



HAL
open science

Performance diagnostique du génotypage rhésus D fœtal par prise de sang maternelle au premier trimestre de la grossesse

Alexandre Vivanti

► **To cite this version:**

Alexandre Vivanti. Performance diagnostique du génotypage rhésus D fœtal par prise de sang maternelle au premier trimestre de la grossesse . Médecine humaine et pathologie. 2014. dumas-01114621

HAL Id: dumas-01114621

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01114621>

Submitted on 9 Feb 2015

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est 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 toute poursuite pénale.

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2014

N° 52

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE
DOCTEUR EN MÉDECINE

Performance diagnostique du génotypage rhésus D fœtal par prise de sang maternelle au premier trimestre de la grossesse

Présentée et soutenue publiquement
le 2 juin 2014

Par

VIVANTI, Alexandre
Né le 29 janvier 1985 à Levallois-Perret

Dirigée par Mme Le Professeur Benachi, Alexandra

Jury :

M. Le Professeur Carbonne, Bruno Président

Mme Le Professeur Senat, Marie-Victoire

M. Le Docteur Costa, Jean-Marc



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Remerciements

A ma Directrice de Thèse, le Professeur Alexandra Benachi. Cela fait maintenant 10 ans que nous nous connaissons. A l'admiration se sont progressivement ajoutés un profond respect et une grande fidélité. Je vous remercie de me guider dans tout ce que j'entreprends. Je vous remercie également pour la confiance que vous me témoignez. Je suis fier du parcours que nous avons fait ensemble et encore plus fier de savoir que la suite se passera à vos côtés. Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de mon profond dévouement.

A mon Président de Jury, le Professeur Bruno Carbonne. Trouvez en ces quelques lignes le témoignage de mon respect. J'ai sincèrement apprécié travailler à vos côtés. Mon passage à Trousseau m'a permis d'aiguiser mon sens clinique.

Au Docteur Jean-Marc Costa. Je vous remercie d'avoir accepté de me confier ce travail qui vous tenait à cœur. J'espère que ce manuscrit sera à la hauteur de vos attentes.

Au Professeur Marie-Victoire Senat. Merci d'avoir aussi spontanément accepté de juger mon travail. Nous nous sommes croisés à maintes reprises mais nous n'avons pas encore eu l'occasion de travailler ensemble. Cela ne saurait tarder !

Aux Docteurs François-Xavier Huchet et Henri Cohen. Merci pour votre aide précieuse quant au recueil des données issues de l'IMM. Vous trouverez dans ce manuscrit les réponses à nos interrogations.

Au Docteur Pierre Durieux. Je vous remercie une fois de plus pour vos conseils avisés sur la méthodologie de mon travail.

Aux Professeurs Marina Cavazzana et Stéphane Blanche, au Docteur Isabelle Andre-Schmutz. Vous m'avez initié à la recherche fondamentale et avez affuté mon sens critique.

Mon passage chez vous a été un grand challenge qui a laissé des traces très positives sur ma façon d'exercer la médecine au quotidien. Je vous en suis très reconnaissant.

Aux Professeurs Jean-Marie Jouannic et Laurent Mandelbrot, au Docteur Patrick Vigé. Merci de m'avoir, à chaque semestre, aussi bien accueilli. Dans vos disciplines respectives, vous m'avez chacun judicieusement apporté une part du médecin que je serai demain.

Au Docteur (et fidèle amie) Sophie Benoît. Tu m'as transmis ta passion pour l'obstétrique. Tu m'as suivi dans tous les bons moments, comme dans les plus difficiles. Je sais pouvoir compter sur toi, tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel. Tu as été, avec Céline, le témoin d'un des plus beaux moments de ma vie. Pour tout ça, je te serai toujours reconnaissant.

A tous les médecins, sage-femmes, infirmières, aide-soignants et universitaires, qui ont contribué à ma formation.

A mes amis médecins et sage-femmes. C'est toujours un plaisir de vous retrouver : Aline, Andrei, Annabelle, Antoine et Marie, Baptou, DLT, Miki, Caroline, Cédric, Céline Tard, Céline Sudriez, Dr Coste, Julie, Julien, Juliette, Linda, Marion, Nathaniel, Steeve, Léa, Federico, Naouel, Valeria...

A mes amis féneloniens : Delphine, Marion, Stéphanie, Capucine, Scarl, JB, Djédjé et Riton. Nous ne nous voyons que trop rarement faute de temps mais je pense souvent à vous.

A mes meilleurs potes : Christophe, Louis et Guillaume. Ne changez pas !

A ma belle famille. Vous m'avez accueilli à bras ouverts. Vous représentez désormais ma famille parisienne !

A mes parents. Le « précieux » est enfin arrivé après tant d'années d'études et d'efforts. Même si la distance avec Cassis n'est pas toujours évidente, vous avez su m'encourager dans tous les domaines de la vie, tant professionnelle que personnelle. Je suis fier de vous ressembler.

A mon frère Julien, à ma belle sœur Audrey. Nous nous sommes beaucoup rapprochés ces dernières années. Il me tarde que votre famille s'agrandisse (la batterie est déjà emballée. Tu l'as choisi).

A mon frère Guillaume. Je suis très heureux que les choses aillent bien dans ta vie. Tu sais que tu peux compter sur nous.

A mon épouse Maud. Il s'est passé tellement de choses depuis notre rencontre. Je suis extrêmement fier d'être ton mari tout comme je suis fier du médecin que tu es devenue. Tu m'épaules quotidiennement et je t'en remercie. Je te remercie également de ton soutien vis à vis de tous les projets professionnels que j'entreprends. Tu m'as offert le plus grand bonheur avec la naissance d'Hugo. Je t'aime.

A mon fils Hugo. Déjà 2 ans... Tu remplis notre maison de bonheur à chaque instant. Je suis heureux de te voir grandir, mais prends ton temps quand même !

Table des matières

Remerciements.....	P2
Table des matières.....	P6
Liste des abréviations et acronymes.....	P9
Liste des tableaux.....	P11
Liste des figures.....	P12
I. Introduction.....	P13
II. Physiologie du système rhésus.....	P15
A. Génomique du système rhésus.....	P15
B. Variabilité phénotypique et antigénique RHD.....	P16
1. Phénotype RHD négatif.....	P16
a. Délétion du gène RHD.....	P16
b. Pseudogène RHD ψ	P17
c. Autres gènes hybrides RHD-CE-D.....	P18
2. Phénotype RHD positif.....	P19
a. Phénotypes D partiels.....	P19
b. Phénotypes D faibles.....	P19
III. Allo-immunisation fœto-maternelle RHD.....	P21
A. Définition.....	P21
B. Epidémiologie.....	P21
C. Situations obstétricales à risque d'AIFM RHD.....	P23
D. Dépistage.....	P24
1. Phénotypage érythrocytaire.....	P24
2. Recherche d'agglutinines irrégulières (RAI).....	P24
3. Test de Kleihauer.....	P26
4. Génotypage fœtal RHD.....	P29
E. Conséquences de l'AIFM RHD.....	P29
1. Conséquences fœtales.....	P29
2. Conséquences maternelles.....	P29
3. Conséquences néonatales.....	P30
F. Prise en charge obstétricale d'une AIFM RHD.....	P32
1. Facteurs de risque d'un retentissement fœtal sévère.....	P32

2. Surveillance d'une patiente immunisée (système RHD).....	P33
a. Surveillance immunologique.....	P34
b. Surveillance échographique.....	P34
c. Surveillance invasive.....	P39
d. Autres méthodes de surveillance non invasives.....	P40
3. Prise en charge thérapeutique d'une anémie fœtale sévère.....	P40
a. Transfusion <i>in utero</i> (TIU)	P40
b. Traitement adjuvant : immunoglobulines polyvalentes.....	P42
c. Extraction fœtale.....	P42
IV. Génotypage RHD fœtal non invasif par prise de sang maternelle au 1 ^{er} trimestre.....	P43
A. Technique.....	P43
1. Matériel biologique : ADN fœtal libre circulant	P43
2. Procédé : amplification génique.....	P44
B. Evaluation du génotypage RHD au 1 ^{er} trimestre de grossesse : revue de la littérature et méta-analyse.....	P46
1. Méthodologie.....	P46
a. Stratégie de la recherche bibliographique.....	P46
b. Sélection des articles.....	P47
c. Analyse qualitative et collection des données.....	P47
d. Analyses statistiques.....	P48
2. Revue de la littérature.....	P49
a. Résultats de la recherche.....	P49
b. Présentation des études et analyse qualitative.....	P49
c. Méta-analyse.....	P52
V. Etude originale de la performance diagnostique du génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle au 1 ^{er} trimestre de la grossesse.....	P54
A. Matériels et méthodes.....	P54
1. Schéma expérimental.....	P54
2. Période d'étude.....	P54
3. Population.....	P54
4. Modalités techniques de réalisation du génotypage fœtal RHD.....	P55

a. Extraction de l'ADN.....	P55
b. Amplification de l'ADN.....	P55
5. Critères d'évaluation.....	P58
6. Procédure de recueil des données.....	P58
7. Analyses statistiques.....	P59
B. Résultats.....	P59
1. Bilan des génotypages RHD.....	P59
2. Corrélation génotype / phénotype.....	P62
3. Méta-analyse.....	P62
C. Discussion.....	P65
VI. Conclusion.....	P71
VII. Bibliographie.....	P73
VIII. Annexes.....	P80

Liste des abréviations et acronymes

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIFM	Allo-immunisation fœto-maternelle
CMV	Cytomégalovirus
CNGOF	Collège national des gynécologues et obstétriciens français
CNRHP	Centre nationale de référence en hématologie périnatale
DPNI	Diagnostic prénatal non invasif
FCS	Fausse couche spontanée
FN	Faux négatif
FP	Faux positif
HAS	Haute Autorité de Santé
hCG	<i>human chorionic gonadotropin</i>
HFM	Hémorragie fœto-maternelle
IC95	Intervalle de confiance à 95%
IFME	Incompatibilité fœto-maternelle
Ig	Immunoglobulines
IMG	Interruption médicale de grossesse
IVG	Interruption volontaire de grossesse
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight</i>

MAP	Menace d'accouchement prématuré
MFIU	Mort fœtale <i>in utero</i>
MHNN	Maladie hémolytique du nouveau-né
MoM	Multiple de la médiane
NABM	Nomenclature des actes de biologie médicale
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PSV-ACM	Pic systolique de vélocité au niveau de l'artère cérébrale moyenne
RAI	Recherche d'agglutinines irrégulières
RCF	Rythme cardiaque fœtal
RHD	Rhésus D
RPC	Recommandations pour la pratique professionnelle
SA	Semaine d'aménorrhée
SMP-1	Small Membrane Protein 1
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SOD	<i>Superoxyde dysmutase</i>
STIC	Soutien aux techniques innovantes et couteuses
TIU	Transfusion in utero
UDG	<i>Uracil DNA glycosylase</i>
UNCAM	Union nationale des caisses d'assurance maladie
VME	Version par manœuvres externes
VN	Vrai négatif
VP	Vrai positif
VPN	Valeur prédictive négative
VPP	Valeur prédictive positive

Liste des tableaux

Tableau 1	Fréquence des haplotypes rhésus en Europe et en Afrique subsaharienne.....	P16
Tableau 2	Adaptation des doses d'immunoglobulines anti-D en fonction du résultat quantitatif du test de Kleihauer.....	P28
Tableau 3	Performances diagnostiques des études portant sur le génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle au 1 ^{er} trimestre de la grossesse.....	P50
Tableau 4	<i>Check-list</i> des biais potentiellement associés aux études de performance diagnostique du génotypage RHD fœtal par prise de sang maternel au 1 ^{er} trimestre de la grossesse.....	P51
Tableau 5	Détail des oligonucléotides et des sondes employées pour le génotypage RHD fœtal au 1 ^{er} trimestre de la grossesse.....	P57

Liste des figures

Figure 1	Mécanisme de délétion du gène RHD.....	P17
Figure 2	Mécanismes à l'origine d'allèles D non fonctionnels.....	P18
Figure 3	Sémiologie échographique de l'anasarque fœtale.....	P30
Figure 4	Aide à l'indication d'un traitement par photothérapie intensive.....	P32
Figure 5	Corrélation entre le pic systolique vélocimétrique au niveau de l'artère cérébrale moyenne et la taux d'hémoglobine fœtale.....	P36
Figure 6	Mesure du pic systolique vélocimétrique au niveau de l'artère cérébrale moyenne.....	P36
Figure 7	Evolution du pic systolique vélocimétrique au niveau de l'artère cérébrale moyenne en fonction du terme de la grossesse.....	P37
Figure 8	Exemple d'algorithme de surveillance et de prise en charge thérapeutique d'une patiente allo-immunisée dans le système RHD.....	P38
Figure 9	Méta-analyse de la performance diagnostique du génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle au 1 ^{er} trimestre de la grossesse.....	P53
Figure 10	Exemples de courbes obtenues par PCR en temps réel.....	P57
Figure 11	Résultats des génotypages RHD fœtaux effectués.....	P61
Figure 12	Indications, terme de prélèvement et nombre des fœtus impliqués/grossesse lors de la réalisation des génotypages RHD fœtaux.....	P61
Figure 13	Corrélation génotypes RHD fœtaux / phénotypes RHD post-nataux.....	P63
Figure 14	Méta-analyse de la performance diagnostique du génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle au 1 ^{er} trimestre de la grossesse incluant les résultats de l'étude originale.....	P64

I. Introduction

Ces 20 dernières années, la prise en charge des situations de conflit immuno-hématologique materno-fœtal a connu de nombreux bouleversements. D'une part, l'amélioration des méthodes de transfusion *in utero* dans les années 1980 (Daffos et al., 1983) a permis de faire chuter la morbi-mortalité liée aux situations obstétricales compliquées d'anémie fœtale (allo-immunisations, infections à parvovirus B19). D'autre part, le perfectionnement des techniques d'échographie et de biologie moléculaire procure aux cliniciens de nouveaux outils améliorant la qualité de la surveillance des situations d'incompatibilité immuno-hématologique. La mortalité périnatale liée aux situations d'anémie fœtale a fortement diminué dans les pays industrialisés.

Le système rhésus regroupe à lui seul la majorité des antigènes capables d'induire une allo-immunisation à risque d'anémie fœtale et/ou de maladie hémolytique du nouveau-né. L'antigène D est responsable d'environ 700 allo-immunisations par an en France même si nous n'avons pas un nombre précis de sujets atteints en l'absence de registre. Aujourd'hui, il est possible, par des techniques de biologie moléculaire, de déterminer le génotype rhésus D (RHD) fœtal chez les patientes de phénotype RHD négatif. Ce dernier présente deux intérêts majeurs :

- Rassurer et limiter le niveau de surveillance des patientes allo-immunisées, écartant le risque d'anémie fœtale en cas de rhésus fœtal D négatif.
- Restreindre l'administration d'une immunoprophylaxie anti-D (ciblée ou systématique) aux seules patientes dont le génotypage fœtal est positif.

De nouvelles techniques de diagnostic prénatal de pathologies génétiques transmissibles ont pu être développées suite à la mise en évidence d'acide désoxyribonucléique (ADN) fœtal libre circulant dans le sang maternel par Denis Lo (Lo et al., 1997). Son application au domaine immuno-hématologique a spécifiquement contribué à la mise au point du génotypage RHD fœtal *in utero* par une prise de sang maternelle, aujourd'hui employé en routine. Ces techniques restent cependant dépendantes de la concentration plasmatique maternelle en ADN fœtal libre circulant, elle-même étroitement

corrélée au terme de la grossesse (Lo et al., 1998). La bonne performance diagnostique du génotypage RHD par prise de sang maternelle dès le 2^{ème} trimestre de la grossesse est aujourd'hui établie (Geifman-Holtzman et al., 2006), toutefois, peu d'études se sont focalisées sur le 1^{er} trimestre.

Ce travail de thèse abordera dans un premier temps la physiologie du système rhésus ainsi que l'allo-immunisation fœto-maternelle spécifique de ce même système. Puis sera effectuée une revue exhaustive de la littérature, associée à une méta-analyse concernant la performance diagnostique du génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle au 1^{er} trimestre de la grossesse. Enfin, une étude originale de performance du génotypage RHD fœtal au 1^{er} trimestre, pratiqué en Ile de France, sera présentée.

II. Physiologie du système rhésus

Le système rhésus fait parti des systèmes immunogènes du groupe sanguin. A la différence du système ABO (qui ne fera pas l'objet d'un développement), l'absence d'un antigène du système rhésus n'est jamais associée à la présence d'anticorps naturels. L'introduction d'antigènes exogènes peut aboutir à la genèse d'une allo-immunisation spécifique caractérisée par l'apparition d'anticorps immuns.

A. Génomique du système rhésus

Le système rhésus est constitué d'un panel d'au moins 48 antigènes dont le chef de file est l'antigène majeur D (RH1), à côté duquel coexistent quatre autres antigènes mineurs (C/RH2, E/RH3, c/RH4 et e/RH5). Ces 5 antigènes sont issus de 2 protéines (RhD et RhCE) codées par 2 gènes fortement homologues (RHD et RHCE) situés sur le bras court du chromosome 1 (1p34-p36). Chacun de ces gènes comporte 10 exons, pour un total de 60 kbases. Ils diffèrent notamment par une délétion de 600 paires de bases portées par l'intron 4 du gène RHD. Positionnés en tête-bêche, ces gènes sont séparés l'un de l'autre par un gène hautement conservé, SMP-1 (Small Membrane Protein 1), codant pour une protéine dont la fonction n'est à ce jour pas encore établie (Wagner et al., 2002).

Le gène RHD est flanqué de 2 séquences, dites « boîtes rhésus », de 9 kbases. Les études phylogénétiques laissent supposer que le gène RHD serait issu de la duplication du gène ancestral RHCE.

Le gène RHCE code pour la protéine RhCE qui comporte les antigènes C ou c et E ou e. Les antigènes RH2 et RH4 ainsi que les antigènes RH3 et RH5 sont antitétiques. Huit haplotypes rhésus sont observables (DCe, DcE, dce, Dce, dCe, dcE, DCE et dCE) dont la répartition en population est variable selon l'origine géographique (**Tableau 1**).

