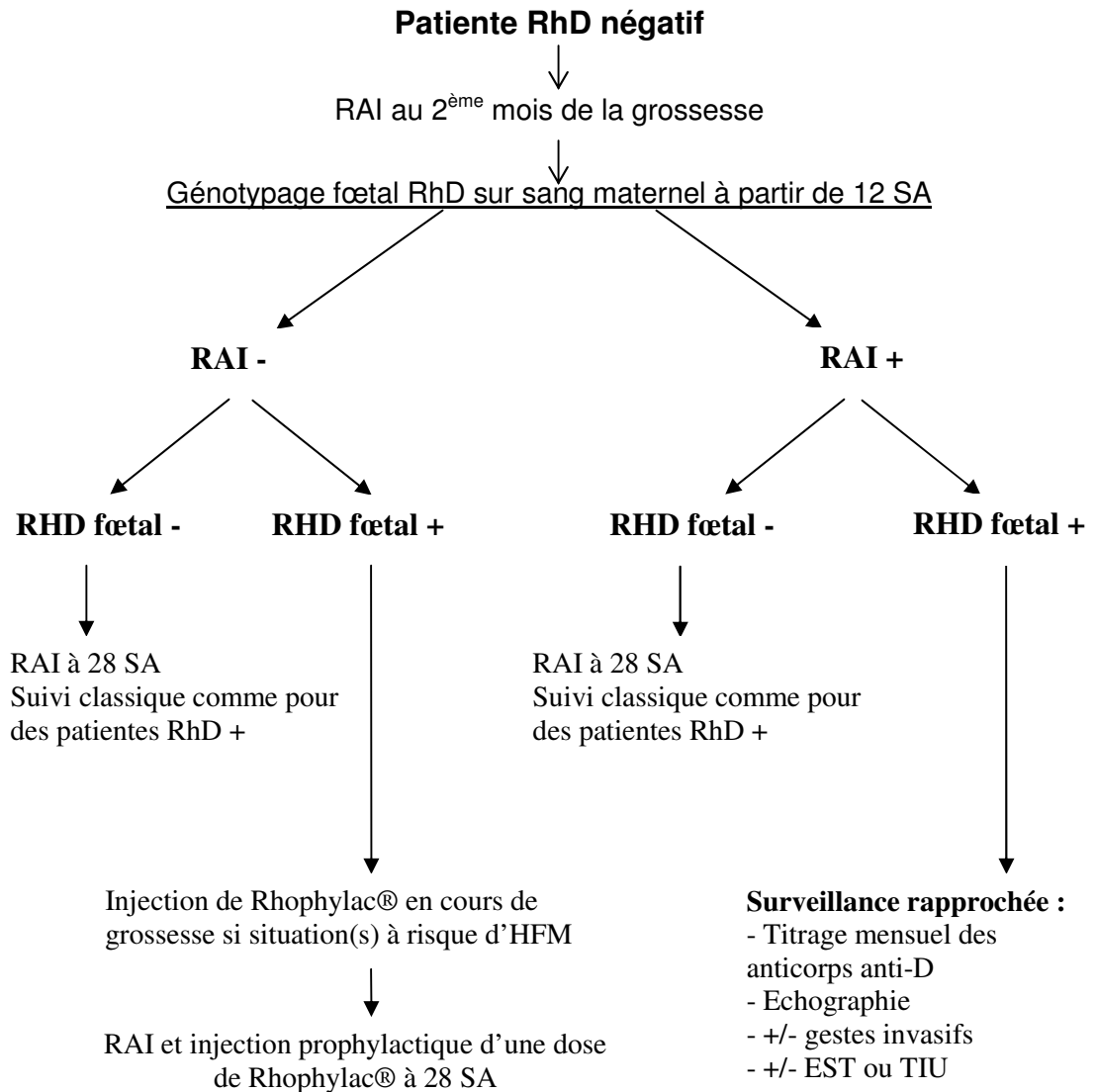
- Dès lors que le fœtus ne présente pas le gène RhD, la patiente peut bénéficier d'un suivi identique à celui d'une patiente RhD positif. L'injection d'immunoglobulines anti-D ne serait plus nécessaire lors des métrorragies gravidiques ou autres incidents à risque d'HFM.