Tableau 1- Fréquence des haplotypes rhésus en Europe et en Afrique subsaharienne			
Haplotypes		Europe	Afrique
DCe	R ¹	42,0%	6,0%
DcE	R ²	14,1%	11,5%
Dce	R ⁰	2,5%	59,0%
DCE	R ^z	0,1%	0%
dCe	R [’]	9,0%	3,1%
dcE	R ^{’’}	1,2%	0%
dce	r	38,8%	20,2%
dCE	r ^y	0%	0%

Les fréquences des haplotypes rhésus objectivées en population générale européenne et africaine sont indiquées en pourcentages. Les haplotypes prépondérants sont figurés en gras. *Source : Chiaroni et al., 2005.*

B. Variabilité phénotypique et antigénique RHD

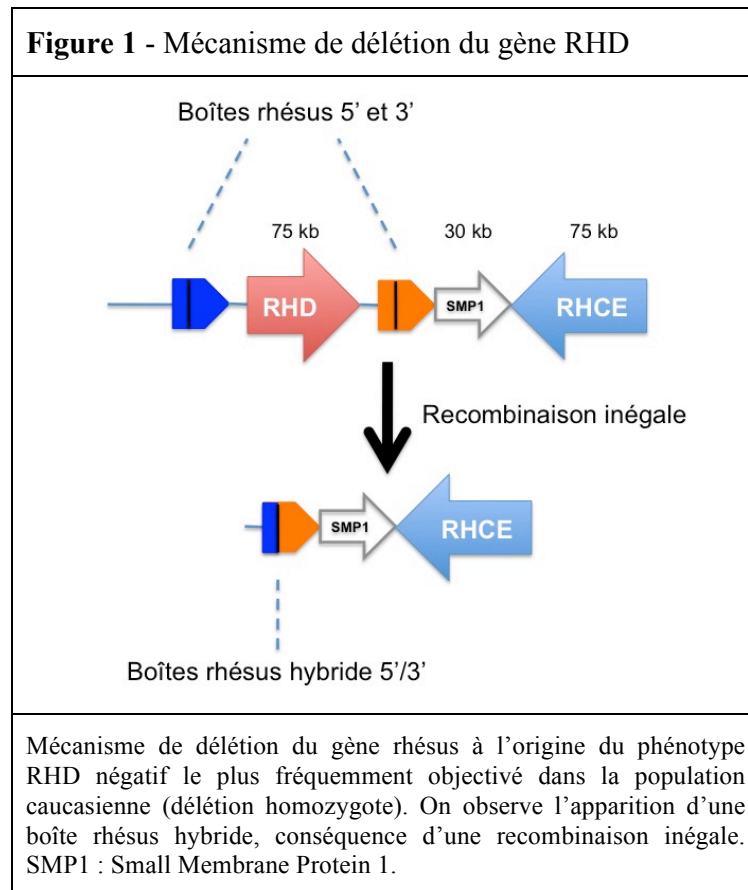
1. Phénotype RHD négatif

Le phénotype RHD négatif est défini par l’absence d’expression de l’antigène D à la surface érythrocytaire. Sa prévalence est variable en fonction de l’ethnie : elle est prépondérante en population caucasienne (15%) et rare en population asiatique (0,1%) (Avent et al., 2000). Les mécanismes génétiques à l’origine du phénotype RHD négatif sont multiples, et également dépendants de l’ethnie. Certains de ces mécanismes contribuent à l’absence de synthèse de protéine RhD alors que le gène RHD reste détectable. Dans ce manuscrit, seront présentés les trois principaux mécanismes.

a. Délétion du gène RHD

La forme classique du phénotype RHD négatif observée dans la population caucasienne est la résultante d’une délétion totale et homozygote du gène RHD (Wagner et al., 2000). L’hémizygotie RHD est observable dans près de 40% des génomes de

caucasiens. L'hypothèse principale de cette délétion est l'existence d'un « crossing-over » (enjambement) inégal à l'origine d'une « boîte rhésus » hybride (**Figure 1**).



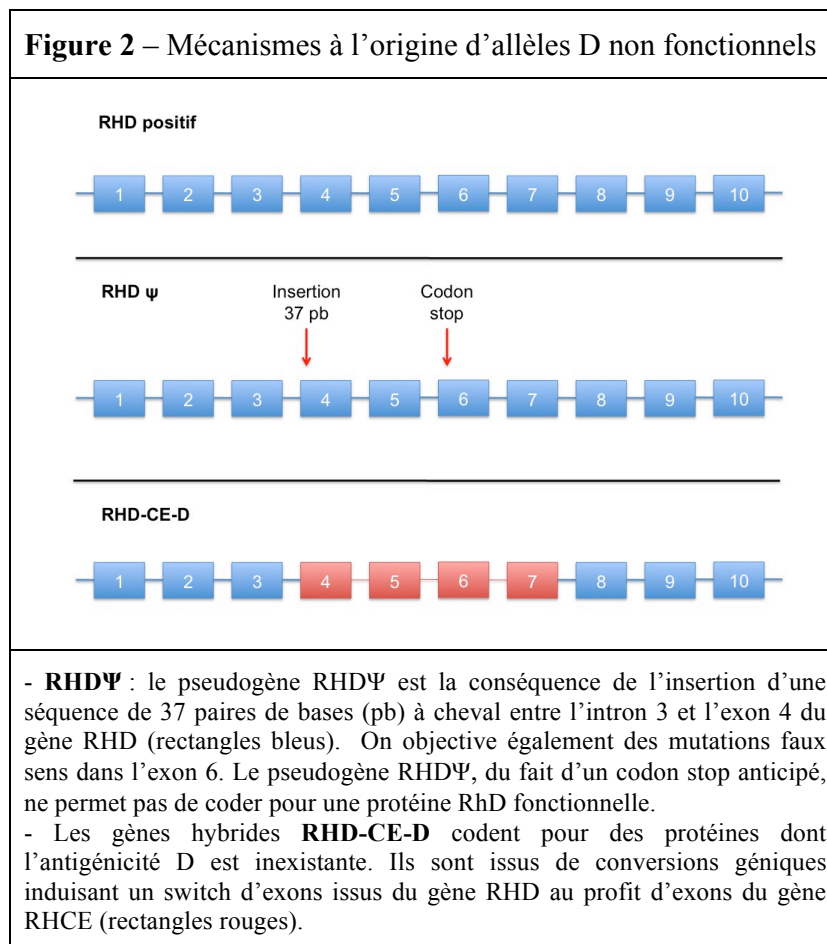
b. Pseudogène RHD ψ

L'absence d'expression de l'antigène D peut également être corrélée à l'existence d'un gène présent mais non fonctionnel. Le pseudogène RHD ψ est le mécanisme prépondérant en population africaine subsaharienne, où la prévalence du phénotype RHD négatif est estimé à 7% (Singleton et al., 2000). Il est caractérisé par l'insertion d'une séquence de 37 paires de bases dans l'exon 4 à l'origine d'un décalage du cadre de lecture. Ce dernier est responsable de l'apparition d'un codon « stop » prématuré. Cette insertion est issue d'une duplication à cheval entre l'intron 3 et l'exon 4 du gène RHD, à laquelle s'ajoute l'existence de mutations faux sens de l'exon 6 (**Figure 2**). En présence d'un

phénotype RHD négatif, l'implication du gène $RHD\psi$ est estimée à plus de 65% dans la population noire subsaharienne et à près de 25% dans la population afro-américaine (Singleton et al., 2000).

c. Autres gènes hybrides RHD-CE-D

D'autres mécanismes génétiques sont impliqués dans la synthèse de protéines RhD dont la spécificité antigénique D est inexistante. On pourra noter l'existence d'un gène hybride RHD-CE-D comprenant les exons 1, 2 et 8 à 10 du gène RHD associés aux exons 4 à 8 du gène RHCE (l'exon 3 peut dériver intégralement du gène RHD ou résulter d'une séquence hybride RHD-RHCE) (**Figure 2**). Ce mécanisme est impliqué dans près de 15% des phénotypes RHD négatifs des patients noirs d'Afrique subsaharienne (Daniels, 2009).



2. Phénotype RHD positif

De nombreux phénotypes RHD positifs variants ont été mis en évidence. Les implications cliniques de l'existence de tels variants dépendent du type de mécanisme incriminé : un avis auprès d'un centre expert en hématologie périnatale est nécessaire afin d'évaluer le risque d'allo-immunisation (ou d'incompatibilité) associé au variant mis en évidence.

a. Phénotypes D partiels

Les variants phénotypiques D partiels sont définis par des modifications qualitatives de l'antigène D. Ces dernières peuvent résulter de mutations ponctuelles faux-sens responsables d'une ou plusieurs substitutions d'acides aminés impliqués dans la détermination de l'épitope antigénique (portion extracellulaire de la protéine RhD). A ce jour, on dénombre plus de 60 variants D partiels par substitutions nucléotidiques (source : <http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/>). Ces modifications de structure sont suffisamment conséquentes pour aboutir à la survenue d'une allo-immunisation en cas d'exposition antigénique chez une patiente RHD positif.

Le mécanisme de conversion génique entre les gènes RHD et RHCE est également impliqué dans la genèse des variants D partiels. Seules les recombinaisons de séquences codantes pour les boucles extracellulaires de la protéine RhD sont sources de variants D partiels (exons 4, 5 et 7). Des mutations faux-sens peuvent également s'ajouter au mécanisme de conversion génique. La survenue d'une allo-immunisation dans ce contexte est cependant moins fréquente.

b. Phénotypes D faibles

Une ou plusieurs mutations faux-sens de triplets codants pour des acides aminés transmembranaires ou intracellulaires sont responsables des phénotypes D faibles. Ceux-ci entraînent une diminution d'expression de la protéine RhD à la surface des érythrocytes, sans modification de l'épitope antigénique D. On dénombre à ce jour plus de 76 variants D

faibles (source : <http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/>). Seuls 3 sont responsables de plus de 90% des variants D faibles observés dans la population caucasienne (type I, II et III). Dans ce contexte, le risque d'allo-immunisation est présent, mais faible : l'avis d'un centre expert est alors nécessaire.

III. Allo-immunisation fœto-maternelle RHD

A. Définition

L'allo-immunisation fœto-maternelle (AIFM) érythrocytaire est définie comme l'apparition d'un (ou plusieurs) anticorps irrégulier(s) anti-érythrocytaire(s) survenant à l'occasion d'une stimulation du système immunitaire, secondaire à un passage d'hématies fœtales dans le compartiment vasculaire maternel. Elle est la conséquence de la mise en présence d'allo-antigènes reconnus comme « non soi » par le système immunitaire maternel.

La répétition des stimulations antigéniques aboutira à une commutation isotypique des immunoglobulines (Ig) de type M, initialement synthétisées, au profit d'Ig de type G, dont l'affinité pour l'allo-antigène sera plus importante. Ces IgG, de faible poids moléculaire, ont la capacité de franchir la barrière fœto-placentaire et sont responsables de toute la symptomatologie de l'incompatibilité fœto-maternelle qui sera détaillée ultérieurement.

B. Epidémiologie

Grâce à sa prévention optimale, l'incidence de l'AIFM RHD dans les pays industrialisés est faible. En France, environ 15% des femmes enceintes sont de phénotype RHD négatif (RPC CNGOF 2005). Près de 10% de ces patientes sont porteuses d'un fœtus de phénotype RHD positif. La prévalence de l'AIFM est passée de 10/1000 femmes enceintes dans les années 70, à 0,9/1000 en 2005. Son incidence est estimée entre 730 et 750 patientes/an. On estime à 10% le risque de formes graves, responsables d'anémies fœtales (moins de 100 cas par an en France). Il s'agit de la deuxième étiologie d'incompatibilité foeto-maternelle érythrocytaire (IFME), devancée par le groupe ABO (5% des grossesses): ce dernier serait responsable de la moitié des ictères hémolytiques néonataux (Murray et al., 2007). Cependant, l'AIFM RHD représente la première cause et la plus sévère des anémies hémolytiques immunologiques néonatales

symptomatiques (Bowman et al., 1997). Les conséquences anténatales des IFME RHD sont potentiellement sévères : la moitié des fœtus impliqués sont symptomatiques dont un quart développeront une anémie sévère. Dans les pays en voie de développement ne possédant pas de programmes de prévention, 14% des grossesses impliquant une IFME RHD se compliquent d'une mort fœtale *in utero* (MFIU) : la moitié des enfants survivants décèdent durant la période néonatale, ou sont victimes de séquelles neurologiques sévères en l'absence de traitement (Zipursky et al., 2011).

L'avènement de la prophylaxie de l'AIFM par injection d'immunoglobulines anti-D (commercialisées en France sous le nom de Rhophylac® à 200 µg ou 300 µg) lors de situations dites à haut risque, a permis de fortement diminuer le risque de développement d'allo-anticorps anti-D en post-partum, passant de 14% en l'absence d'immunoprophylaxie à moins de 2% après administration systématique dans les 72h du post-partum (Fung Kee Fung et al., 2003). Le taux résiduel d'allo-immunisation serait imputable à l'existence d'une AIFM en antepartum en dehors de toute situation à risque, ou à la survenue d'une hémorragie foeto-maternelle (HFM) massive en péripartum (non suffisamment couverte par la dose d'immunoglobulines administrée) (Zipursky et al., 2011). Le test quantitatif de Kleihauer, qui permet de détecter la présence d'anémies fœtales dans le sang maternel (hémorragie foeto-maternelle), est un outil de choix dans la stratégie de prévention du risque d'AIFM dans les situations à risque.

La survenue d'une AIFM lors d'une HFM occulte constitue la majorité (55 à 80%) des immunisations (Chilcott et al., 2002). De nombreux auteurs se sont penchés sur la question de la prévention systématique de l'AIFM par injection d'immunoglobulines anti-D en cours de grossesse. A l'instar des britanniques, le Collège National des Gynécologues-Obstétriciens Français (CNGOF) recommande l'administration systématique d'immunoglobulines anti-D à 28SA, ce qui permettrait de diminuer le taux d'AIFM à 0,1% à 0,7% contre 0,8% à 2,2% lors d'une prévention ciblée seule (RPC CNGOF 2005). Malgré l'existence de ces recommandations, l'administration systématique de produits dérivés du sang (provenant de patients immunisés et rémunérés provenant d'Amérique du nord) reste sujette à controverse dans les pays industrialisés où les taux d'AIFM sont déjà très faibles (grâce à la prévention ciblée). L'émergence de tests de

biologie moléculaire permettant l'identification du RHD fœtal a ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine de la prévention. L'absence de registre ne permet pas d'évaluer la prévalence exacte de l'AIFM ni l'influence des recommandations du CNGOF sur ce chiffre en France.

C. Situations obstétricales à risque d'AIFM RHD

Les situations à risque d'AIFM correspondent à toutes les situations à risque obstétrical d'HFM, impliquant le passage d'hématies fœtales dans la circulation maternelle (RPC CNGOF 2005). Les formes sévères d'HFM exposent au risque d'anémie et/ou de choc hypovolémique fœtal et néonatal. Les HFM peuvent être dépistées à l'aide du test de Kleihauer. Les situations à risque obstétrical d'HFM sont résumées ci-dessous :

Au 1^{er} trimestre :

→ Risque modéré de passage d'hématies fœtales

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

Au 2^{ème} et 3^{ème} trimestres :

→ Risque important de passage d'hématies fœtales

- IMG
- FCS tardive
- MFIU

- Version par manœuvres externes (VME)
- Traumatisme abdominal ou pelvien
- Prélèvement ovulaire : amniocentèse, cordocentèse, placentocentèse
- Accouchement

→ Risque modéré de passage d'hématies fœtales

- Métrorragies
- Cerclage cervical
- Menace d'accouchement prématuré (MAP) nécessitant un traitement

D. Dépistage

1. Phénotypage érythrocytaire

Le phénotypage érythrocytaire complet maternel (ABO, rhésus complet, Kell) fait parti des examens obligatoirement prescrits pendant la grossesse. Il comporte 2 déterminations : une première détermination en anténatal ou en tout début de grossesse ; une deuxième détermination avant le 8^{ème} mois de grossesse. Les 2 déterminations sont nécessaires à l'établissement de la carte de groupe sanguin.

2. Recherche d'agglutinines irrégulières (RAI)

Il s'agit d'un examen immuno-hématologique de routine réglementé, basé sur la détection d'anticorps irréguliers, dirigés contre des antigènes de surface érythrocytaire non présents en temps normal. Une fois détecté, cet anticorps sera identifié. Il sera nécessaire de corréliser l'identification de l'anticorps au phénotypage érythrocytaire de la patiente afin de s'assurer qu'il s'agisse bien d'un allo-anticorps et non d'un auto-anticorps.

Différentes techniques de détection d'agglutinines irrégulières existent. En pratique et en accord avec la législation, les laboratoires utilisent le test de Coombs indirect associé à un test enzymatique. En pratique, le sérum de la patiente est mis en présence d'un panel

d'érythrocytes dont les antigènes de surface sont connus. Lorsque l'on observe l'agglutination des hématies dans un puits, on considère qu'un ou plusieurs de ses antigènes de surface est/sont impliqués. En appliquant une méthode de recouplements, le biologiste est capable d'affirmer l'existence d'un anticorps irrégulier, de l'identifier (spécificité, isotype) et de le titrer.

La surveillance optimale anténatale implique la réalisation d'une RAI en début de grossesse ainsi qu'une recherche mensuelle au cours du dernier trimestre en cas de RHD négatif et/ou en cas d'antécédent transfusionnel. La positivité de l'examen n'a pas systématiquement une valeur péjorative pour le nouveau-né car le risque de complications néonatales dépend de plusieurs facteurs dont la spécificité de l'anticorps, de son isotype (IgM ou IgG), et de sa quantification. Cette dernière peut s'effectuer par 2 méthodes :

- Titrage : la technique de titrage d'anticorps anti-érythrocytaires consiste à tester un plasma ou un sérum (pur et dilué de raison géométrique 2) vis-à-vis d'hématies correspondant à l'anticorps identifié. La technique de référence est le test indirect à l'antiglobuline en tube (arrêté du 26 avril 2002 relatif à l'immuno-hématologie érythrocytaire). Le titre de l'anticorps correspond à la plus forte dilution du sérum provoquant une réaction d'agglutination. Cette technique tient donc compte de la concentration et de l'affinité des anticorps. Elle nécessite d'être réalisée dans un même laboratoire car, lors de chaque titrage, les sérums antérieurs sont repris en parallèle.
- Dosage pondéral : cette technique permet de quantifier plus précisément la concentration des immunoglobulines par une méthode automatisée en flux continu et d'estimer la gravité potentielle de l'immunisation.

Dans un contexte d'AIFM RHD, on estime classiquement qu'un risque d'anémie fœtale est possible à partir d'un titrage supérieur à 1/16 et/ou d'un dosage pondéral supérieur à 3 µg/mL (0,7 µg/mL à terme). D'une façon générale, plus le terme est avancé plus le risque d'anémie fœtale est important pour un faible dosage pondéral d'allo-anticorps anti-D.

Sur le plan maternel, la positivité d'une RAI implique la transfusion de culots globulaires phénotypés après réalisation d'un test de compatibilité, car elle expose au risque d'accident transfusionnel grave. Les conséquences de l'allo-immunisation RHD feront l'objet d'un paragraphe dans ce manuscrit.

3. Test de Kleihauer

Le test de Kleihauer, établi en 1957 (Kleihauer et al., 1957), permet la détection et la quantification des hématies fœtales dans le sang maternel. Il ne s'agit pas d'un test diagnostique de l'AIFM mais d'un test de détection de l'HFM. Il est fondé sur la plus grande résistance de l'hémoglobine F (fœtale) à l'acidité par rapport à l'hémoglobine A. L'hémoglobine F représente plus de 90% de l'hémoglobine totale durant la vie fœtale (Srivorakun et al., 2009). En pratique, il s'agit d'un frottis sanguin réalisé après élution acide et coloration : le biologiste compte les hématies intactes (fœtales) parmi les hématies maternelles lysées, permettant ainsi une estimation du volume de sang fœtal ayant fait irruption dans le compartiment vasculaire maternel. Des tables existent, permettant de corréliser le nombre d'hématies fœtales comptées au volume sanguin fœtal ayant fait irruption dans la circulation maternelle.

Ce test est réalisé à l'occasion de situations à risque d'HFM (citées ci-dessus), et permet de guider l'indication et la posologie de l'administration d'immunoglobulines anti-D chez les patientes RHD négatives (et non antérieurement immunisées). Le **tableau 2** résume l'adaptation des doses d'immunoglobulines à administrer en fonction du résultat du test de Kleihauer (RPC CNGOF 2005).

Le test de Kleihauer, qui n'est pas automatisé, reste soumis à une variabilité intra et inter observateur non négligeable (Duckett et al., 1997). La littérature rapporte également une tendance à la surestimation de l'HFM, voire de faux positifs. Celle-ci s'explique par la modification du profil électrophorétique de l'hémoglobine maternelle : pour près d'un quart des femmes enceintes, le taux d'hémoglobine F s'accroît spontanément à partir de la 8^{ème} semaine d'aménorrhée (SA) pour atteindre son nadir vers la 20^{ème} SA (près de 7% de l'hémoglobine totale) (Kim et al., 2011). Des hémopathies, comme certaines formes de

bêta-thalassémies et la drépanocytose, prédisposent également à une élévation du taux d'hémoglobine fœtale (de l'ordre 10 à 40% de l'hémoglobine totale) (Krauss et al., 1983). Dans ce cas précis, il est préconisé d'employer d'autres tests de détection des hématies fœtales, comme l'analyse par cytométrie en flux. Celle-ci se base sur la détection d'antigènes de surface (D) ou d'antigènes intra-cellulaires (HbF) par des anticorps spécifiques, couplés à différents fluorochromes. La corrélation entre la détection des hématies fœtales par le test de Kleihauer avec la cytométrie en flux est relativement bonne (Radel et al., 2008).

Tableau 2 – Adaptation des doses d'immunoglobulines anti-D en fonction du résultat quantitatif du test de Kleihauer

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	Perfusion sur 4 heures dilué dans 250 ml de NaCl à 9 pour mille
65-84	5	500	3	600	2	600	
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	1000	3	900	
165-184	10	1000	5	1000	4	1200	
185-204	11	1100	6	1200	4	1200	
205-224	12	1200	6	1200	4	1200	
225-244	13	1300	7	1400	5	1500	
245-264	14	1400	7	1400	5	1500	
265-284	15	1500	8	1600	5	1500	
285-304	16	1600	8	1600	6	1800	

Proposition de schéma d'adaptation des doses d'immunoglobulines anti-D à administrer à la patiente en fonction du résultat quantitatif du test de Kleihauer. * La dose la plus basse actuellement commercialisée en France est de 200 mg. Dans les cas où une dose de 100 mg serait suffisante, il est recommandé de ne pas fractionner les doses. HF : hématies fœtales ; HA : hématies adultes ; IV : intra-veineuse. *Source : recommandations pour la pratique clinique, CNGOF 2005.*

4. Génotypage fœtal RHD

Ce test fera l'objet d'un chapitre complet dans la suite de ce manuscrit.

E. Conséquences de l'AIFM RHD

1. Conséquences fœtales

L'AIFM RHD peut se compliquer d'une anémie fœtale, parfois sévère. Le spectre clinique de l'anémie fœtale d'origine immune est non spécifique et s'apparente à celui de l'anémie hémolytique. Les premiers symptômes sont le plus souvent contemporains du second trimestre. Lorsque l'anémie fœtale est sévère (< 7 à 9 g/dL), on observe un tableau d'anasarque fœtale (syndrome œdémateux généralisé associant œdème sous-cutané et diversement : épanchement péricardique, pleural ou ascite), signant une insuffisance cardiaque globale décompensée, stade avancé de la maladie (**Figure 3**). L'incompatibilité rhésus peut aboutir, à un stade ultime, à une MFIU.

2. Conséquences maternelles

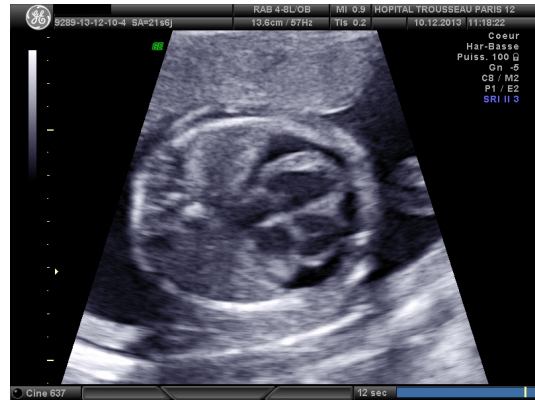
L'AIFM RHD n'a pas d'impact clinique maternel. La conséquence majeure est la difficulté transfusionnelle potentielle nécessitant impérativement la transfusion de culots globulaires phénotypés et la réalisation d'un test de compatibilité pré transfusionnel (afin d'éviter un accident hémolytique transfusionnel). C'est la raison pour laquelle le rapprochement des RAI est effectué à proximité de l'accouchement.

Figure 3 – Sémiologie échographique de l'anasarque fœtale

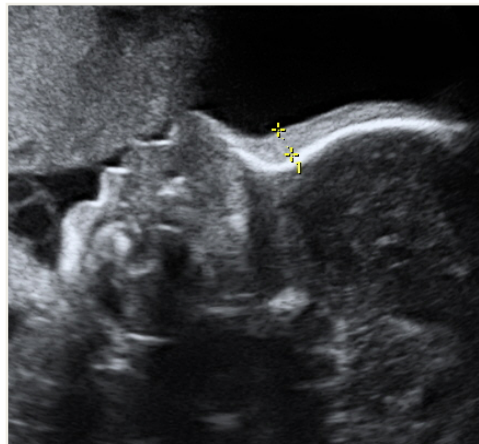
3a : ascite



3b : épanchement péricardique



3c : œdème préfrontal



L'anasarque fœtale (syndrome œdémateux généralisé) représente un stade avancé de l'anémie fœtale profonde et associe un œdème préfrontal (figure 3c) à au moins un épanchement d'une des trois séreuses : ascite (figure 3a), épanchement péricardique (figure 3b) ou pleural ; ou bien un épanchement d'au moins 2 séreuses.

3. Conséquences néonatales

Durant la période néonatale, L'IFME peut se traduire par une anémie hémolytique associant à divers degrés : pâleur, ictère cutanéomuqueux, hépatosplénomégalie et anasarque (maladie hémolytique du nouveau-né : MHNN). L'hémolyse est détectée en post-partum immédiat par la réalisation d'un test de Coombs direct (test direct à

l'antiglobuline) et par une élution des érythrocytes. Dans les cas extrêmes, l'anémie est sévère et nécessite un soutien transfusionnel. L'ictère à bilirubine libre est souvent intense et précoce, et peut se compliquer d'un ictère nucléaire, à haut risque de séquelles cérébrales et/ou de surdité par atteinte des voies auditives.

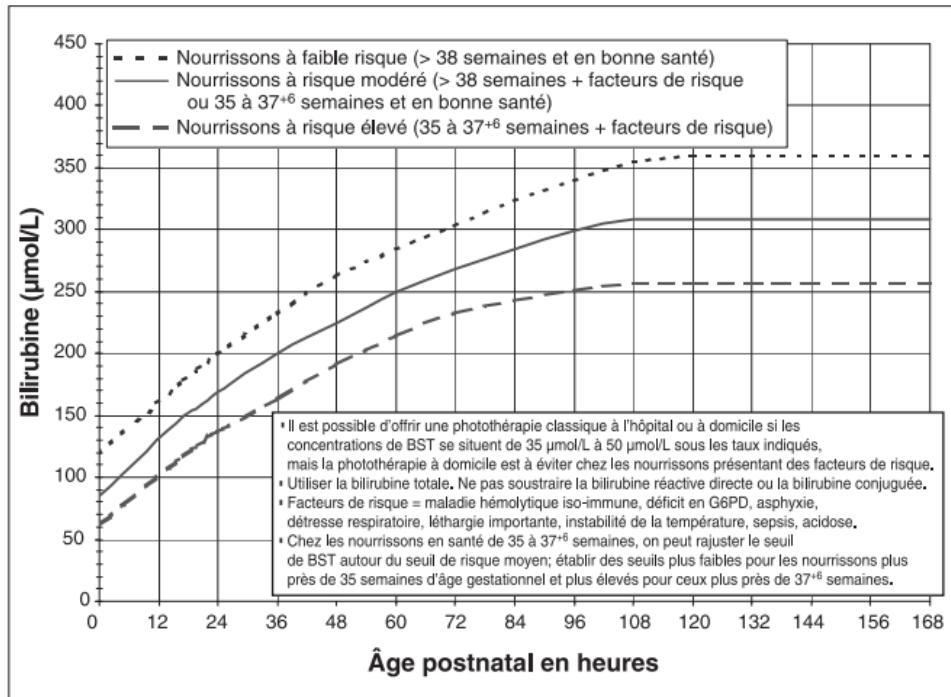
Un traitement par photothérapie est mis en place en fonction du taux de bilirubinémie (le seuil de toxicité potentiel est corrélé au terme de naissance ainsi qu'à l'âge du nourrisson, et à l'existence de comorbidités ; **figure 4**). Il consiste en une photo-isomérisation de la bilirubine libre en isomères hydrosolubles, facilement excrétés par voie urinaire, sous l'effet d'un rayonnement violet-bleu.

En cas d'échec de la photothérapie (et / ou en cas d'ictère d'emblée sévère), on peut avoir recours à l'exsanguino-transfusion qui possède un quadruple intérêt :

- Elimination des érythrocytes non compatibles (porteurs de l'antigène D)
- Epuration des complexes érythrocytes / allo-anticorps maternels
- Elimination de la bilirubine libre
- Correction immédiate et pérenne de l'anémie avec des érythrocytes immunocompatibles (RHD négatifs)

D'autres traitements, que nous ne détaillerons pas dans ce manuscrit, s'ajoutent à l'arsenal thérapeutique de la MHNN : alimentation et hydratation adaptées, injections d'Ig polyvalentes, drogues (phénobarbital, métalloporphyrines), albumine (Cortey et al., 2012).

Figure 4 - Aide à l'indication d'un traitement par photothérapie intensive



Evolution des taux de bilirubinémie (µmol/L) acceptables en fonction de l'âge néonatal (H). Trois courbes sont figurées : nourrissons à faible risque, à risque modéré et à risque élevé. Source : American Academy of Pediatrics Subcommittee on Hyperbilirubinemia, 2004

F. Prise en charge obstétricale d'une AIFM RHD

1. Facteurs de risque d'un retentissement fœtal sévère

En contexte d'une AIFM RHD, un certain nombre de paramètres sont à appréhender pour définir une situation à risque obstétrical:

- Le type d'anticorps irrégulier, incluant :
 - o La spécificité antigénique : les immunisations anti-D, c et Kell sont les plus pourvoyeuses de retentissement fœtal. Dans ce chapitre, nous ne traiterons que des AIFM RHD.

- L'isotype : les IgG, issues de la conversion isotypique des IgM (favorisée par un 2^{ème} contact antigénique : 2^{ème} grossesse), diffusent à travers la barrière hémato-placentaire, et font partie de la seule classe d'anticorps capable de provoquer une anémie fœtale.
- Le phénotype du procréateur : il permet d'évaluer le risque potentiel pour le fœtus de la grossesse d'être porteur de l'antigène D. Lorsque le procréateur est de phénotype RHD positif, l'anamnèse donne des informations quant au génotype : un couple ayant déjà un enfant de phénotype RHD négatif implique un génotype paternel RHD hétérozygote, réduisant le risque de transmission à ½. Des fréquences d'hétérozygotie sont également rapportées en fonction du phénotype et de l'ethnie du procréateur ainsi que du nombre d'enfants de la fratrie ayant un phénotype RHD positif (Moise et al., 2008). Il est à noter que certaines équipes s'affranchissent du phénotype du conjoint, ce dernier n'étant pas systématiquement le procréateur.
- Les antécédents obstétricaux de la patiente : par analogie à la transfusion (Zalpuri et al., 2011), la sévérité du retentissement fœtal de l'allo-immunisation pourrait être corrélée aux nombres de grossesses incompatibles précédentes. En pratique clinique, on considère que les conséquences d'une IFME d'une grossesse seront au moins aussi sévères et d'apparition plus précoces que lors de la grossesse précédente (ACOG, 1996). On peut émettre l'hypothèse d'une maturation de l'affinité des IgG avec la multiplicité des contacts antigéniques spécifiques.

2. Surveillance d'une patiente immunisée (système RHD)

La surveillance d'une patiente allo-immunisée est avant tout fondée sur la détection et le retentissement d'une anémie fœtale sévère. Le clinicien qui suit la patiente devra bien connaître les signes à rechercher chez le fœtus en fonction de l'évolution des anticorps maternels.

a. Surveillance immunologique

Comme vu précédemment, la surveillance immunologique d'une patiente allo-immunisée nécessite l'identification de l'allo-anticorps, suivie de sa quantification par titrage et/ou dosage pondéral. La fréquence de la surveillance biologique dépend de l'âge gestationnel ainsi que de la quantification de l'allo-anticorps impliqué.

b. Surveillance échographique

La surveillance échographique occupe une place prépondérante. Sa fréquence peut être hebdomadaire (voire quotidienne) en cas de haut risque d'anémie fœtale sévère. L'opérateur s'attachera à rechercher des signes de sévérité rentrant dans le cadre d'une anasarque (**Figure 3**). En 1990, l'existence d'une corrélation entre anémie fœtale et augmentation du pic systolique de vélocité au niveau de l'artère cérébrale moyenne (PSV-ACM) a été mise en évidence (Vyas et al., 1990). Cependant, les années 2000 ont constitué un tournant dans le monitoring non invasif des fœtus de patientes allo-immunisées (Mari et al., 2000). L'augmentation du PSV-ACM serait corrélée à une augmentation du débit sanguin cardiaque ainsi qu'à une diminution de la viscosité du sang chez les patientes atteintes d'anémie sévère (Rosenkratz et al., 1982). De la même façon, le PSV-ACM est inversement proportionnel au taux d'hématocrite (Mari et al., 1997 ; **Figure 5**).

La réalisation d'une mesure Doppler du PSV-ACM doit répondre à des critères stricts :

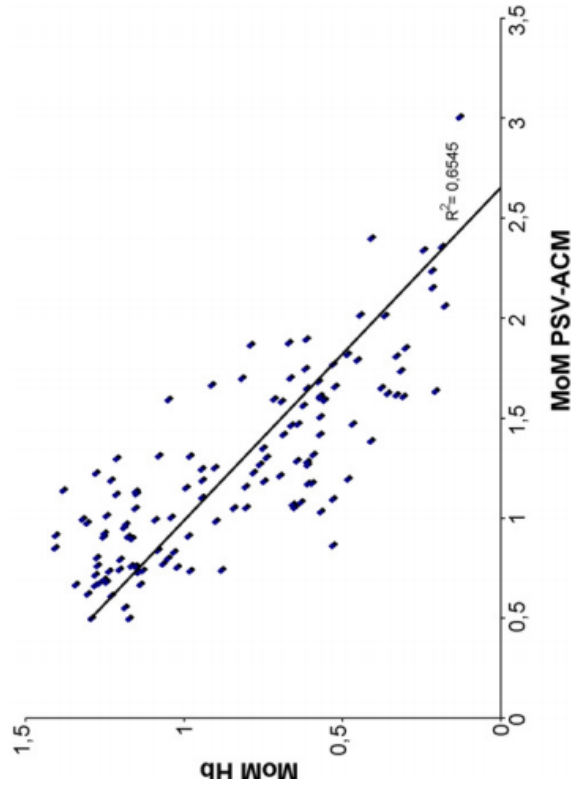
- Limiter la compression de la tête fœtale avec la sonde d'échographie.
- Éviter une mesure lors de mouvements fœtaux ou maternels.
- Obtenir une coupe cérébrale axiale incluant les thalami ainsi que le cavum du *septum pellucidum*.
- Visualiser le polygone de Willis en mode Doppler couleur ou énergie.
- Effectuer une mesure Doppler à l'origine de l'ACM (tiers proximal ; à proximité de l'artère carotide interne) (**Figure 6**).

- Obtenir un angle incident formé par le tir Doppler et l'ACM proche de 0° (**Figure 6**).
- Réaliser plusieurs tirs Doppler.

Le PSV-ACM, augmentant avec l'âge gestationnel, sera exprimé en valeur multiple de la médiane (MoM). Une valeur supérieure à 1,5 MoM est suspecte d'anémie fœtale modérée à sévère (**Figure 7**) : sensibilité = 100% (Intervalle de confiance à 95% - IC₉₅ [86 ; 100]), taux de faux positifs = 12%, valeur prédictive positive (VPP) = 65%, valeur prédictive négative (VPN) = 100% (Mari et al., 2000), ce qui fait de la mesure du PSV-ACM un bon test de dépistage. Carbonne et al. ont objectivé une sensibilité de 86,7%, associée à un taux de faux positifs de 12,2%, ainsi qu'une VPN de 97,8% (Carbonne et al., 2008). La bonne performance diagnostique de la mesure du PSV-ACM dans une autre situation à risque d'anémie fœtale (infection à parvovirus B19) a également été légitimée (Cosmi et al., 2012).

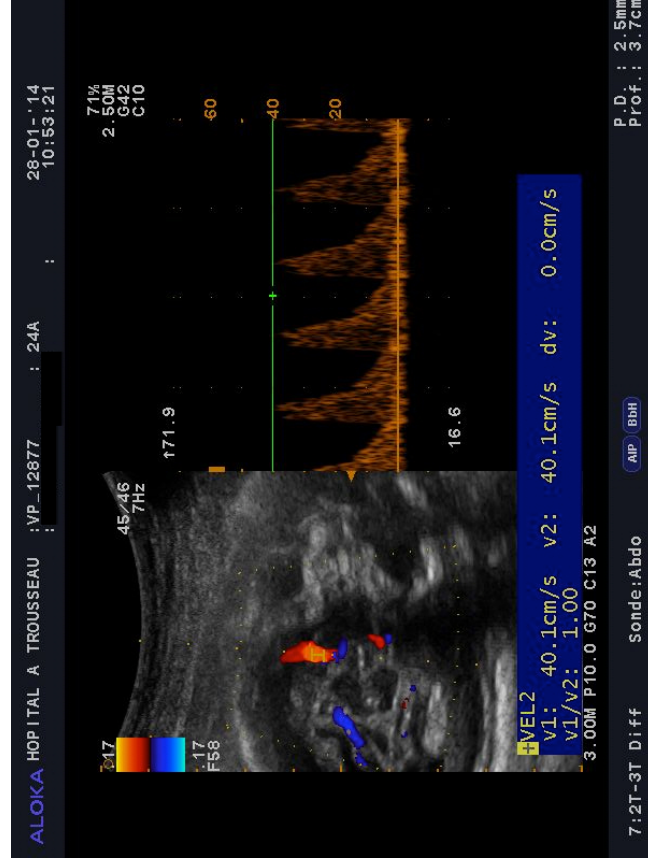
La fréquence de la surveillance par mesure Doppler du PSV-ACM dépend de la gravité potentielle de l'immunisation, elle-même dépendant du type d'allo-anticorps et de son dosage. L'algorithme de surveillance doit tenir compte des valeurs antérieures du PSV-ACM pouvant signer une aggravation en cours lorsque la pente de la courbe de surveillance devient raide. Lorsque la situation est à haut risque d'anémie fœtale sévère, la surveillance échographique sera rapprochée (hebdomadaire à quotidienne).

Figure 5 – Corrélation entre le pic systolique vélocimétrique au niveau de l'artère cérébrale moyenne et la taux d'hémoglobine foetale



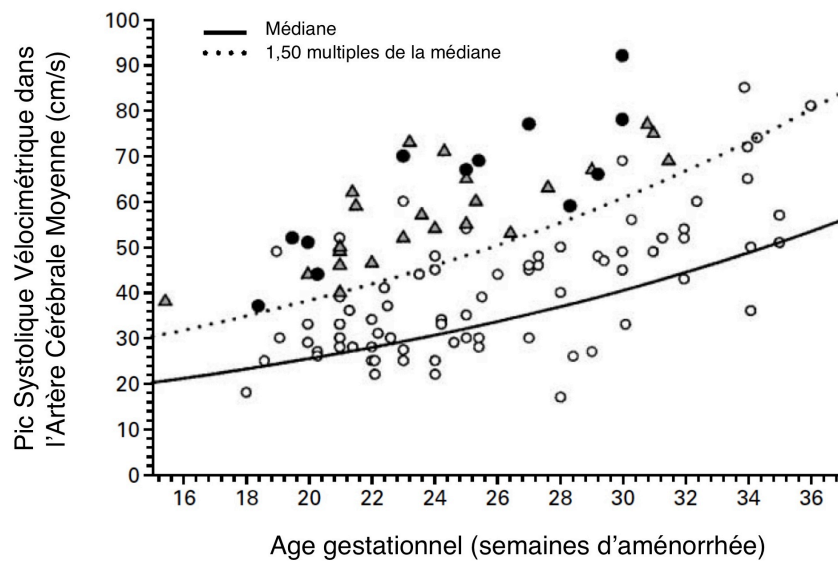
Evolution du taux d'hémoglobine (exprimé en multiples de la médiane – MoM) en fonction du pic systolique vélocimétrique au niveau de l'artère cérébrale moyenne (PSV-ACM exprimé en MoM). $R^2 = 0,6545$; $p < 0,001$. Valeur prédictive négative = 97,8%. Source : Carbonne *et al.*, 2008.