Une demande de RAI sera cependant faite au 9^{ème} mois et le plus proche possible du terme en cas de besoin transfusionnel.

- Les patientes dont le fœtus est porteur du gène RhD avec RAI négative continuent à bénéficier d'une surveillance accrue. L'injection d'immunoglobulines anti-D lors de situations à risque d'HFM est alors nécessaire pour éviter un risque d'allo-immunisation, de même que l'injection systématique à 28 SA (après information et consentement éclairé).
- Les patientes RhD négatif présentant des anticorps anti-D et dont le fœtus est de génotype RhD négatif ne doivent plus subir d'examen invasif, ni de surveillance accrue.
- Quant aux patientes allo-immunisées anti-D dont le fœtus est porteur du gène RhD, la prise en charge reste inchangée : suivi mensuel du titre des anticorps anti-D associé à l'échographie voire aux explorations invasives. Le recours à l'amniocentèse et au diagramme de Liley est de moins en moins fréquent, les équipes préférant effectuer, sur signes échographiques (Doppler fœtal de l'Artère Cérébrale Moyenne), une cordocentèse avec numération globulaire, plus ou moins exsanguino-transfusion (EST) ou transfusion in-utéro (TIU) concomitante.
- Le test de Kleihauer sera prescrit largement et utilisé afin de moduler le nombre d'injections d'immunoglobulines anti-D.
- Lors de l'accouchement, le groupe sanguin du nouveau-né sera prélevé au cordon. Si le nouveau-né est RhD positif, une injection de Rhophylac est indiquée chez les patientes avec RAI négatif et la dose injectée sera fonction du test de Kleihauer réalisé après l'accouchement.

Cette stratégie de prise en charge peut être représentée par l'arbre décisionnel suivant.

Schéma de stratégie de prise en charge des patientes RhD négatif



Accouchement : phénotypage RhD du nouveau-né sur sang au cordon et injection de Rhophylac® si RAI négative et nouveau-né RhD positif, en fonction du TK.

CONCLUSION

Quatre années après avoir été officiellement recommandée, la prévention anténatale systématique à 28 SA par administration d'immunoglobulines anti-D est devenue, en France, une pratique adoptée par de très nombreux obstétriciens et inscrite dans les protocoles de prophylaxie Rh de nombreux services d'obstétrique.

Actuellement, environ 195 000 femmes RhD négatif sont enceintes chaque année en France et bénéficient donc à titre systématique d'une injection d'immunoglobulines. Or 40% d'entre elles sont enceintes d'enfant RhD négatif et sont donc exposées inutilement à un produit dérivé du sang.

La mise en évidence de l'ADN fœtal libre circulant dans le sang maternel permet aujourd'hui de rechercher la présence du gène RhD fœtal dans le plasma des femmes enceintes RhD négatif.

Cette possibilité de définir le génotypage fœtal RhD de manière non invasive offre de nombreux avantages. Elle constitue une des avancées majeures de ces dernières années en médecine fœtale et en obstétrique et semble donc incontournable dans la prise en charge des patientes RhD négatif.

Outre le fait qu'elle permet d'éviter une potentialisation de l'allo-immunisation engendrée par un geste invasif, elle est surtout intéressante chez des patientes à risque (RhD négatif) ne devant pas subir à priori de geste invasif. Chez ces dernières, la connaissance de ce gène RhD peut ainsi permettre, en cas de fœtus RhD négatif, d'alléger la surveillance de la grossesse, et de réserver aux seules patientes RhD négatif, porteuses d'un fœtus RhD positif, l'exposition à un produit dérivé du sang.

Pour cet ensemble de raisons, l'intérêt d'une généralisation du génotypage fœtal RhD sur sang maternel à toutes les femmes enceintes RhD négatif semble évident.

Au vu de ce travail, la corrélation entre le génotypage fœtal RhD prédit sur plasma maternel et le phénotype RhD observé à la naissance est excellente à partir de 12 SA par la technique de PCR multiplexe en temps réel.