Figure 6 – Mesure du pic systolique vélocimétrique au niveau de l'artère cérébrale moyenne



La mesure du pic systolique vélocimétrique au niveau de l'artère cérébrale moyenne (ACM) nécessite un angle incident proche de 0°. Le *caliper* doit être positionné au niveau du 1/3 proximal de l'ACM.

Figure 7 – Evolution du pic systolique vélocimétrique au niveau de l'artère cérébrale moyenne en fonction du terme de la grossesse

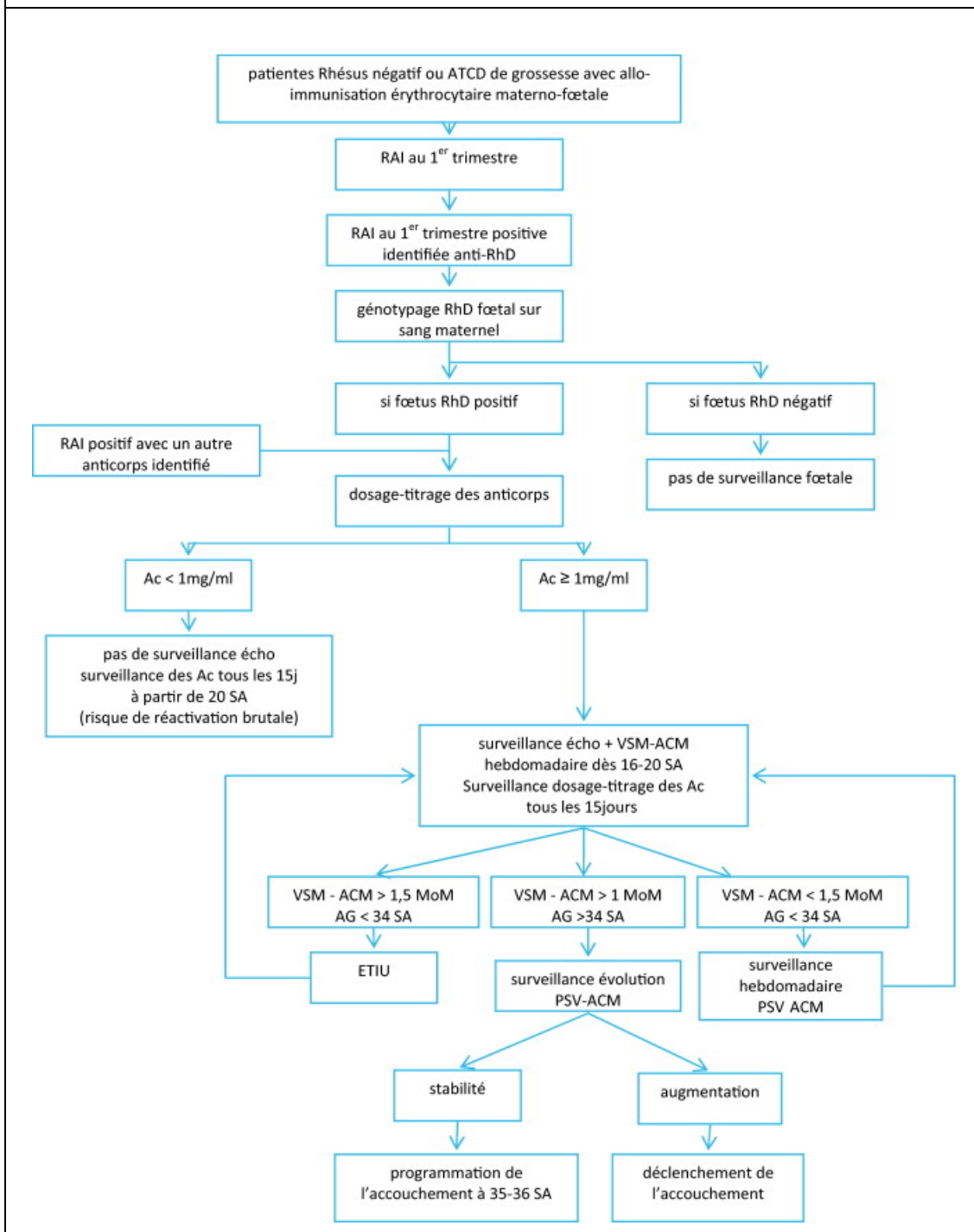


Evolution du pic systolique vélocimétrique au niveau de l'artère cérébrale moyenne (PSV-ACM en cm/s) en fonction du terme de la grossesse (SA). Les pictogrammes représentent une mesure du PSV-ACM pour chaque fœtus en fonction d'une situation obstétricale donnée :

- Cercles blancs : pas d'anémie ou anémie modérée ($> 0,65$ multiples de la médiane du taux d'hémoglobine – MoM).
- Triangles gris : anémie modérée à sévère ($< 0,65$ MoM du taux d'hémoglobine).
- Cercles noirs : anémie compliquée d'anasarque fœtale.

La courbe continue représente la moyenne du PSV-ACM. La courbe en pointillés représente le seuil de 1,5 MoM du PSV-ACM. *Source : Mari et al., 2000*

Figure 8 – Exemple d’algorithme de surveillance et de prise en charge thérapeutique d’une patiente allo-immunisée dans le système RHD



Exemple de modalités de surveillance et de prise en charge d’une patiente pour allo-immunisation. AG : âge gestationnel (exprimé en semaine d’aménorrhée – SA) ; Ac : anticorps ; ETIU : exsanguinotransfusion *in utero*. Source : Hermann et al. 2011.

c. Surveillance invasive

Les modalités de surveillance suivantes sont décrites à titre indicatif. La biliamnie n'est plus employée. L'obtention du taux d'hémoglobine par ponction de sang fœtal n'est plus qu'exceptionnellement réalisée en raison de l'amélioration des techniques de surveillance échographique.

- *Concentration de la bilirubine dans le liquide amniotique*

Devenue anecdotique, la mesure de la concentration de la bilirubine dans le liquide amniotique, par amniocentèse, permettait d'estimer de façon indirecte le degré de sévérité d'une anémie fœtale en contexte hémolytique (Liley, 1961) avant l'avènement du monitoring non invasif. Celle-ci était effectuée par mesure de la densité optique du liquide amniotique à 450 nm par spectrophotométrie. L'interprétation était réalisée à l'aide du diagramme de Liley, permettant de stratifier les risques liés à l'anémie fœtale en fonction de la densité optique de liquide amniotique (et d'orienter la surveillance et la prise en charge de ces fœtus). L'indication de l'amniocentèse devait être pesée : outre les risques obstétricaux, la multiplication des prélèvements amniotiques exposait les patientes à l'aggravation de leur allo-immunisation par la favorisation des hémorragies foeto-maternelles.

- *Taux d'hémoglobine obtenu par cordocentèse*

Il s'agit du seul test diagnostique. Celui-ci est réalisé par ponction de sang fœtal trans-abdominale échoguidée (Daffos et al., 1983) et doit s'inscrire systématiquement dans le cadre du bilan pré-transfusionnel. La ponction de sang fœtal doit être réalisée dans un bloc opératoire, étant à risque de complications nécessitant une extraction fœtale en urgence par césarienne (les risques sont similaires à ceux de la transfusion *in utero*, détaillés plus loin).

d. Autres méthodes de surveillance non invasives

- *Surveillance clinique*

Signe tardif, la diminution des mouvements actifs fœtaux peut être symptomatique d'une anémie fœtale sévère à très sévère.

- *Surveillance du rythme cardiaque fœtal (RCF)*

L'apparition d'anomalies du RCF est mal corrélée à la sévérité de l'anémie. Le tracé classique du rythme cardiaque sinusoïdal est pathognomonique d'un état *pre mortem* mais ne possède cependant pas une bonne sensibilité dans le cadre d'une anémie fœtale sévère (Modanlou et al., 2004). De ce fait, la surveillance du RCF ne peut pas être incluse dans le monitoring des patientes allo-immunisées.

3. Prise en charge thérapeutique d'une anémie fœtale sévère

a. Transfusion *in utero* (TIU)

Le premier succès de TIU rapporté dans la littérature date du début des années 1960 à Auckland (Liley, 1963). Il s'agissait d'une patiente enceinte de 32 SA en état d'allo-immunisation RHD avec un titrage d'anticorps anti-D à 1/128 et une densité optique du liquide amniotique compatible avec une hémolyse fœtale sévère. La TIU de 100 mL de sang RHD négatif, compatibilisé avec le phénotype maternel, a été effectuée par voie intrapéritonéale, sous contrôle scopique, 5 heures après injection intra-amniotique d'un produit de contraste iodé. La grossesse a été poursuivie jusqu'à 34 SA et le nouveau-né a bénéficié, avec succès, d'une prise en charge néonatale respiratoire associée à 2 exsanguino-transfusions.

- *Modalités techniques*

La voie intra-péritonéale est aujourd'hui désuète en dehors de rares indications de TIU très précoces (avant 20 SA), ou de difficultés techniques à l'abord funiculaire. La ponction veineuse est systématiquement réalisée sous contrôle échographique par voie trans-abdominale. Un abord de la veine ombilicale à son insertion placentaire est préférable. La ponction est effectuée sous condition d'asepsie chirurgicale, idéalement dans un bloc obstétrical, en raison du risque potentiel d'extraction chirurgicale (Van Kamp et al., 2005). Les principales complications du geste sont non spécifiques et se rapprochent de celles de l'amniocentèse (chorioamniotite, rupture prématurée des membranes, impact délétère sur l'allo-immunisation) et de la cordocentèse (MFIU, anomalie du rythme cardiaque fœtal, hématome funiculaire).

Dans un premier temps, l'anémie doit être confirmée par mesure du taux d'hémoglobine par un test de chevet (Hemocue®). Le sang transfusé doit répondre à des critères stricts : phénotypé, irradié (empêche une réaction de type greffon contre l'hôte), cytomégalovirus (CMV) négatif et concentré (pour limiter le risque de surcharge volémique). La surveillance post-transfusionnelle sera effectuée à l'aide de la mesure régulière du PSV-ACM, qui reste un critère de mesure pertinent (Hermann et al., 2011), malgré une diminution de la sensibilité proportionnelle au nombre de TIU (Scheier et al., 2006).

- *Choix de la méthode : transfusion ou exsanguino-transfusion ?*

La prise en charge néonatale en situation d'allo-immunisation symptomatique fait souvent appel à l'exsanguino-transfusion dont les bénéfices ont été évoqués précédemment. Par analogie, de nombreuses équipes obstétricales se sont tournées vers ce type de soutien transfusionnel qui est aujourd'hui remis en cause au profit d'une transfusion simple. L'équipe du Centre National de Référence en Hémodiagnostic Périnatale (CNRHP) a comparé ces deux techniques et rapporte un délai similaire entre deux procédures et une cinétique de chute du taux d'hémoglobine comparable. Cependant, la durée de la

procédure d'exsanguino-tranfusión est décrite comme supérieure (Garabedian et al., communication orale, JFROG 2013).

b. Traitement adjuvant : immunoglobulines polyvalentes

L'administration fœtale d'Ig polyvalentes au cours de la procédure de TIU s'avérerait efficace en terme de cinétique de diminution de l'hématocrite post transfusionnelle (Deka et al., 2013), mais n'aurait pas d'impact sur le risque de mortalité périnatale ainsi que sur le développement neurologique durant l'enfance (Dooren et al., 1994). Un autre auteur réserve son indication aux fœtus les plus sévèrement anémiés (Voto et al., 1997). Le mode d'action des Ig polyvalentes n'est pas encore élucidé. Elles pourraient agir via un antagonisme des récepteurs Fc à la surface des macrophages, réduisant ainsi la phagocytose des hématies couplées aux anticorps anti-D (Hammerman et al., 1996).

c. Extraction fœtale

En l'absence d'anémie fœtale, il est généralement admis qu'en situation d'allo-immunisation (et de fœtus génotypé RHD positif), la naissance doit être provoquée après 38 SA. En situation d'anémie fœtale, la question de l'extraction se pose lorsque le stade de la grande prématurité (32SA) a été franchi. L'issue néonatale semble être favorable lorsque les fœtus ont bénéficié d'un soutien transfusionnel *in utero*, et même après 32SA (Klumper et al., 2000). A fortiori, l'extraction fœtale dans un contexte d'anasarque est grevée d'un pronostic très sombre et nécessite au préalable une prise en charge *in utero* rapide. Entre 32 et 34SA, l'équipe du CNRHP recommande une prise en charge *in utero* (TIU), lorsque les conditions techniques locales sont favorables.

IV. Génotypage RHD fœtal non invasif par prise de sang maternelle au 1^{er} trimestre

A. Technique

Les premiers résultats de génotypages non invasifs du rhésus fœtal ont été rapportés par l'équipe de Denis Lo au début des années 1990 (Lo et al., 1993). Comme nous l'avons vu précédemment, la grande majorité des phénotypes RHD négatifs est liée à une délétion du gène RHD. Cette technique se base donc sur la détection, dans le sang maternel, de la séquence codante, possiblement déléetée chez les patientes RHD négatives.

1. Matériel biologique : ADN fœtal libre circulant

La présence d'ADN fœtal libre circulant a été démontrée par le biais du génotypage du gène SRY (Lo et al., 1997). Elle est basée sur la détection par réaction en chaîne par polymérase (PCR) de la séquence codant pour le gène SRY, issue du chromosome Y, dans le sang maternel, à partir de la 12 SA (fœtus de sexe masculin). Des travaux plus récents font état de la détection d'ADN fœtal circulant dès le 18^{ème} jour de gestation, avant même que la circulation fœtale ne soit établie (Guibert et al., 2003). Ces résultats suggèrent l'origine trophoblastique de l'ADN fœtal libre circulant, d'autant plus que la concentration estimée en cellules fœtales dans le sang maternel est très faible : de l'ordre de 1 cellule/mL (Bianchi et al, 1999). La concentration en ADN fœtal libre circulant dans le sang maternel est proportionnelle à l'âge gestationnel (Lo et al., 1998) et également au taux d'hormone humaine chorionique gonadotrophine (hCG) plasmatique.

Il s'agit donc d'une cible potentielle de choix dans les stratégies de détection non invasive d'anomalies géniques et/ou chromosomiques fœtales. Il existe néanmoins une contrainte majeure, liée à l'absence de distinction possible entre le matériel génétique d'origine maternelle et fœtale. Le répertoire des anomalies détectables à ce jour est donc constitué par des séquences d'ADN absentes ou différentes du génome maternel : les principales applications en routine sont la détermination du sexe fœtal et du rhésus fœtal

(RHD, puis plus récemment Kell). Une application développée plus récemment est la détection des principales aneuploïdies (trisomie 13, 18 et 21) par séquençage massif en parallèle (Ehrich et al., 2011) ; procédé employé depuis peu en soins courants. Nous ne développerons pas cette application dans ce manuscrit.

2. Procédé : amplification génique

L'amplification des séquences cibles par PCR constitue la méthode de choix. Elle permet d'obtenir de multiples copies d'ADN provenant d'une séquence spécifique. En effet, il s'agit d'une méthode peu onéreuse ayant une sensibilité suffisante. De plus, les fractions de matériel génomique fœtal sont limitées : l'ADN fœtal libre circulant représente 3 à 6% de l'ADN libre total dans le sang maternel (Lo et al., 1998), ce qui représente 20 à 30 copies/mL de sérum au premier trimestre.

Plusieurs types de PCR existent. Les grandes modalités de leurs réalisations sont similaires et sont fondées sur les propriétés d'hybridation des brins complémentaires d'ADN. Les échantillons cibles sont mis en présence de couple(s) d'amorces spécifique(s), d'ADN polymérases thermostables et de desoxyribonucléotides. Les étapes de réalisation d'une PCR comportent (description générique pour de l'ADN double-brin) :

- Etape de dénaturation : on procède à une augmentation de la température pendant une durée donnée (en principe 95°C pendant 1 minute). Cela permet de lever l'hybridation des deux brins d'ADN complémentaires et d'interrompre les éventuelles polymérases naturelles.

- Etape d'hybridation : la température est descendue (aux alentours de 45°C) ce qui permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux séquences cibles.

- Etape d'élongation : la température est remontée (1 à 2 minutes à 72°C). Les polymérases en présence sont capables de synthétiser un néo-brin complémentaire de l'ADN matrice, à partir des amorces sens et anti-sens.

A l'issue de ce premier cycle, on obtient 4 brins d'ADN : 2 brins d'ADN complémentaires (spécifiques des sondes choisies) issus des 2 brins matrices. Les cycles sont multipliés afin d'amplifier, de façon exponentielle, les séquences d'ADN cible.

En médecine prénatale, les quantités d'ADN cible sont infimes. La négativité d'une PCR peut s'expliquer par différents mécanismes :

- Vrai négatif
- Faux négatif par :
 - Défaut de procédure
 - Défaut d'extraction de l'ADN
 - Présence d'enzymes dégradantes : contamination par des DNases
 - Absence d'ADN fœtal (ou insuffisance de matériel compte tenu de la sensibilité de la technique d'amplification employée)

L'incorporation de points de contrôle apparaît donc essentielle : travail en système clos, nettoyage des paillasse par des inhibiteurs de DNases, contrôles internes de la procédure de PCR (témoins négatifs, témoins positifs, témoins de l'extraction d'ADN). L'utilisation de contrôles positifs spécifiques de l'extraction de l'ADN fœtal libre circulant est un challenge pour les années à venir. Des équipes ont décidé d'amplifier le gène SRY, uniquement positif chez les fœtus de sexe masculin (Rijnders et al., 2004 ; Zhou et al., 2005 ; Daniels et al., 2006 ; Dricot et al., 2006). Certains auteurs suggèrent la possibilité d'y adjoindre l'étude de différents polymorphismes qui seraient spécifiques de l'ADN fœtal (Zhou et al., 2005 ; Daniels et al., 2006). Les différences de profils de méthylation de l'ADN en fonction de l'origine fœtale ou maternelle sont également une piste dans l'identification de l'origine de l'ADN (Chan et al., 2006 ; Tsui et al., 2010 ; White et al., 2012). Ces techniques expérimentales complexes ne peuvent pas se prêter, à ce jour, à un usage en routine.

Nous décrirons dans ce manuscrit la méthode d'amplification spécifiquement employée dans le cadre du protocole évalué par la suite. Il s'agit d'une recherche d'une séquence d'ADN dérivée du gène RHD (exon 10) par PCR en temps réel. Le contrôle des contaminations éventuelles est optimisé : PCR «en temps réel» (système fermé) et

inactivation enzymatique (UDG). Un contrôle d'extraction et de détection d'inhibiteurs par co-extraction et amplification d'un ADN hétérologue est également effectué. Cette technique a déjà fait l'objet d'une évaluation clinique, indépendante du terme de grossesse : en population caucasienne, on a noté une sensibilité et une spécificité de 100% (Gautier et al., 2005).

B. Evaluation du génotypage RHD au 1^{er} trimestre de grossesse : revue de la littérature et méta-analyse

A ce jour, plus d'une quarantaine d'études ont évalué la performance diagnostique du génotypage RHD, indépendamment du terme de grossesse (revue par Zhu et al., 2014). La plupart de ces études ont été réalisées chez des patientes non immunisées. On objective une sensibilité globale supérieure à 95%. Seules 3 études se sont spécifiquement focalisées sur le 1^{er} trimestre de la grossesse (Costa et al., 2002 ; Cardo et al., 2010 ; Akolekar et al., 2011). Or, comme vu précédemment, le 1^{er} trimestre est une période où la fraction d'ADN fœtale libre circulante est la moins élevée, exposant au risque accru de faux négatifs. Nous proposons une revue exhaustive de la littérature des études rapportant des cas de génotypages RHD fœtaux au 1^{er} trimestre de grossesse. Ce travail complète l'avis sur les actes émis par la HAS en 2011.