Actuellement le génotypage fœtal RhD non invasif ne fait partie du protocole de PARAD dans aucun pays. Les principaux écueils à l'utilisation actuelle du génotypage restent l'absence de contrôle interne prouvant la présence d'ADN fœtal et le non remboursement du test par la sécurité sociale.

Cependant l'analyse spécifique de l'ADN fœtal à travers ses caractéristiques physico-chimiques (méthylation...) est une voie prometteuse qui pourrait permettre, dans un avenir proche, de simplifier et d'augmenter la sensibilité des méthodes actuelles.

Quant à l'inscription du génotypage à la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM), il s'agit d'une étape incontournable si l'on souhaite que le plus grand nombre de patientes puisse bénéficier de cette technique. Plusieurs études sont en cours pour évaluer d'une part l'intérêt médical de ce test et d'autre part les aspects économiques de sa généralisation.

L'adoption du génotypage RhD fœtal à partir du plasma maternel pourrait également être une solution dans un contexte de relative pénurie dans l'approvisionnement des immunoglobulines anti-D. Cependant une autre perspective d'avenir pour l'immunoprophylaxie Rhésus serait la substitution des anticorps monoclonaux aux immunoglobulines anti-D. En effet, vingt ans après les premiers essais thérapeutiques, une nouvelle génération d'anticorps monoclonaux anti-D a été mise au point et les résultats cliniques obtenus sont très encourageants. L'intérêt en serait double : une parfaite sécurité biologique et l'absence de risques de rupture de stock des immunoglobulines d'origine humaine exclusivement Nord-américaine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FRANCOUAL C. Incompatibilités sanguines fœto-maternelles. In : FRANCOUAL C, HURAUX-RENDU C, BOUILLIE J, dir. Pédiatrie en maternité. Paris : Flammarion ; 2006. p. 239-46.
- [2] LANSAC J, BERGER C, MAGNIN G. Incompatibilités sanguines fœto-maternelles. In : Obstétrique pour le praticien. Issy-les-Moulineaux : Masson ; 2003. p. 197-207.
- [3] KOUDRA F. La maladie hémolytique du nouveau-né. In : LAFORTUNE S, SAWYER P, TREMBLAY M, dir. Actes de la 10^{ème} journée sciences et savoir. Sudbury: Acfas-Sudbury; 2004. p. 151-69.
- [4] BRANGER B, WINER N. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D fœto-maternelle/ Épidémiologie de l'allo-immunisation anti-D pendant la grossesse. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 2006 Février ; 35, (S1) : 87-92.
- [5] INSEE. Statistiques d'état civil sur les naissances en 2008. Société [En ligne]. 2009 Août [Consulté le 18/02/10] ; n°97. Consultable à l'URL : http://www.insee.fr/fr/themes/document.asp?ref_id=sd20081
- [6] DREES Les interruptions volontaires de grossesses en 2007. Etudes et résultats [En ligne]. 2009 Décembre [Consulté le 18/02/10] ; n°713 : [6 pages]. Consultable à l'URL : <http://www.sante-sports.gouv.fr/IMG/pdf/er713.pdf>
- [7] BOUYER J. Épidémiologie de la grossesse extra-utérine. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 2003 Novembre ; 32, (57): 8-17.
- [8] EMILE C. Recherche d'Agglutinines Irrégulières (RAI). Vocation Sage-femme. 2008 Janvier ; 58 : 25-6.
- [9] SEROUSSI H. Diagnostique biologique d'une immunisation fœto-maternelle [En ligne]. [Consulté le 25/11/09]. Consultable à l'URL : <http://www.gyneweb.fr/sources/biologie/hemato/immunofetomater.html#m%C3%A9canimmun>

[10] CLOT J. Phase effectrice humorale et cellulaire. Cours PCEM2 Faculté de médecine de Montpellier-Nîmes [En ligne]. 2008 Février [Consulté le 27/11/09] ; MB7 Immunologie : [4 pages]. Consultable à l'URL :

http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_1/PCEM2/mod-base/MB7_Bio_Med/Ressources_locales/IMMUNO/PCEM2_MB7_Immuno_I07.pdf

[11] CNGOF, CNRHP, SFMP. Grossesse et groupe Rhésus/ Document d'information pour les femmes enceintes. Paris : CNGOF ; 2006.

[12] CNGOF, CNRHP. Prévention de l'allo-immunisation anti-RhD, tableau des indications à l'usage du praticien qui suit la grossesse. Paris : CNGOF ; 2006.

[13] CNGOF. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus D foeto-maternelle, Recommandations pour la pratique clinique (texte court). Paris : CNGOF ; 2005.

[14] DENIS V. La prévention de l'allo-immunisation Rhésus D foeto-maternelle. Vocation Sage-femme. 2008 Octobre ; 66 : 20-4.

[15] D'ERCOLE C. Prise en charge des enfants nés de mères immunisées. In : LFB, dir. Le point sur la prévention de l'allo-immunisation rhésus-D foeto-maternelle : un an après les recommandations de la pratique clinique. Paris : CNGOF ; 2006. p. 1-7.

[16] PAULARD I. Supplémentation en vitamine D et prévention de l'allo-immunisation anti-Rhésus. Vocation Sage-femme. 2008 Juin ; 63 : 25-7.

[17] CORTEY A, BROSSARD Y. Recommandation pour la pratique clinique, prévention de l'allo-immunisation Rhésus D foeto-maternelle, aspects pratiques. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 2006 Février; 35, (S1): 123-30.

[18] NOYE S. Incompatibilité foeto-maternelle Rhésus D : de la découverte à nos jours (2/2). Vocation Sage-femme. 2009 Juillet-Août ; 74 : 16-8.

[19] HOHLFELD P, WIRTHNER D, TISSOT JD. Maladie Hémolytique périnatale. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 1998 Mai ; 27, (3): 265.

- [20] DRICOT JF, MINON JM, SCHAAPS JP et al. Le génotypage RhD fœtal sur sang maternel dans le suivi prénatal des patientes Rhésus négatif. Rev Med Liège. 2006 ; 61, (12): 820-6.
- [21] PARANT O. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D fœto-maternelle, Comparaison de l'efficacité des différentes formes de prévention de l'allo-immunisation anti-D au cours de la grossesse : prévention ciblée limitée aux situations à risque ou associée à une prévention systématique au 3^e trimestre. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 2006 Février; 35, (S1): 93-103.
- [22] BROSSARD Y, CORTEY A, MAILLOUX A et al. La prévention anténatale de routine anti-D (PARAD), situation en 2009. In : LANSAC J, DARAI E, LUTON D, dir. Mises à jour en gynécologie et obstétrique et techniques chirurgicales. Paris : CNGOF ; 2009. p. 91-104.
- [23] LINET T. Prévention par Rhophylac® et grossesse, une autre lecture. Vocation Sage-femme. 2008 Octobre ; 66 : 25-9.
- [24] RAVINET J, CARBONNE B. Analyse économique de la prévention de l'immunisation anti-D. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 2006 Février ; 35, (S1): 104-11.
- [25] 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 Février; 13, (10).
- [26] DENNIS LO YM, MAGNUS HJELM N, FIDLER C et al. Prenatal Diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. N Engl J Med. 1998 Décembre; 339: 1734-8.
- [27] COSTA JM, GIOVANGRANDI Y, ERNAULT P et al. Fetal RhD Genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. Br J Haematol. 2002 Février; 119: 255-60.