1. Méthodologie

a. Stratégie de la recherche bibliographique

Une analyse de la littérature a été effectuée à l'aide des principales bases de données médicales en ligne (Cochrane Database, Google Scholar et Pubmed). Les données de la littérature grise n'ont pas été retenues. Les mots clés suivants ont été utilisés de façon indépendante ou combinés entre eux :

- *Fetal rhesus determination*
- *Alloimmunization*
- *Circulating cell free fetal DNA*

- *Non-invasive genotyping*
- *Polymerase chain reaction*

b. Sélection des articles

Les abstracts, de langue anglophone ou francophone, issus de cette recherche ont ensuite été lus afin de déterminer si les articles associés répondaient aux critères de la revue de la littérature :

« Performance diagnostique du génotypage rhésus D fœtal par prise de sang maternelle au premier trimestre de la grossesse »

Les études devaient toutes disposer d'un panel minimal de 10 patientes testées. De plus, un test de vérification du statut sérologique RHD (phénotype) devait obligatoirement être mentionné.

Lorsque une étude n'était pas spécifique du 1^{er} trimestre de la grossesse les données étaient extraites des analyses de sous-groupes fournies par les auteurs.

c. Analyse qualitative et collection des données

Une première analyse qualitative a été effectuée permettant de notifier les forces et les faiblesses telles qu'elles ont été définies précédemment pour ce type d'étude (Freeman et al., 2009). Chaque article a fait l'objet d'un résumé critique comportant trois parties:

- Matériels et méthodes
- Résultats
- Conclusion et limites

Les résumés sont présentés par ordre chronologique de publication des articles associés.

Un tableau récapitulatif des biais potentiels de ce type d'étude a été réalisé (**Tableau 4**). Pour chaque article, une liste des biais possibles a été établie. Elle comprend les points suivants :

- Données ethniques fournies
- Mention de l'état d'immunisation des patientes à l'inclusion
- Résultats indéterminés rapportés
- Nombre de réplicats rapporté
- Emploi systématique d'un contrôle de l'extraction et de l'amplification de l'ADN
- Emploi d'un contrôle de la présence d'ADN fœtal (même partiel : SRY)
- Emploi de témoins positifs et négatifs
- Définition claire d'un résultat positif ou négatif
- Méthodologie de l'étude spécifiée (caractère prospectif, rétrospectif, série,...)
- Test de vérification effectué en aveugle

Pour chaque article, différentes données ont été extraites et chargées sur un tableau Excel (Microsoft®) (**Tableau 3**):

- Nom de l'auteur principal
- Année de publication
- Méthode de biologie moléculaire employée
- Exons (et/ou introns) amplifiés
- Test de vérification utilisé (*gold standard*)
- Gène témoin de l'extraction et / ou de l'amplification du matériel
- Nombre de patientes incluses (effectif)
- Nombre de résultats indéterminés
- Nombre de résultats « vrais positifs » (VP)
- Nombre de résultats « vrais négatifs» (VN)
- Nombre de résultats « faux positifs » (FP)
- Nombre de résultats « faux négatifs» (FN)

d. Analyses statistiques

- *Performance diagnostique par article*

Pour chaque article, la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive négative et positive ont été calculées.

- *Méta-analyse*

Les études sélectionnées ont été intégrées dans une méta-analyse permettant de calculer une sensibilité et une spécificité globales. Une évaluation de l'hétérogénéité a été effectuée par le biais des tests I^2 et chi-deux. De façon conventionnelle, un $I^2 < 30\%$ ainsi qu'un $p > 0,10$ permettraient d'attester de l'homogénéité globale des études.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel libre OpenMeta Analyst (disponible en téléchargement à l'adresse suivante : http://www.cebm.brown.edu/open_meta/download). Une méta-analyse selon le modèle des effets fixes a été conduite lorsqu'il était raisonnable de conclure à l'homogénéité des études. Dans le cas contraire, une méta-analyse selon le modèle des effets aléatoires a été utilisée. Tous les résultats sont fournis avec leurs intervalles de confiance à 95% (IC_{95%}).

2. Revue de la littérature

a. Résultats de la recherche

Dix-sept études répondant aux critères de la revue ont été retenues (**Tableau 3**). Seuls 3 études étaient spécifiques du 1^{er} trimestre de la grossesse (Costa et al., 2002 ; Cardo et al., 2010 ; Akolekar et al., 2011). Une étude dont les résultats n'étaient pas stratifiés en fonction du terme a malgré tout été retenue en raison de sa puissance et de la grande proportion des tests effectués au 1^{er} trimestre (Wikman et al., 2012).

b. Présentation des études et analyse qualitative

L'analyse critique de chaque article est disponible dans la rubrique « Annexes » en fin de manuscrit. La synthèse de cette analyse est fournie (**Tableau 4**).




Tableau 3 – Performances diagnostiques des études portant sur le génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle au 1^{er} trimestre de la grossesse

Auteur, année	Exon (intron)	Contrôle extraction ADN	Gold standard	Effectif	Résultats indéterminés	RHD positif			RHD négatif		
						n	Correcte (%)	Sp	n	Correcte (%)	Se
Lo et al., 1998	10	β-globine	Sérologie	12	NC	9	7 (77,8)	60,0	3	3 (100)	100
Zhang et al., 2000	7	Aucun	Sérologie	20	NC	12	11 (91,7)	88,9	8	8 (100)	100
Costa et al., 2002*	10	SOD/GALT	Sérologie Amniocytes	102	NC	62	62 (100)	100	40	40 (100)	100
Finning et al., 2002	4,5,6,10	CCR5/SRY	Sérologie Amniocytes	19	0	13	13(100)	100	6	6 (100)	100
Randen et al. 2003	7	β-globine/SRY	Sérologie	18	NC	9*	7* (77,8)	75,0	9*	6* (66,7)	70,0
Rouillac-Le Scieillour et al., 2004	7,10	Aucun	Sérologie	106	0	69	67 (97,1)	94,7	37	36 (97,3)	98,5
Brojer et al., 2005	7,10 (int 4)	β-actine/SRY polymorphismes	Sérologie	30	3	20	19 (95,0)	88,9	10	8 (80,0)	90,5
Dricot et al., 2006	4,5,10	CCR5/SRY	Sérologie	10	NC	8	8 (100)	100	2	2 (100)	100
Machado et al., 2006	10 (int 4)	Aucun	Sérologie	15	0	11	10 (90,9)	100	4	4 (100)	90,9
Al-Yatama et al., 2007	7	β-globine/SRY	Sérologie	14	NC	8	7 (87,5)	85,7	6	6 (100)	100
Minon et al., 2008	4,5,10	CCR5/SRY	Sérologie	39	0	26	26 (100)	100	13	13 (100)	100
Cardo et al., 2010*	5,7	β-globine	Sérologie	100	2 (2,0%)	58	55 (94,8)	93,0	40	40 (100)	100
Sedrak et al., 2011	5,7	β-globine	Sérologie	55	NC	31	29 (96,5)	85,7	14	12 (85,7)	93,5
Akolekar et al., 2011*	5,7	CCR5	Sérologie	586	84 (14,3%)	332	332 (100)	100	170	164 (96,5)	98,2
Bombard et al., 2011	4,5,7,RHDψ	TGIF	Sérologie	234	16 (6,8%) 11 RHDψ (4,7%)	142	138 (97,2)	94,0	65	63 (96,9)	98,6
Wikman et al., 2012**	4	GAPDH	Sérologie	3652	32	2291	2236 (97,6)	96,0	1346	1331 (98,9)	99,3
Moïse et al., 2013	4,5,7,RHDψ	TGIF/SRY	Sérologie	118	9	73	71 (97,3)	94,6	36	35 (97,2)	98,6

* Etudes spécifiques du 1^{er} trimestre de la grossesse. ** Les résultats sont fournies par *run* de PCR et non par patiente. ***L'étude de Wikman et al. portait sur un total de 4118 génotypes, dont 3108 (75%) avaient été réalisés au cours du 1^{er} trimestre de grossesse. Les auteurs n'ont pas stratifié les résultats en fonction du terme de leur réalisation.

Tableau 4 – *Check-list* des biais potentiellement associés aux études de performance diagnostique du génotypage RHD fœtal par prise de sang maternel au 1^{er} trimestre de la grossesse

	Données ethniques fournies	Etat d'immunisation initial mentionné	Résultats indéterminés rapportés	Nombre de répliquats rapporté	Emploi systématique d'un contrôle de l'extraction et de l'amplification de l'ADN	Emploi d'un contrôle de la présence d'ADN fœtal (même partiel : SRY)	Emploi de témoins positifs et négatifs	Définition claire d'un résultat positif ou négatif	Méthodologie de l'étude spécifiée (caractère prospectif, rétrospectif, série...)	Test de vérification effectué en aveugle
Lo et al., 1998	-	+	-	-	+	-	+	+	+	?
Zhang et al., 2000	-	-	-	+	-	-	+	+	-	?
Costa et al., 2002	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Finning et al., 2002	-	+	+	+	+	+	-	+	-	?
Randen et al. 2003	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
Rouillac et al., 2004	-	+	+	+	-	-	+	+	+	?
Brojer et al., 2005	-	-	+	+	+	+	-	+	-	?
Dricot et al., 2006	+	-	-	-	+	+	+	+	-	?
Machado et al., 2006	+	+	+	-	-	-	+	+	-	?
Al-Yatama et al., 2007	-	-	-	-	+	+	+	+	-	?
Minon et al., 2008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?
Cardo et al., 2010	+	-	+	+	+	+	+	+	+	?
Sedrak et al., 2011	-	-	-	-	+	+	+	-	+	?
Akolekar et al., 2011	+	-	+	+	+	-	+	+	+	?
Bombard et al., 2011	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?
Wikman et al., 2012	-	+	+	+	+	-	+	+	+	?
Moise et al., 2013	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Pour chaque item et chaque étude, une analyse qualitative est fournie grâce à une icône :  (présence),  (absence) et  (doute).

c. Méta-analyse

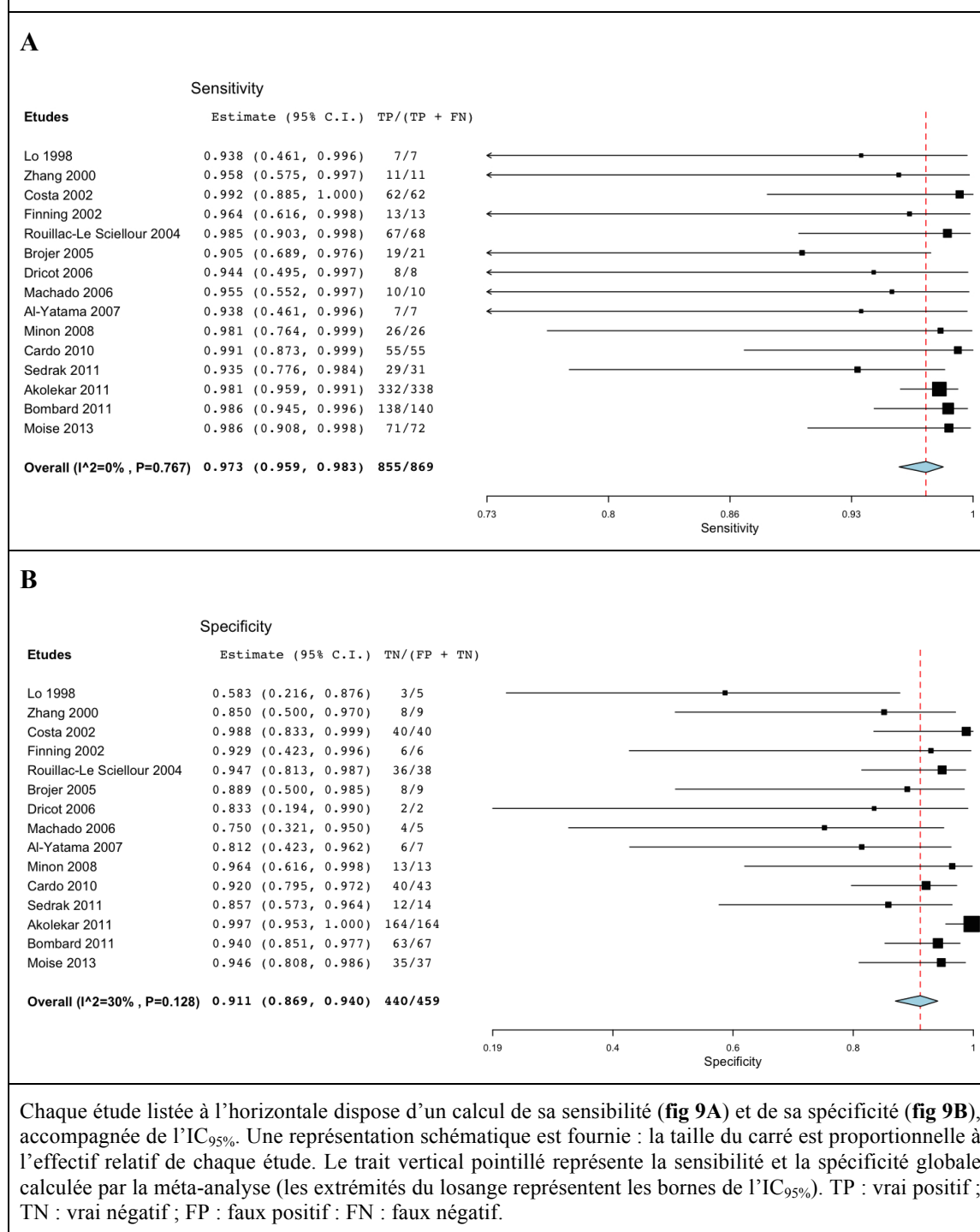
Quinze études ont été intégrées dans la méta-analyse, aboutissant à un total de 1328 patientes incluses (**Figure 9**). Deux études n'ont pas été retenues :

→ Randen et al., 2003 : l'auteur ne fait pas part de résultats à l'échelle d'un patient mais à l'échelle d'un *run* de PCR. On ne peut de ce fait l'intégrer aux autres résultats.

→ Wikman et al., 2012 : les résultats portent sur l'intégralité des trimestres sans stratification des résultats pour le 1^{er} trimestre.

La **sensibilité** globale, toutes études confondues, est de **97,3% (IC₉₅ : 95,9 – 98,3)**.

La **spécificité** globale, toutes études confondues, est de **91,1% (IC₉₅ : 86,9 – 94,0)**.

Figure 9 – Méta-analyse de la performance diagnostique du génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle au 1^{er} trimestre de la grossesse

V. Etude originale de la performance diagnostique du génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle au 1^{er} trimestre de la grossesse

Afin de compléter les données de la littérature et en raison du peu d'études traitant spécifiquement du 1^{er} trimestre de la grossesse, nous proposons une étude originale de performance diagnostique spécifique du 1^{er} trimestre.

A. Matériels et méthodes

1. Schéma expérimental

Etude rétrospective, observationnelle, non interventionnelle.

2. Période d'étude

Génotypages RHD fœtaux pratiqués entre le 1^{er} janvier 2007 et le 31 décembre 2012.

3. Population

Patientes ayant un phénotype RHD négatif et ayant bénéficié d'une prescription d'un génotypage fœtal RHD par prise de sang maternelle entre la 10^{ème} et la 14^{ème} SA. Les indications de prélèvement pouvaient concerner :

- Un dépistage à titre systématique ou un antécédent d'allo-immunisation
- Un dépistage avant réalisation d'un geste invasif
- Une autre situation à haut risque d'allo-immunisation (métrorragies, traumatisme, autre)

Le génotypage était réalisé par le laboratoire Cerba[®] après envoi des prélèvements par un transporteur agréé.

4. Modalités techniques de réalisation du génotypage fœtal RHD

Vingt et un millilitres de sang total périphérique étaient prélevés chez les patientes dans des tubes secs avec gel séparateur. Les sérums étaient obtenus après centrifugation à 4°C pendant 10 minutes à 3000g, puis étaient aliquotés et conservés à -20°C.

a. Extraction de l'ADN

Un traceur de l'extraction et de l'amplification de l'ADN a été utilisé pour chaque manipulation : adjonction de 250pg d'ADN de souris (Sigma-Aldrich[®]) au sérum de chaque patient. L'ADN total a ensuite été extrait à l'aide d'un kit dédié (PCR Template Preparation Kit - Roche[®]) et en accord avec les recommandations du fournisseur.

b. Amplification de l'ADN

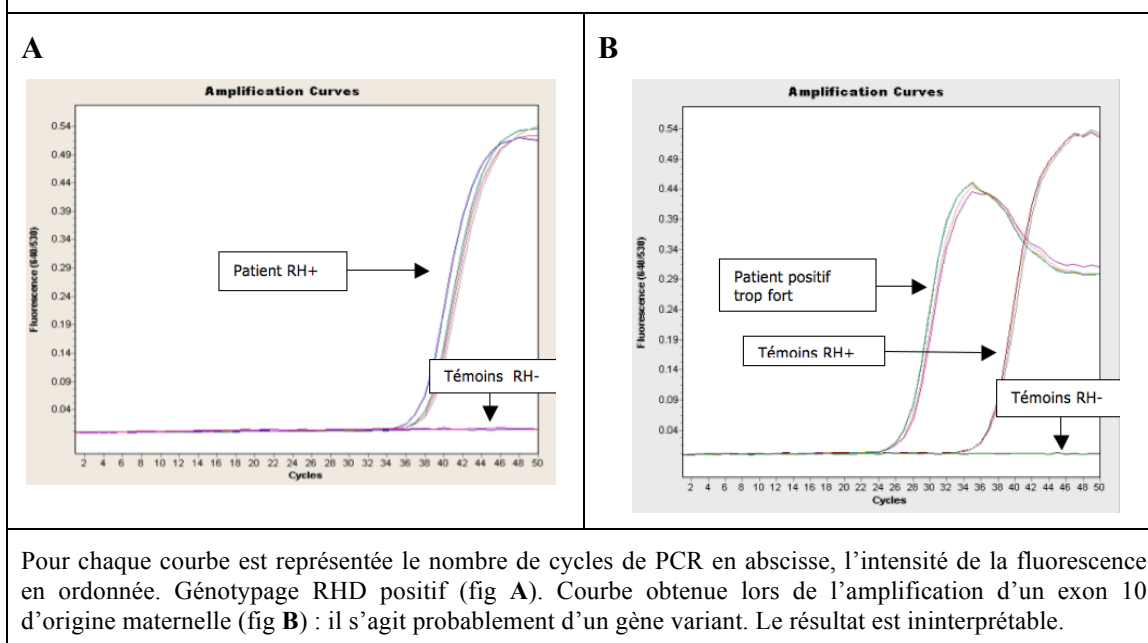
La co-amplification des gènes RHD et de la superoxyde dysmutase (SOD - gène témoin de l'extraction) a été obtenue par PCR duplexe en temps réel sur un appareil LightCycler 2.0 (Roche[®]). Les produits d'amplification ont ensuite bénéficié d'un marquage par des sondes spécifiques couplées à des fluorochromes (LCRed640 pour le gène RHD ; LCRed705 pour le gène SOD). Les oligonucléotides et les sondes employées sont détaillés (**Tableau 5**). La procédure comportait un premier temps d'incubation d'une minute à 50°C en présence d'uracyle DNA glycosylase (Byolabs[®]) permettant la dégradation des éventuels produits contaminants des cycles précédents. Le 2^{ème} temps (dénaturation) comportait une durée de huit minutes à 95°C. Enfin, le temps d'amplification comportait 3 étapes (50 cycles au total) :

- Dénaturation : 95°C – 10 secondes – vitesse de chauffage : 20°C/s
- Hybridation : 56°C – 10 secondes – vitesse de chauffage : 20°C/s
- Elongation : 72°C – 15 secondes – vitesse de chauffage : 2°C/s

Tous les échantillons ont été analysés en duplicat. Chaque *run* de PCR a été effectué en présence d'un témoin positif (ADN issu d'un sérum connu RHD positif) et d'un témoin négatif (ADN issu d'un sérum connu RHD négatif) (**Figure 10**).

Tableau 5 – Détail des oligonucléotides et des sondes employées pour le génotypage RHD fœtal au 1^{er} trimestre de la grossesse

Oligonucléotides	RHE10A	5' GCCTGCATTTGTACGTGAGA 3'
	RHE10B	5' CAAAGAGTGGCAGAGAAAGGA 3'
	IS11	5' GCGCTTCCCGAGGTACACTAT 3'
	IS12	5' ATGTCACATCTGCCCGAACTCC 3'
Sondes marquées	RHE10C	5' GCAGGCACTGGAGTCAGAGAAAA 3' - 5'LCRed640 3'Ph
	RHE10D	5' TGACAGCAAAGTCTCCAATGTTCG 3' - 3'FITC
	IS9	5' TGGTGATCCTGCCGTTTCCTTGTCTT 3' - 5'LCRed705 3'Ph
	IS10	5' GCCCTGATGTGGTCACAGTCAAGCA 3' - 3'FITC
Sigma-Aldrich. RHE : gene RHD ; IS : gène SOD		

Figure 10 – Exemples de courbes obtenues par PCR en temps réel

5. Critères d'évaluation

- Critère d'évaluation principal : Corrélation entre le génotype RHD fœtal et le phénotype RHD réalisé sur sang de cordon en post-partum immédiat (sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive, valeur prédictive négative).

- Critères d'évaluation secondaires : répartition des indications de prélèvements, taux d'allo-immunisation en cours de grossesse, taux d'injection d'immunoglobulines anti-D.

6. Procédure de recueil des données

Les résultats des génotypages RHD ont été fournis par le laboratoire Cerba[®]. Les modalités de réalisation du génotypage RHD fœtal ont été précisées précédemment. Les informations médicales complémentaires ont été obtenues après consultation directe des dossiers obstétricaux au sein des maternités d'origine des patientes et/ou via le système d'archivage informatique des dossiers patientes du laboratoire Cerba[®]. Ont été collectés :

- Phénotype RHD de l'enfant, réalisé sur sang de cordon en post-partum immédiat.
- Résultats des RAI au cours de la grossesse et en post-partum immédiat
- Administration d'immunoglobulines anti-D au cours de la grossesse et en post-partum immédiat
- Origine géographique de la patiente et de son conjoint

Les renseignements personnels concernant les patientes et leurs nouveau-nés ont été gardés confidentiels dans les limites prévues par la loi. Seuls les responsables du projet de recherche ont eu accès à ces données qui seront conservées pendant 30 ans et détruites à la fin de ce délai.

7. Analyses statistiques

Les données obstétricales et néonatales ont été chargées sur un fichier Excel (Microsoft® Office 2008). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel JMP 10 (SAS Institute®). Le test exact de Fisher (variables qualitatives) et le test non paramétrique de Mann-Whitney (variables continues) ont été utilisés afin de comparer les différences statistiques entre les groupes. Le seuil de $p < 0,05$ a été retenu comme étant statistiquement significatif.

B. Résultats

1. Bilan des géotypages RHD

Durant la période d'étude, 2025 géotypages RHD fœtaux par prise de sang maternelle au 1^{er} trimestre de grossesse ont été adressés au laboratoire Cerba®. Les prélèvements provenaient de 284 centres d'analyses et/ou maternités différents. Cinq centres hospitaliers regroupaient près de 70% des prescriptions (American Hospital of Paris, Institut Mutualiste Montsouris, Centre Hospitalo-Universitaire Necker – Enfants Malades, Centre Hospitalo-Universitaire Antoine Béchère et Institut Hospitalier Franco-Britannique).

Les géotypages RHD étaient principalement réalisés à titre systématique ($n = 1552 - 76,6\%$) et pour des grossesses singletons ($n = 1995 - 98,5\%$). Un peu moins d'un cinquième des prescriptions ($n = 342 - 16,9\%$) concernait un dépistage avant réalisation d'un geste invasif : amniocentèse, biopsie de trophoblaste ou ponction de sang fœtal. La population d'étude était constituée de patientes aux antécédents d'allo-immunisation RHD dans moins de 5% des cas ($n = 97 - 4,8\%$). La grande majorité des géotypages RHD a été prescrite entre la 12^{ème} et la 14^{ème} semaine d'aménorrhée ($n = 1796 - 88,7\%$).

On note la réalisation de 1982 tests contributifs, représentés par 1325 génotypages RHD positif (66,9%) et 657 génotypages RHD négatif (33,1%). Quarante-trois tests se sont révélés indéterminés (2,1%). Les taux d'obtention de tests indéterminés en fonction de l'âge gestationnel sont (tests indéterminés / tests prescrits) :

- 10 SA : 2 / 77 (2,6%)
- 11 SA : 3 / 152 (2,0%)
- 12 SA : 11 / 637 (1,7%)
- 13 SA : 15 / 658 (2,3%)
- 14 SA : 12 / 501 (2,4%)

L'âge gestationnel ne semble pas avoir d'impact sur le risque d'obtenir un résultat indéterminé :

→ Comparaison des groupes [10 SA ; 11SA] vs [11 SA ; 14 SA] : $p = 0,95$

→ Comparaison des groupes [10 SA ; 12SA] vs [12 SA ; 14 SA] : $p = 0,46$

Quatre-vingt dix-sept patientes aux antécédents d'allo-immunisation RHD se sont vues prescrire un génotypage RHD : 65 génotypes RHD positif, 28 génotypes RHD négatif et 4 génotypes indéterminés : 28,9% des patientes allo-immunisées ont pu bénéficier d'un niveau de surveillance obstétrical allégé suite à la réalisation du test.

Figure 11 – Résultats des génotypes RHD fœtaux effectués

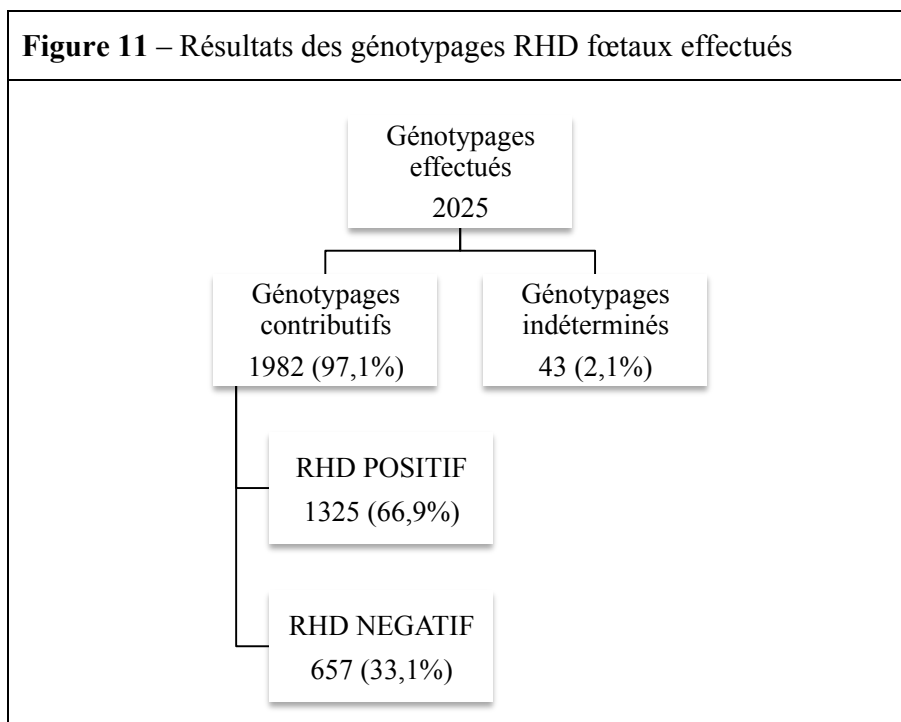


Figure 12 – Indications, terme de prélèvement et nombre des fœtus impliqués/grossesse lors de la réalisation des génotypes RHD fœtaux

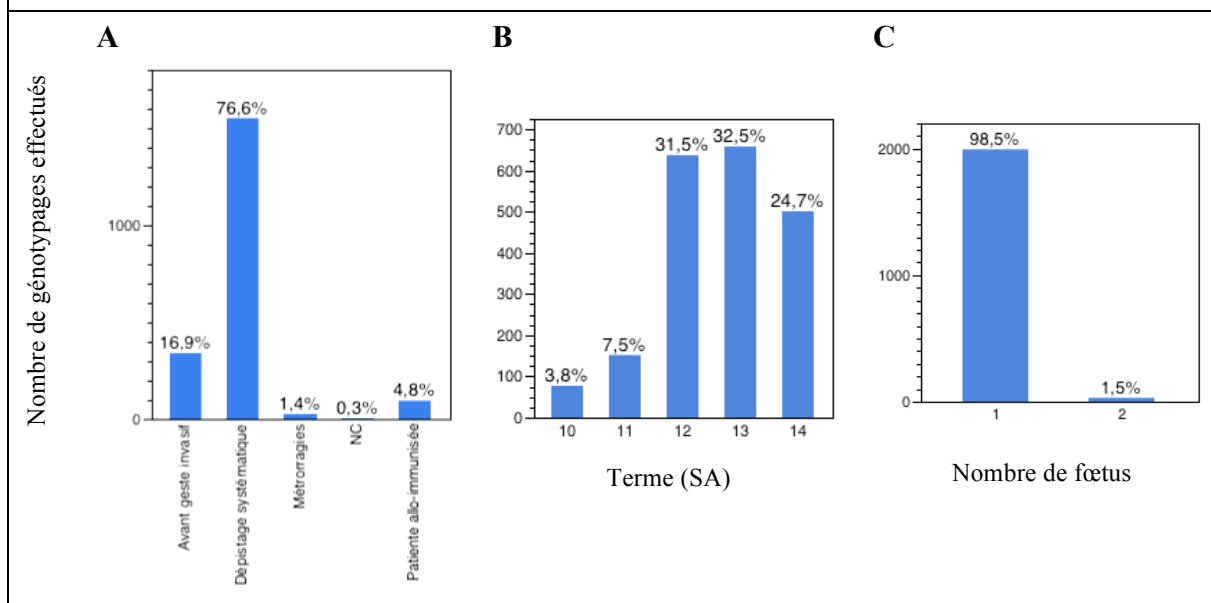


Fig 12A : indications des génotypes RHD fœtaux. **Fig 12B** : terme lors des prélèvements. **Fig 12C** : rangs des grossesses (1 : singleton ; 2 : gémellaire). SA : semaines d'aménorrhée.

2. Corrélation génotype / phénotype

Un total de 416 issues de grossesse (20,5%) a été recueilli (**Figure 13**). La totalité des fœtus génotypes RHD négatif (n = 148 ; 38,9%) ont un phénotype négatif à la naissance, soit une sensibilité de 100%. Sur les 259 fœtus ayant un génotype RHD positif, 252 (97,3%) ont un phénotype positif à la naissance et 7 (2,7%) ont un phénotype négatif à la naissance, soit une spécificité de 95,5%. La valeur prédictive positive du test est de 97,3%. La valeur prédictive négative du test est de 100%.

Les 7 faux positifs du génotypage concernaient 4 patientes caucasiennes, 1 patiente d'Afrique subsaharienne, 1 patiente antillaise et 1 patiente d'origine non connue. Il s'agissait de patientes aux grossesses singletons, dépistées à titre systématique, sans antécédent d'allo-immunisation. Quatre d'entre elles ont bénéficié d'au moins une injection d'immunoglobulines anti-D systématique à 28SA et deux d'entre elles d'une seconde injection ciblée (1 injection pour métrorragies, 1 injection en post-partum).

Les résultats des RAI ont pu être obtenus pour 265 patientes. Aucune nouvelle allo-immunisation n'a été notée pendant la durée de l'étude.

3. Méta-analyse

Les données de performance diagnostique de l'étude originale ont été intégrées avec les données des 15 études précédemment sélectionnées (**Figure 14**). Les modalités de réalisation de la méta-analyse sont identiques à celles explicitées dans le chapitre « IV. Génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle au 1er trimestre ». Au total, 1735 patientes ont été incluses.

La **sensibilité** globale, toutes études confondues, est de **97,5%** (**IC95 : 96,1 - 98,4**).

La **spécificité** globale, toutes études confondues, est de **92,4%** (**IC95 : 89,3 – 94,6**).

Figure 13 – Corrélation génotypes RHD fœtaux / phénotypes RHD post-nataux

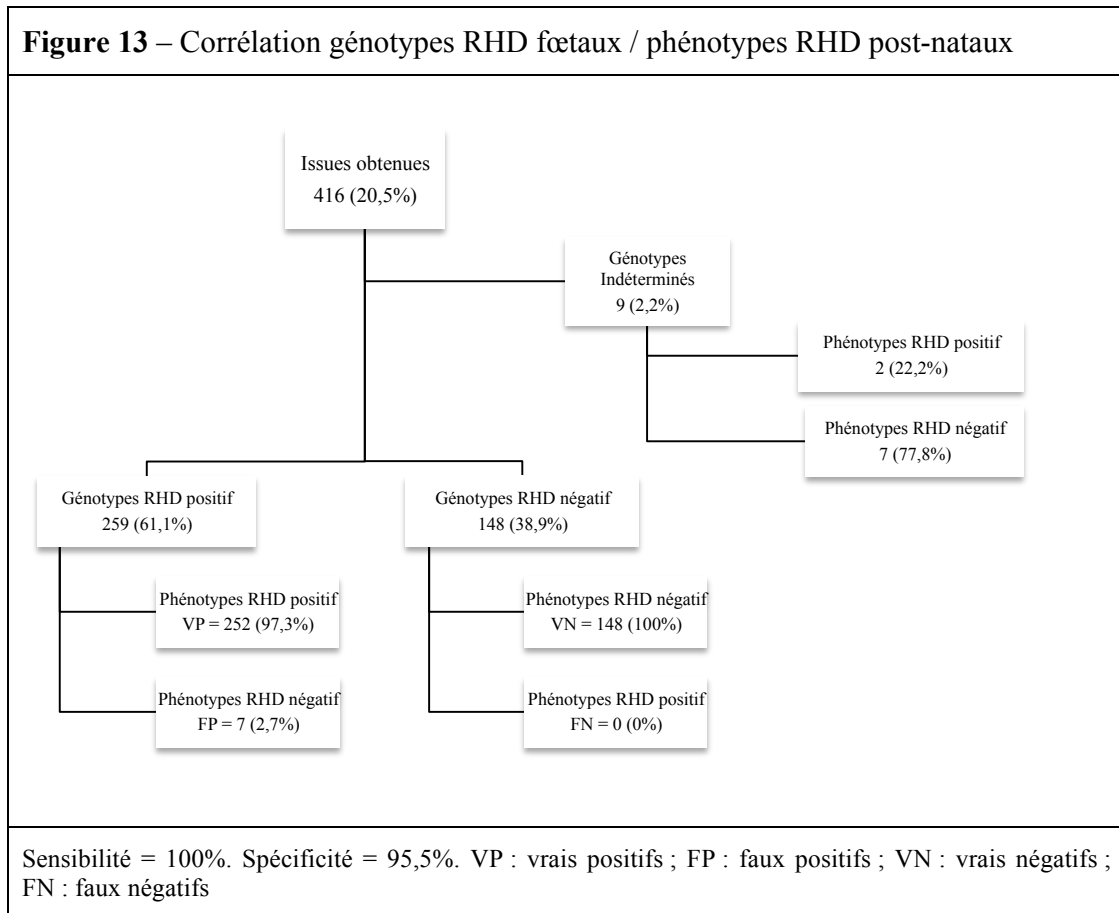
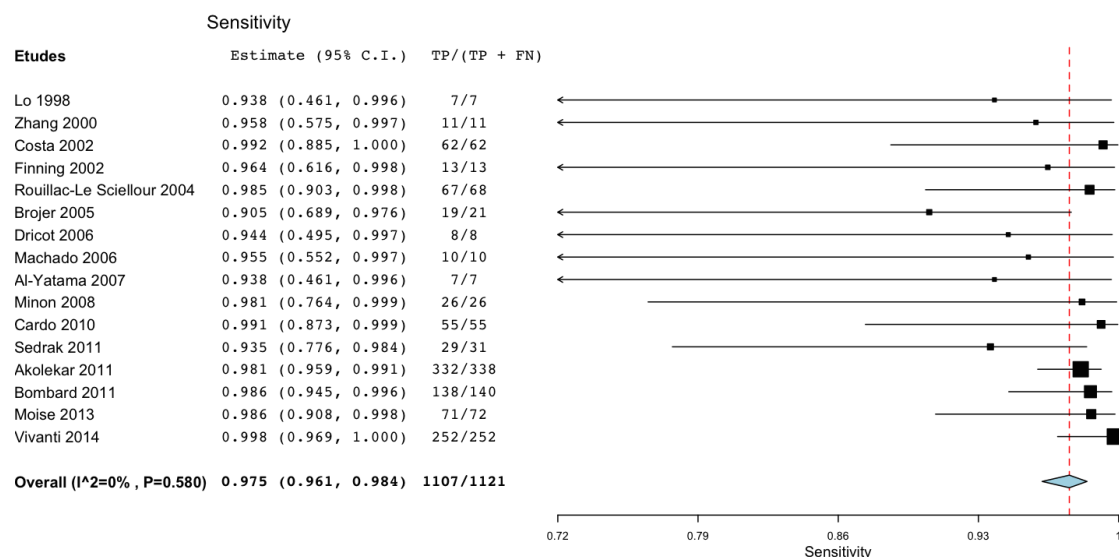
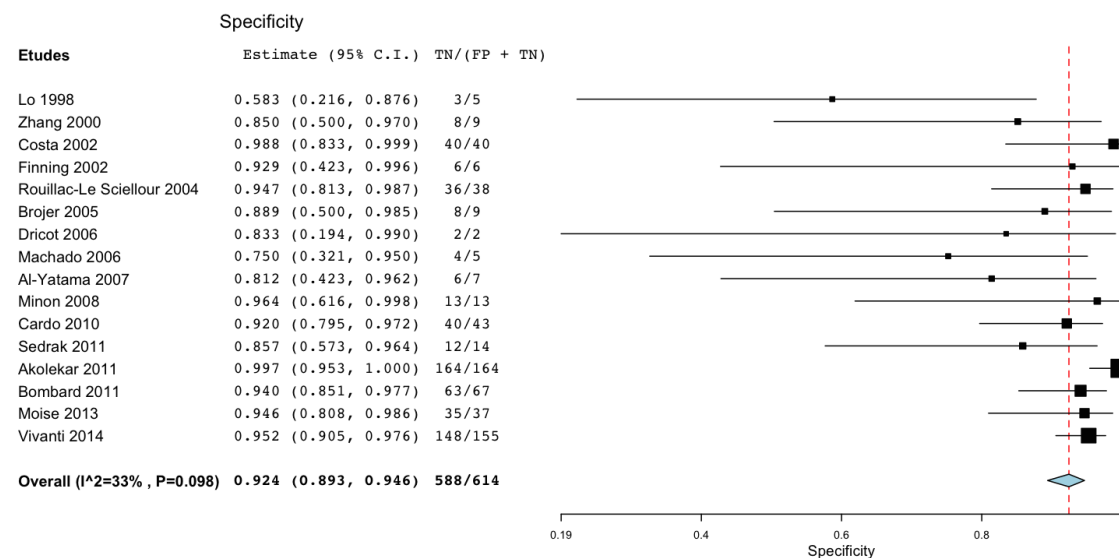


Figure 14 – Méta-analyse de la performance diagnostique du génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle au 1^{er} trimestre de la grossesse incluant les résultats de l'étude originale**A****B**

Chaque étude listée à l'horizontale dispose d'un calcul de sa sensibilité (**fig 14A**) et de sa spécificité (**fig 14B**), accompagnée de l'IC_{95%}. Une représentation schématique est fournie : la taille du carré est proportionnelle à l'effectif relatif de chaque étude. Le trait vertical pointillé représente la sensibilité et la spécificité globale calculée par la méta-analyse (les extrémités du losange représentent les bornes de l'IC_{95%}). TP : vrai positif ; TN : vrai négatif ; FP : faux positif ; FN : faux négatif.