- [28] 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): 301-5.
- [29] GONZALEZ C, GARCIA-HOYOS M, TRUJILLO-TIEBAS MJ et al. Application of Fetal DNA Detection in Maternal Plasma: A Prenatal Diagnosis Unit Experience. *J Histochem Cytochem.* 2005; 53, (3): 307-14.
- [30] DIF-COUVREUX D, HOUFFLIN-DEBARGE V, DELSALLE A et al. Évaluation de la détermination du statut Rhésus-D fœtal sur plasma maternel par la technique d'hemi-nested PCR. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 2006; 35: 658-64.
- [31] ROUILLAC-LE SCIELLOUR C, SERAZIN V, BROSSARD Y et al. Détermination non invasive du génotypage fœtal Rhésus D. Utilisation d'une nouvelle trousse de génotypage Free DNA Fetal Kit RhD. *Transfus Clin Biol.* 2007; 14: 572-7.
- [32] 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 Avril; 1-6.
- [33] MINON JM, GERARD C, SENTERRE JM et al. Routine fetal RhD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion.* 2008 Février; 48: 373-81.
- [34] DRICOT JF, MINON JM, SCHAAPS JP et al. Le génotypage RhD fœtal sur sang maternel dans le suivi prénatal des patientes RhD négatif. *Rev Med Liège.* 2006; 61, (12): 820-6.

ANNEXE 1 :

Tableau extrait des « *Recommandations pour la pratique clinique* » du Collège National des Gynécologues et obstétriciens français (2005)

Tableau I Circonstances pouvant induire des hémorragies fœto-maternelles au cours de la grossesse.
Circumstances which can induce fetomaternal hemorrhage during pregnancy.

Au premier trimestre (Risque modéré de passage d'hématies fœtales)

- Toute fausse couche spontanée ou menace de FCS du 1er trimestre
- Toute interruption de grossesse (IVG ou IMG), quels que soient le terme et la méthode utilisée
- Grossesse molaire
- Grossesse extra-utérine (GEU)
- Métrorragies
- Choriocentèse (biopsie de villosités choriales), amniocentèse
- Réduction embryonnaire
- Traumatisme abdominal
- Cerclage cervical

Aux deuxième et troisième trimestres

Risque important de passage d'hématies fœtales :

- Interruption médicale de grossesse
- Fausse couche spontanée tardive
- Mort fœtale in utero (MFIU)
- Version par manœuvres externes (VME)
- Traumatisme abdominal ou pelvien (quel que soit le terme de la grossesse)
- Intervention chirurgicale abdominale ou pelvienne (quel que soit le terme de la grossesse)
- Prélèvement ovulaire : amniocentèse, cordocentèse, placentocentèse
- Accouchement, quelle que soit la voie

Risque modéré de passage d'hématies fœtales :

- Métrorragies
- Cerclage du col utérin
- Menace d'accouchement prématuré (MAP) nécessitant un traitement

Tableau II Adaptation de la dose d'immunoglobulines anti-D en fonction du volume d'hémorragie fœto-maternelle estimé par le test de Kleihauer.
Adaptation of anti-D immunoglobulin to volume of fetomaternal hemorrhage estimated by the Kleihauer test.

Kleihauer (HF/10 000 HA)	Dose de 100 µg*		Dose de 200 µg*		Dose de 300 µg		Voie d'administration
	Doses	µg	Doses	µg	Doses	µg	
0-4	1	100	1	200	1	300	IV directe
5-24	2	200	1	200	1	300	
25-44	3	300	2	400	1	300	
45-64	4	400	2	400	2	600	
65-84	5	500	3	600	2	600	PERFUSION sur 4 heures Dilué dans 250 ml de NaCl à 9 pour mille
85-104	6	600	3	600	2	600	
105-124	7	700	4	800	3	900	
125-144	8	800	4	800	3	900	
145-164	9	900	5	1 000	3	900	
165-184	10	1 000	5	1 000	4	1 200	
185-204	11	1 100	6	1 200	4	1 200	
205-224	12	1 200	6	1 200	4	1 200	
225-244	13	1 300	7	1 400	5	1 500	
245-264	14	1 400	7	1 400	5	1 500	
265-284	15	1 500	8	1 600	5	1 500	
285-304	16	1 600	8	1 600	6	1 800	

* La dose la plus basse actuellement commercialisée en France est de 200 µg. Dans les cas où une dose de 100 µg serait suffisante, il est recommandé de ne pas fractionner les doses.
HF : hématies fœtales. HA : hématies adultes.