C. Discussion

Nous rapportons dans notre étude une sensibilité de 100% et une spécificité de 95,5% sur un contingent de plus de 416 fœtus. Il s'agit d'un test ayant une des meilleures performances diagnostiques dans cette indication (meilleure sensibilité et 3^{ème} meilleure spécificité). En outre, cette étude possède le 2^{ème} plus grand effectif après l'étude d'Akolekar (Akolekar et al., 2011). Les résultats de cette étude démontrent la bonne performance diagnostique du génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle, effectué à l'aide de l'amplification de l'exon 10, entre la 10^{ème} et la 14^{ème} SA. L'absence de résultat faussement négatif permet de rassurer avec une quasi certitude la patiente et le clinicien. Ce dernier pourra ainsi diminuer le niveau de surveillance, écartant une potentielle situation d'IFME. En cas de génotypage négatif, la réalisation systématique d'un second test n'apparaît pas non plus nécessaire. On notera cependant l'existence d'un taux de résultats indéterminés non nul (2,1%) : 18 de ces 43 résultats indéterminés concernaient au moins l'un des deux parents d'origine africaine, impliquant possiblement l'existence d'un pseudogène RHD ψ . Ce taux de résultats indéterminés fait parti des plus bas de ceux rapportés dans la littérature. L'équipe d'Akolekar objective un taux non négligeable de 15% de résultats indéterminés (qu'il s'agisse de variants RHD ou de résultats équivoques). Cela s'explique notamment par une grande proportion de patientes d'origine africaine : 19,3% de l'effectif total contre 3,2% de patientes d'origine afro-antillaise dans notre cohorte.

Cette étude comporte néanmoins certaines limites. D'une part, les difficultés de traçabilité et d'accessibilité des dossiers obstétricaux, inhérentes au caractère rétrospectif de l'analyse, grèvent fortement le taux d'issues recueillies ($416 / 2025 = 20,5\%$). Ce biais est néanmoins atténué par la bonne représentativité des génotypes recueillis (39% RHD négatifs, 41% RHD positifs) par rapport aux données françaises. D'autre part, le faible taux de résultats indéterminés de notre cohorte peut en partie être lié à la faible proportion de patientes d'origine afro-antillaise. Il est cependant impossible d'estimer la représentativité des patientes incluses par rapport aux origines ethniques composant la population française. L'absence de contrôle de la présence et de l'extraction de l'ADN

d'origine fœtale n'est pas pénalisante dans notre étude, compte tenu de l'absence de résultat FN.

La méta-analyse réalisée à partir des données disponibles sur le génotypage au 1^{er} trimestre permet également de confirmer la bonne performance diagnostique des tests évalués malgré l'hétérogénéité des modalités techniques de réalisation de la PCR. En effet, cinq exons différents ont été utilisés (4, 5, 6, 7 et 10), de façon indépendante ou en association. De plus, il existe une grande variabilité dans la définition d'un résultat positif, nécessitant la positivité de 1 à 4 réplicats en fonction des études. On notera aussi une tendance importante à la non mention de l'existence de résultats ininterprétables ainsi que l'explicitation de tels résultats. Il faut néanmoins signaler la volonté croissante des différentes équipes à adjoindre des contrôles de qualité de la présence d'ADN fœtal, que ce soit par l'amplification de séquences spécifiques du chromosome Y ou par l'étude de polymorphismes propres au fœtus. L'adjonction de ces contrôles de qualité est néanmoins sujette à controverse en raison du très faible taux de résultats FN des tests employés en routine aujourd'hui. Scheffer et al. suggèrent de les intégrer lorsque l'implication d'un résultat FN peut avoir des répercussions sévères : situations à risque d'IFME (Scheffer et al., 2011).

Plusieurs intérêts justifient la réalisation d'un génotypage RHD précoce (au 1^{er} trimestre) par rapport à un génotypage plus tardif. D'une part, écarter précocement une situation d'IFME permet d'éviter d'entamer un processus de surveillance clinico-biologique parfois lourd qui peut démarrer dès la 16^{ème} SA. D'autre part, un diagnostic précoce de génotype fœtal RHD négatif offre la possibilité, chez les patientes non allo-immunisées, de s'affranchir de l'administration d'Ig anti-D liées aux événements à risques de la fin du 1^{er} trimestre. Ceux-ci prennent en compte les métrorragies résiduelles de fin du 1^{er} trimestre dont l'estimation n'est pas connue, mais également les situations de prélèvements invasifs programmés. Rappelons que plus de 15% (342) des génotypages de l'étude originale ont été effectués lors de la programmation d'un test invasif. Avec 33% de génotypages RHD négatif, on peut estimer que plus de 110 doses de 200 µg d'Ig anti-D n'ont pas été administrées grâce à la détermination précoce. Ces résultats sont à pondérer avec l'avènement du diagnostic prénatal non invasif (DPNI) des principales aneuploïdies,

et la forte réduction des taux d'amniocentèses déjà ressentie en pratique courante. Enfin, la réassurance précoce de patientes allo-immunisées aux antécédents obstétricaux parfois lourds est un argument majeur en faveur d'une détermination précoce du génotype RHD fœtal. Dans le schéma de surveillance classique, celle-ci peut parfaitement trouver sa place avec la prescription conjointe du dépistage combiné des aneuploïdies du 1^{er} trimestre (si désiré).

A l'image du DPNI, l'intégration d'une estimation de la fraction d'ADN fœtal libre pourrait apporter une plus value afin de palier à l'existence de résultats faussement négatifs par défaut de matériel génétique d'origine fœtale. Ce calcul de la fraction fœtale est même un pré requis à la réalisation du DPNI. Dans le plasma maternel, l'ADN fœtal libre est mêlé à l'ADN maternel libre. Sa fraction oscille entre 5 à 10% de l'ADN libre circulant total. Celle-ci est étroitement corrélée au terme de la grossesse. Certains facteurs peuvent l'impacter, comme l'obésité (diminution). A ce jour, il est impossible d'extraire cet ADN fœtal car il n'en existe aucune séquence spécifique. Des différences de profils de méthylation sont parfois ciblées afin de d'apprécier la fraction fœtale (hypométhylation du gène SERPINB5, hyperméthylation du gène RASSF1A). D'autres méthodes d'estimation de la fraction fœtale ont été décrites (Fan et al., 2012). Celles-ci ont été rendues possibles grâce à l'avènement du séquençage très haut débit. Elles se fondent sur la quantification relative des haplotypes parentaux. Le génome fœtal est la résultante de la recombinaison méiotique des 23x4 chromosomes parentaux. Durant la grossesse, dans le plasma maternel coexistent 3 haplotypes différents pour chaque région génomique : l'haplotype maternel transmis au fœtus, l'haplotype paternel transmis au fœtus et l'haplotype maternel non transmis au fœtus. Il est possible d'estimer la fraction fœtale grâce à un algorithme complexe. Celui-ci prend en compte la fréquence relative des copies des haplotypes maternels non transmis présents dans le sérum maternel. Ce dernier est déduit du séquençage et de la comparaison des haplotypes présents dans le plasma (ADN libre total) par rapport aux haplotypes maternels non hérités séquencés dans la fraction cellulaire. Cette technique peut être simplifiée par le séquençage restreint de l'exome. Ces techniques sont cependant onéreuses en comparaison au prix actuel du génotypage RHD pour un service rendu potentiellement faible en raison de l'excellente sensibilité du test.

Bien qu'une demande ait été effectuée, le génotypage RHD fœtal n'est à ce jour toujours pas inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) et reste donc à la charge de la patiente. La Haute Autorité de Santé a été saisie en 2011 afin de rendre un avis consultatif concernant le service attendu du génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle. Cet avis tient compte de l'intérêt diagnostique et de l'intérêt de santé publique. Au total, la HAS a estimé que le service attendu était satisfaisant dans les indications suivantes :

- « Prise en charge des grossesses des patientes RHD négatif non immunisées, pour lesquelles le géniteur présumé a été identifié RHD positif. »
- « Prise en charge des grossesses des patientes RHD négatif immunisées, pour lesquelles le géniteur présumé a été identifié RHD positif. »

L'amélioration du service attendu a été considérée comme modérée, considérant que le génotypage RHD non invasif permettait de :

- « Limiter l'administration d'Ig anti-D aux seules grossesses qui relevaient de l'immunoprophylaxie. »
- « Adapter les modalités de surveillance des grossesses des patientes RHD négatif déjà immunisées, en ne réservant un suivi lourd et spécialisés aux seules grossesses qui le nécessitent. »

Cet avis consultatif a été transmis à l'Union Nationale des Caisses d'Assurance Maladie (UNCAM) qui prendra l'éventuelle décision de l'inscrire à la NABM. Rappelons que la détermination du sexe fœtal par génotypage non invasif sur sang maternel fait déjà partie de la NABM depuis octobre 2010.

D'autres considérations d'ordre financier doivent être prises en compte. Peu d'études sont à ce jour disponibles. Seule une équipe française s'est à ce jour penchée sur la question du coût de la prise en charge des patientes RHD négatif (Benachi et al., 2012). Cette étude multicentrique a permis de comparer les coûts liés à l'intégration du génotypage RHD employé en routine. Cent une patientes ont été incluses. Un suivi prospectif a été mis en place. Les coûts directement liés au statut RHD négatif ont été calculés (détermination du génotype RHD, RAI, administration éventuelle d'Ig anti-D, détermination du phénotype RHD à la naissance, test de Kleihauer et coûts liés aux soins paramédicaux associés). Les auteurs ont objectivé que l'incorporation du génotypage RHD

non invasif n'offrait pas une balance coût/bénéfice favorable par rapport aux patientes bénéficiant d'une immunoprophylaxie systématique (sans détermination du génotype RHD fœtal au préalable). Une évaluation médico-économique nationale de la réalisation systématique du génotypage RHD fœtal est en cours dans le cadre d'un soutien aux techniques innovantes et coûteuses (STIC). Cette étude multicentrique, intitulée GENIFERh, a pour objectif principal d'évaluer le rapport coût/efficacité de la réalisation systématique du génotypage RHD fœtal non invasif sur l'application de l'immunoprophylaxie RHD et la pratique habituelle de suivi des femmes enceintes RHD négatif des maternités en France. Les données de l'étude GENIFERh sont actuellement en cours d'analyse.

D'autres équipes internationales se sont intéressées au rapport coût/efficacité du génotypage RHD non invasif employé de façon systématique. Les résultats sont concordants avec les données françaises (Benachi et al., 2012). Au Royaume-Uni, une équipe a comparé les coûts liés à deux attitudes différentes par rapport aux recommandations en vigueur (administration systématique de 2 injections de 100 µg à 28 et 34 SA à toutes les patientes RHD négatif) (Szczepura et al., 2011):

- 1^{er} bras : génotypage RHD systématique et prise en charge anténatale tenant compte du résultat du génotypage RHD.

- 2^{ème} bras : génotypage RHD systématique et prise en charge anténatale et post-natale tenant compte du génotypage RHD (pas de groupe sanguin au cordon ni de test de kleihauer en cas de génotypage RHD négatif. Pas d'administration d'Ig anti-D en post-partum en cas de génotypage RHD négatif).

Dans ces conditions, la détermination systématique du génotype RHD fœtal n'apparaît pas être intéressante sur le plan économique par rapport aux recommandations en vigueur au Royaume-Uni. En outre, l'attitude en rapport avec le 2^{ème} bras pourrait contribuer à un surplus significatif d'allo-immunisations à moins que la sensibilité globale du test ne dépasse les 99,9%. Les auteurs affirment que même avec une réduction importante du coût lié à la technique, l'excès d'allo-immunisations serait en défaveur du génotypage RHD systématique. Le même type d'évaluation a été effectué sur une cohorte d'un million de patientes aux Etats-Unis (Hawk et al., 2013) où les autorités de santé recommandent l'administration systématique d'Ig anti-D (une injection à 28SA de dose non spécifiée). De

la même façon, la stratégie actuellement en vigueur (immunoprophylaxie systématique en ante-partum ; immunoprophylaxie ciblée en post-partum) apparaît être moins onéreuse que toute autre stratégie tenant compte de la détermination non invasive du rhésus.

D'autres arguments viennent étayer la nécessité de la généralisation du génotypage RHD foetal. Les Ig anti-D font partie des produits sanguins labiles d'origine humaine. L'hypothèse de la transmission, même exceptionnelle, d'agents infectieux non conventionnels non connus à ce jour ne peut être écartée. Il ne paraît pas éthique d'administrer ces produits lorsque l'on peut s'en affranchir. De plus, avec l'augmentation de la population mondiale et l'amélioration de l'accès aux soins dans tous les pays, on ne peut éliminer les risques futurs de ruptures de stock. Ces données doivent être intégrées dans la démarche de l'inscription à la NABM.

VI. Conclusion

L'avènement de la prévention de l'AIFM par injection d'Ig anti-D a permis de fortement diminuer le risque de développement d'allo-anticorps anti-D en post-partum, passant de 14% en l'absence d'immunoprophylaxie à moins de 2% après administration systématique dans les 72h du post-partum (Fung Kee Fung et al., 2003). D'autres situations dites à haut risque nécessitent une immunoprophylaxie en ante-partum. Les recommandations de bonne pratique clinique du CNGOF de 2005 préconisent l'administration systématique d'Ig anti-D à 28SA chez les patientes RHD négatif, ce qui concerne près de 200 000 patientes par an en France. Cependant, plus de 30% de ces patientes ne nécessitent pas d'immunoprophylaxie, étant porteuses d'un fœtus RHD négatif. L'efficacité de cette politique ne pourra pas être évaluée même si le taux de patientes allo-immunisées dans le système RHD est aujourd'hui très faible en France.

Le développement récent de la détermination non invasive du génotype RHD fœtal permet de réserver l'administration d'Ig humaines aux seules patientes le nécessitant. De plus, l'exclusion ou l'affirmation d'un génotype fœtal RHD positif offre la possibilité d'adapter les modalités de surveillance biologique et échographique chez des patientes antérieurement allo-immunisées.

Le génotypage non invasif RHD fœtal est fondé sur l'existence d'ADN fœtal libre circulant dans le plasma maternel. Ces quinze dernières années ont vu l'amélioration des techniques de PCR. La performance diagnostique du génotypage RHD fœtal est aujourd'hui satisfaisante permettant un usage efficace en pratique courante. Les données fournies par notre méta-analyse ainsi que par notre étude originale permettent d'attester d'une très bonne sensibilité et spécificité de cette technique au premier trimestre de la grossesse. L'emploi du génotypage RHD fœtal non invasif est malheureusement limité par l'absence de sa prise en charge par l'assurance maladie malgré les avis positifs émis par la HAS.

Par analogie à la détermination non invasive du statut RHD fœtal, d'autres techniques sont en cours d'évaluation dans le domaine de l'hémiobiologie périnatale (Scheffer et al., 2011). On citera notamment le génotypage non invasif Kell et RHc (RH4), les plus à risque d'anémie fœtale après l'AIFM du système RHD. De façon plus générale, on peut espérer que l'accessibilité facile à du matériel génétique d'origine fœtale pourrait nous permettre à terme d'abandonner la voie invasive dans le domaine du diagnostic prénatal.

VII. Bibliographie

American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) (1996). Management of Isoimmunization in Pregnancy. ACOG Educational Bulletin #227

Akolekar, R., Finning, K., Kuppusamy, R., Daniels, G., and Nicolaides, K.H. (2011). Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11-13 weeks of gestation. *Fetal. Diagn. Ther.* 29, 301–306.

American Academy of Pediatrics Subcommittee on Hyperbilirubinemia (2004). Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics* 114, 297–316.

Avent, N.D., and Reid, M.E. (2000). The Rh blood group system: a review. *Blood* 95, 375–387.

Benachi, A., Delahaye, S., Leticee, N., Jouannic, J.-M., Ville, Y., and Costa, J.-M. (2012). Impact of non-invasive fetal RhD genotyping on management costs of rhesus-D negative patients: results of a French pilot study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 162, 28–32.

Bianchi, D.W. (1999). Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br. J. Haematol.* 105, 574–583.

Bombard, A.T., Akolekar, R., Farkas, D.H., VanAggmael, A.L., Aquino, F., Oeth, P., and Nicolaides, K.H. (2011). Fetal RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD negative women. *Prenat. Diagn.* 31, 802–808.

Bowman, J. (1997). The management of hemolytic disease in the fetus and newborn. *Semin. Perinatol.* 21, 39–44.

Brojer, E., Zupanska, B., Guz, K., Orzińska, A., and Kalińska, A. (2005). Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion* 45, 1473–1480.

Carbonne, B., Castaigne-Meary, V., Cynober, E., Gougeul-Tesnière, V., Cortey, A., Soulié, J.-C., Larsen, M., Méraud, B., Ansquer, Y., Milliez, J., et al. (2008). [Use of peak systolic velocity of the middle cerebral artery in the management of fetal anemia due to fetomaternal erythrocyte alloimmunization]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 37, 163–169.

Cardo, L., García, B.P., and Alvarez, F.V. (2010). Non-invasive fetal RHD genotyping in the first trimester of pregnancy. *Clin. Chem. Lab. Med.* 48, 1121–1126.

Chan, K.C.A., Ding, C., Gerovassili, A., Yeung, S.W., Chiu, R.W.K., Leung, T.N., Lau, T.K., Chim, S.S.C., Chung, G.T.Y., Nicolaides, K.H., et al. (2006). Hypermethylated

RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin. Chem.* 52, 2211–2218.

Chiaroni, J., Ferrera, V., Dettori, I., and Roubinet, F. (2006). Groupes sanguins érythrocytaires. EMC - Hématologie 1, 1–41.

Chilcott, J., Lloyd Jones, M., Wight, J., Forman, K., Wray, J., Beverley, C., and Tappenden, P. (2003). A review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of routine anti-D prophylaxis for pregnant women who are rhesus-negative. *Health Technol Assess* 7, iii–62.

Cortey A, M.A. (2012). Incompatibilités foeto-maternelles érythrocytaires. EMC - Pédiatrie 7, 1–22.

Cosmi, E., Mari, G., Delle Chiaie, L., Detti, L., Akiyama, M., Murphy, J., Stefos, T., Ferguson, J.E., 2nd, Hunter, D., Hsu, C.-D., et al. (2002). Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia resulting from parvovirus infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 187, 1290–1293.

Costa, J.-M., Giovangrandi, Y., Ernault, P., Lohmann, L., Nataf, V., El Halali, N., and Gautier, E. (2002). Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br. J. Haematol.* 119, 255–260.

Daffos, F., Capella-Pavlovsky, M., and Forestier, F. (1983). A new procedure for fetal blood sampling in utero: preliminary results of fifty-three cases. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 146, 985–987.

Daniels, G. (2009). The molecular genetics of blood group polymorphism. *Hum. Genet.* 126, 729–742.

Daniels, G., Finning, K., Martin, P., and Summers, J. (2006). Fetal blood group genotyping: present and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1075, 88–95.

Deka, D., Sharma, K.A., Dadhwal, V., Singh, A., Kumar, G., and Vanamail, P. (2013). Direct Fetal Intravenous Immunoglobulin Infusion as an Adjunct to Intrauterine Fetal Blood Transfusion in Rhesus-Allomunized Pregnancies: A Pilot Study. *Fetal. Diagn. Ther.*

Dooren, M.C., van Kamp, I.L., Scherpenisse, J.W., Brand, R., Ouwehand, W.H., Kanhai, H.H., Engelfriet, C.P., and Gravenhorst, J.B. (1994). No beneficial effect of low-dose fetal intravenous gammaglobulin administration in combination with intravascular transfusions in severe Rh D haemolytic disease. *Vox Sang.* 66, 253–257.

Dricot, J.F., Minon, J.M., Schaaps, J.P., Dewez, P., and Foidart, J.M. (2006). [Fetal RHD in maternal plasma in prenatal follow-up]. *Rev Med Liege* 61, 820–826.