ANNEXE 2 :

LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE PCR :

La PCR (polymerase chain reaction ou réaction de polymérisation en chaîne) est une méthode de clonage des fragments d'ADN indépendante de tout système cellulaire, rapide et sensible.

♦La PCR classique est une technique in vitro permettant d'amplifier une séquence d'ADN cible, même à partir d'une très petite quantité de matériel ou à partir de matériel ancien.

Un cycle de PCR prend environ 1 à 5 minutes. Il est composé de trois réactions dont les durées et les températures sont contrôlées précisément dans un thermocycleur automatique. Les trois étapes de chaque cycle sont :

- dénaturation de l'ADN double brin, à environ 93-95°C : les deux brins d'ADN sont maintenus appariés par des liaisons non covalentes (G-C et A-T). La dénaturation correspond à la rupture de ces liaisons par la température.
- hybridation des amorces à environ 50-70°C,
- synthèse d'ADN à l'aide de la DNA polymérase à environ 70-75°C

En PCR classique, 25 à 35 cycles sont effectués. Théoriquement, à chaque cycle, la quantité d'ADN amplifié est doublée.

Le produit amplifié n'est détecté que lorsque les cycles de PCR sont terminés, après dépôt et migration sur un gel d'agarose ou par technique ELISA.

♦La PCR en temps réel détecte et mesure l'accumulation du produit amplifié au cours de l'amplification contrairement à la PCR classique.

La détection en temps réel des produits de PCR est rendue possible en ajoutant une molécule fluorescente au mélange réactionnel. Le système optique d'un thermocycleur spécialisé pour le temps réel mesure une émission de fluorescence proportionnelle à la quantité de gène amplifié à chaque cycle. Les résultats sont enregistrés et analysés par un logiciel sous forme de graphes

d'amplification, de tableaux de données et de rapports. Les résultats de la PCR en temps réel peuvent être :

- qualitatifs (présence ou absence de la séquence)
- quantitatifs (quantification absolue ou relative)

Les thermocycleurs pour le temps réel savent différencier les signaux de différents fluorophores fixés sur les sondes pour détecter plusieurs produits amplifiés dans un même échantillon ; ces réactions sont dites multiplexes.

L'analyse des données au cours de l'amplification réduit le temps d'obtention des résultats et facilite l'analyse d'échantillons en grand nombre. Les risques de contaminations sont réduits puisque les produits amplifiés restent dans un tube fermé.



INTITULE :

Le génotypage foetal rhésus sur sang maternel dans le cadre de la prévention de l'allo-immunisation rhésus.

DOMAINES :

Obstétrique, Hématologie, Pédiatrie, Santé Publique.

THEME :

Monographie sur le génotypage foetal Rhésus sur sang maternel.

MOTS CLES :

Maladie hémolytique du nouveau-né, allo-immunisation fœto-maternelle RhD, immunoprophylaxie, immunoglobulines, génotypage foetal Rhésus, diagnostic prénatal.

RÉSUMÉ

Chaque année en France, environ 195 000 femmes RhD négatif bénéficient à titre systématique, à 28 semaines d'aménorrhées, d'une injection d'immunoglobulines anti-D. 40% d'entre elles portent un fœtus RhD négatif et sont donc exposées inutilement à un produit dérivé du sang.

La mise en évidence de l'ADN foetal libre circulant dans le plasma maternel permet aujourd'hui de définir le statut RhD foetal de manière non invasive. Cette découverte technique ouvre des perspectives nouvelles au cœur de l'actualité gynéco-obstétricale et méritait donc d'être analysée.

J'ai réalisé une monographie, basée sur l'analyse de huit études internationales publiées sur la question.

Ce travail montre que le génotypage foetal RhD sur plasma maternel peut atteindre 100% de sensibilité et de spécificité à partir de 12 semaines d'aménorrhées. Cette technique est donc aussi fiable ; sensible et spécifique que les techniques invasives actuelles.

L'intérêt de la généralisation de cette technique semble évident mais son adoption en routine clinique dépendra des résultats, attendus en 2011, de l'analyse médico-économique en cours.