Duckett, J.R., and Constantine, G. (1997). The Kleihauer technique: an accurate method of quantifying fetomaternal haemorrhage? *Br J Obstet Gynaecol* 104, 845–846.

Ehrich, M., Deciu, C., Zwiefelhofer, T., Tynan, J.A., Cagasan, L., Tim, R., Lu, V., McCullough, R., McCarthy, E., Nygren, A.O.H., et al. (2011). Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 204, 205.e1–11.

Fan, H.C., Gu, W., Wang, J., Blumenfeld, Y.J., El-Sayed, Y.Y., and Quake, S.R. (2012). Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome. *Nature* 487, 320–324.

Finning, K.M., Martin, P.G., Soothill, P.W., and Avent, N.D. (2002). Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 42, 1079–1085.

Freeman, K., Szczepura, A., and Osipenko, L. (2009). Non-invasive fetal RHD genotyping tests: a systematic review of the quality of reporting of diagnostic accuracy in published studies. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 142, 91–98.

Fung Kee Fung, K., Eason, E., Crane, J., Armson, A., De La Ronde, S., Farine, D., Keenan-Lindsay, L., Leduc, L., Reid, G.J., Aerde, J.V., et al. (2003). Prevention of Rh alloimmunization. *J Obstet Gynaecol Can* 25, 765–773.

Gautier, E., Benachi, A., Giovangrandi, Y., Ernault, P., Olivi, M., Gaillon, T., and Costa, J.-M. (2005). Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192, 666–669.

Geifman-Holtzman, O., Grotegut, C.A., and Gaughan, J.P. (2006). Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood--a meta-analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 195, 1163–1173.

Guibert, J., Benachi, A., Grebille, A.-G., Ernault, P., Zorn, J.-R., and Costa, J.-M. (2003). Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum. Reprod.* 18, 1733–1736.

Hammerman, C., Vreman, H.J., Kaplan, M., and Stevenson, D.K. (1996). Intravenous immune globulin in neonatal immune hemolytic disease: does it reduce hemolysis? *Acta Paediatr.* 85, 1351–1353.

Hawk, A.F., Chang, E.Y., Shields, S.M., and Simpson, K.N. (2013). Costs and clinical outcomes of noninvasive fetal RhD typing for targeted prophylaxis. *Obstet Gynecol* 122, 579–585.

Hermann, M., Poissonnier, M.-H., Grangé, G., Bernaux, M., Lefèvre, M., Tsatsaris, V., and Lepercq, J. (2011). Intérêt du pic systolique de vélocité dans l'artère cérébrale moyenne en fin de grossesse après exsanguino-transfusions itératives. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de La Reproduction* 40, 675–681.

Van Kamp, I.L., Klumper, F.J.C.M., Oepkes, D., Meerman, R.H., Scherjon, S.A., Vandenbussche, F.P.H.A., and Kanhai, H.H.H. (2005). Complications of intrauterine intravascular transfusion for fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192, 171–177.

Kim, Y.A., and Makar, R.S. (2012). Detection of fetomaternal hemorrhage. *Am. J. Hematol.* 87, 417–423.

Kleihauer, E., Braun, H., and Betke, K. (1957). [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. *Klin. Wochenschr.* 35, 637–638.

Klumper, F.J., van Kamp, I.L., Vandenbussche, F.P., Meerman, R.H., Oepkes, D., Scherjon, S.A., Eilers, P.H., and Kanhai, H.H. (2000). Benefits and risks of fetal red-cell transfusion after 32 weeks gestation. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 92, 91–96.

Krauss, J.S., Fadel, H.E., Squires, J., and Baisden, C.R. (1983). Detection of fetal-maternal hemorrhage in a mother with sickle trait and hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Transfusion* 23, 530–531.

Liley, A.W. (1961). Liquor amni analysis in the management of the pregnancy complicated by resus sensitization. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 82, 1359–1370.

Lo, Y.M., Bowell, P.J., Selinger, M., Mackenzie, I.Z., Chamberlain, P., Gillmer, M.D., Littlewood, T.J., Fleming, K.A., and Wainscoat, J.S. (1993). Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. *Lancet* 341, 1147–1148.

Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., and Wainscoat, J.S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350, 485–487.

Lo, Y.M., Tein, M.S., Lau, T.K., Haines, C.J., Leung, T.N., Poon, P.M., Wainscoat, J.S., Johnson, P.J., Chang, A.M., and Hjelm, N.M. (1998). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 768–775.

Machado, I.N., Castilho, L., Pellegrino, J., Jr, and Barini, R. (2006). Fetal rhd genotyping from maternal plasma in a population with a highly diverse ethnic background. *Rev Assoc Med Bras* 52, 232–235.

Mari, G., Rahman, F., Olofsson, P., Ozcan, T., and Copel, J.A. (1997). Increase of fetal hematocrit decreases the middle cerebral artery peak systolic velocity in pregnancies complicated by rhesus alloimmunization. *J Matern Fetal Med* 6, 206–208.

Mari, G., Deter, R.L., Carpenter, R.L., Rahman, F., Zimmerman, R., Moise, K.J., Jr, Dorman, K.F., Ludomirsky, A., Gonzalez, R., Gomez, R., et al. (2000). Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *N. Engl. J. Med.* 342, 9–14.

Metafor: Viechtbauer, Wolfgang. "Conducting meta-analyses in R with the metafor package." *Journal of* 36 (2010).

Modanlou, H.D., and Murata, Y. (2004). Sinusoidal heart rate pattern: Reappraisal of its definition and clinical significance. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 30, 169–180.

Moise, K.J., Jr (2008). Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol* 112, 164–176.

Moise, K.J., Jr, Boring, N.H., O'Shaughnessy, R., Simpson, L.L., Wolfe, H.M., Baxter, J.K., Polzin, W., Eddleman, K.A., Hassan, S.S., Skupski, D., et al. (2013). Circulating cell-free fetal DNA for the detection of RHD status and sex using reflex fetal identifiers. *Prenat. Diagn.* 33, 95–101.

Murray, N.A., and Roberts, I.A.G. (2007). Haemolytic disease of the newborn. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 92, F83–88.

OpenMetaAnalyst: Wallace, Byron C., Issa J. Dahabreh, Thomas A. Trikalinos, Joseph Lau, Paul Trow, and Christopher H. Schmid. "Closing the Gap between Methodologists and End-Users: R as a Computational Back-End." *Journal of Statistical Software* 49 (2012): 5."

Radel, D.J., Penz, C.S., Dietz, A.B., and Gastineau, D.A. (2008). A combined flow cytometry-based method for fetomaternal hemorrhage and maternal D. *Transfusion* 48, 1886–1891.

Randen, I., Hauge, R., Kjeldsen-Kragh, J., and Fagerhol, M.K. (2003). Prenatal genotyping of RHD and SRY using maternal blood. *Vox Sang.* 85, 300–306.

Rijnders, R.J.P., Christiaens, G.C.M.L., Bossers, B., van der Smagt, J.J., van der Schoot, C.E., and de Haas, M. (2004). Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Obstet Gynecol* 103, 157–164.

Rosenkrantz, T.S., and Oh, W. (1982). Cerebral blood flow velocity in infants with polycythemia and hyperviscosity: effects of partial exchange transfusion with Plasmanate. *J. Pediatr.* 101, 94–98.

Rouillac-Le Sciellour, C., Sérazin, V., Brossard, Y., Oudin, O., Le Van Kim, C., Colin, Y., Guidicelli, Y., Menu, M., and Cartron, J.-P. (2007). Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD. *Transfus Clin Biol* 14, 572–577.

Scheffer, P.G., de Haas, M., and van der Schoot, C.E. (2011). The controversy about controls for fetal blood group genotyping by cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Curr. Opin. Hematol.* 18, 467–473.

Scheffer, P.G., van der Schoot, C.E., Page-Christiaens, G.C.M.L., and de Haas, M. (2011). Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and of K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience. *BJOG* 118, 1340–1348.

Scheier, M., Hernandez-Andrade, E., Fonseca, E.B., and Nicolaidis, K.H. (2006). Prediction of severe fetal anemia in red blood cell alloimmunization after previous intrauterine transfusions. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 195, 1550–1556.

Sedrak, M., Hashad, D., Adel, H., Azzam, A., and Elbeltagy, N. (2011). Use of free fetal DNA in prenatal noninvasive detection of fetal RhD status and fetal gender by molecular analysis of maternal plasma. *Genet Test Mol Biomarkers* 15, 627–631.

Singleton, B.K., Green, C.A., Avent, N.D., Martin, P.G., Smart, E., Daka, A., Narter-Olaga, E.G., Hawthorne, L.M., and Daniels, G. (2000). The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 95, 12–18.

Srivorakun, H., Fucharoen, G., Sae-Ung, N., Sanchaisuriya, K., Ratanasiri, T., and Fucharoen, S. (2009). Analysis of fetal blood using capillary electrophoresis system: a simple method for prenatal diagnosis of severe thalassemia diseases. *Eur. J. Haematol.* 83, 57–65.

Szczepura, A., Osipenko, L., and Freeman, K. (2011). A new fetal RHD genotyping test: costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales. *BMC Pregnancy Childbirth* 11, 5.

Tsui, D.W., Chiu, R.W., and Lo, Y.D. (2010). Epigenetic approaches for the detection of fetal DNA in maternal plasma. *Chimerism* 1, 30–35.

Voto, L.S., Mathet, E.R., Zapaterio, J.L., Orti, J., Lede, R.L., and Margulies, M. (1997). High-dose gammaglobulin (IVIG) followed by intrauterine transfusions (IUTs): a new alternative for the treatment of severe fetal hemolytic disease. *J Perinat Med* 25, 85–88.

Wagner, F.F., and Flegel, W.A. (2000). RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 95, 3662–3668.

Wagner, F.F., and Flegel, W.A. (2002). RHCE represents the ancestral RH position, while RHD is the duplicated gene. *Blood* 99, 2272–2274.

White, H.E., Dent, C.L., Hall, V.J., Crolla, J.A., and Chitty, L.S. (2012). Evaluation of a Novel Assay for Detection of the Fetal Marker RASSF1A: Facilitating Improved Diagnostic Reliability of Noninvasive Prenatal Diagnosis. *PLoS One* 7.

Wikman, A.T., Tiblad, E., Karlsson, A., Olsson, M.L., Westgren, M., and Reilly, M. (2012). Noninvasive single-exon fetal RHD determination in a routine screening program in early pregnancy. *Obstet Gynecol* 120, 227–234.

Al-Yatama, M.K., Mustafa, A.S., Al-Kandari, F.M., Khaja, N., Zohra, K., Monem, R.A., and Abraham, S. (2007). Polymerase-chain-reaction-based detection of fetal rhesus D and Y-chromosome-specific DNA in the whole blood of pregnant women during different trimesters of pregnancy. *Med Princ Pract* 16, 327–332.

Zalpuri, S., Zwaginga, J.J., le Cessie, S., Elshuis, J., Schonewille, H., and van der Bom, J.G. (2012). Red-blood-cell alloimmunization and number of red-blood-cell transfusions. *Vox Sang.* 102, 144–149.

Zhang, J., Fidler, C., Murphy, M.F., Chamberlain, P.F., Sargent, I.L., Redman, C.W., Hjelm, N.M., Wainscoat, J.S., and Lo, Y.M. (2000). Determination of fetal RhD status by maternal plasma DNA analysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 906, 153–155.

Zhou, L., Thorson, J.A., Nugent, C., Davenport, R.D., Butch, S.H., and Judd, W.J. (2005). Noninvasive prenatal RHD genotyping by real-time polymerase chain reaction using plasma from D-negative pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 193, 1966–1971.

Zipursky, A., and Paul, V.K. (2011). The global burden of Rh disease. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 96, F84–85.

VIII. Annexes

Lo et al., 1998. “Prenatal Diagnosis of Fetal RhD Status by Molecular Analysis of Maternal Plasma.”.....	P82
Zhang et al., 2000. “Determination of Fetal RhD Status by Maternal Plasma DNA Analysis.”.....	P84
Costa et al., 2002. “Fetal RHD Genotyping in Maternal Serum During the First Trimester of Pregnancy.”.....	P85
Finning et al., 2002. “Prediction of Fetal D Status from Maternal Plasma.”.....	P87
Randen et al., 2003. “Prenatal Genotyping of RHD and SRY Using Maternal Blood.”	P88
Rouillac-Le Sciellour et al., 2004. “Large-scale Pre-diagnosis Study of Fetal RHD Genotyping by PCR on Plasma DNA from RhD-negative Pregnant Women.”.....	P90
Brojer et al., 2005. “Noninvasive Determination of Fetal RHD Status by Examination of Cell-free DNA in Maternal Plasma.”.....	P92
Dricot et al., 2006. “Le génotype RhD fœtal sur sang maternel dans le suivi prénatal des patientes RHD négatif.”.....	P94
Machado et al., 2006. “Fetal RhD Genotyping from Maternal Plasma in a Population with a Highly Diverse Ethnic Background.”.....	P94
Al-Yatama et al., 2007. “Polymerase-chain-reaction-based Detection of Fetal Rhesus D and Y-chromosome-specific DNA in the Whole Blood of Pregnant Women During Different Trimesters of Pregnancy.”.....	P95
Minon et al., 2008. “Routine Fetal RHD Genotyping with Maternal Plasma.”.....	P96
Cardo et al., 2010. “Non-invasive Fetal RHD Genotyping in the First Trimester of Pregnancy.”.....	P98
Sedrak et al., 2011. “Use of Free Fetal DNA in Prenatal Noninvasive Detection of Fetal RhD Status and Fetal Gender by Molecular Analysis of Maternal Plasma.”.....	P100
Akolekar et al., 2011. “Fetal RHD Genotyping in Maternal Plasma at 11-13 Weeks of Gestation.”.....	P101
Bombard et al., 2011. “Fetal RHD Genotype Detection from Circulating Cell-free Fetal DNA in Maternal Plasma in Non-sensitized RhD Negative Women.”.....	P102

Wikman et al., 2012. “Noninvasive Single-exon Fetal RHD Determination in a Routine Screening Program in Early Pregnancy.”.....	P103
Moise et al., 2013. “Circulating Cell-free Fetal DNA for the Detection of RHD Status and Sex Using Reflex Fetal Identifiers.”	P104

Lo et al., 1998. “Prenatal Diagnosis of Fetal RhD Status by Molecular Analysis of Maternal Plasma.”

Matériels et méthodes

L'équipe de Denis Lo, pionnière du diagnostic prénatal non invasif, a inclus de façon prospective un contingent de 57 patientes RHD négatives, dont 12 au 1^{er} trimestre de la grossesse. Les patientes ont été prélevées au cours de visites prénatales de routine au sein de l'hôpital John Radcliffe (Université d'Oxford). Les échantillons ont bénéficié d'une extraction d'ADN du plasma par le QIAamp[®] Blood Kit (Qiagen[®]) et d'une amplification par PCR en temps réel de l'exon 10 impliquant 40 cycles de dénaturation/amplification. Le seuil de détection a été fixé à un Z-score de fluorescence de +10, calculé lors des 15 premiers cycles. Un contrôle interne d'extraction et d'amplification de l'ADN a utilisé le gène de la β -globine. On notera également l'utilisation de contrôles positifs et négatifs (30 sérums issus de donneurs de sangs phénotypés RHD positifs et négatifs). Le phénotypage RHD réalisé sur le sang de cordon ombilical à la naissance a constitué le test étalon.

Résultats

Sur les 12 échantillons du 1^{er} trimestre testés, 10 ont été correctement génotypés (7 VP et 3 VN) contre 2 échantillons incorrectement génotypés (2 FN) aboutissant à une sensibilité médiocre de 78% mais à une spécificité parfaite de 100%.

Conclusion et limites

Denis Lo souligne dès 1998 la faisabilité du génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle. Bien que meilleure lorsque le test est effectué tout trimestre confondu (Se = 94,8%), l'existence d'une sensibilité médiocre au 1^{er} trimestre n'est pas acceptable pour sa généralisation. Les 2 FN ne peuvent être expliqués par un défaut d'extraction et d'amplification car une fluorescence significative du gène de la β -globine a été notée dans l'intégralité des PCR. Ils proviennent de mères prélevées à 8 et 9 SA, un terme probablement trop précoce pour obtenir une quantité d'ADN fœtal libre satisfaisante. On notera l'absence d'informations concernant l'ethnie des patientes, limite récurrente dans ce

type de publications. Denis Lo n'a pas mentionné l'existence de problèmes logistiques de type « résultats indéterminés ».

Zhang et al., 2000. “Determination of Fetal RhD Status by Maternal Plasma DNA Analysis.”

Matériels et méthodes

Deux ans plus tard, Zhang, appartenant à l'équipe de Lo, rapporte de nouveaux résultats plus optimistes sur un panel de patientes dont l'effectif a doublé. Le recrutement est effectué sur des patientes RHD négatives allo-immunisées. Zhang a, cette fois-ci, effectué une amplification de l'exon 7 par PCR en temps réel (tests réalisés en duplicats). Des contrôles positifs et négatifs ont bien été inclus dans l'étude. Les modalités de recrutement des patientes et les tests étalons étaient similaires à l'étude précédente (Lo et al., 1998).

Résultats

Vingt patientes ont été incluses au 1^{er} trimestre. Les résultats concluent à une sensibilité de 100% (aucun FN) et à une spécificité de 91,7% (1 FP).

Conclusion et limites

L'amplification de l'exon 7, dans cette étude, a permis d'obtenir une sensibilité parfaite au 1^{er} trimestre (mais également aux 2 autres trimestres). L'existence de FP n'a pas la même valeur clinique que l'existence de FN : cette dernière pourrait aboutir à un risque d'allo-immunisation, ou pire, à un défaut de surveillance chez des patientes antérieurement allo-immunisées. Les auteurs suggèrent que la réalisation d'une PCR multiplexe avec combinaison des exons testés serait intéressante en terme de performance diagnostique. Les limites de cette étude sont similaires à l'étude précédente (Lo et al., 1998). On notera en plus l'absence de mention de contrôle d'extraction et d'amplification de l'ADN.

Costa et al., 2002. “Fetal RHD Genotyping in Maternal Serum During the First Trimester of Pregnancy.”

Matériels et méthodes

En 2002, Jean-Marc Costa publie une étude dont les forces sont doubles : elle s'intéresse spécifiquement au génotypage RHD au 1^{er} trimestre et il s'agit de l'étude ayant le plus gros effectif à la même date de publication. Les patientes étaient incluses, de façon prospective et bi-centrique, au décours d'une consultation de diagnostic prénatal, avant une éventuelle réalisation de prélèvement fœtal invasif (amniocentèse ou biopsie de trophoblaste). Les échantillons d'ADN fœtal libre ont été obtenus à partir du sérum maternel à la différence des études précédentes (Lo et al., 1998 ; Zhang et al., 2000) qui employaient le plasma maternel. L'amplification des séquences cibles (exon 10 et contrôle d'extraction et d'amplification de l'ADN génomique: gène de la superoxide dismutase) a été effectuée par PCR en temps réel en duplex (réalisation des tests en duplicats). Les contrôles positifs et négatifs ont également été mentionnés (respectivement : ADN issu de patientes RHD positif et tampon d'élution). La procédure en aveugle a été signifiée. La validation de la procédure de PCR en duplex a été effectuée avec réussite sur plus de 100 sérums de patientes RHD positifs et négatifs. Les tests étalons étaient représentés par une PCR sur liquide amniotique et / ou une sérologie sur sang de cordon à la naissance.

Résultats

Cent-six patientes ont été incluses, 4 patientes ont été exclues en raison d'une interruption médicale de grossesse. L'équipe de Costa rapporte une sensibilité et une spécificité de 100% (62 génotypes / phénotypes positifs et 40 génotypes / phénotypes négatifs)

Conclusion et limites

L'utilisation de l'exon 10 a abouti à une sensibilité et une spécificité parfaites sur un contingent confortable de patientes, au 1^{er} trimestre de la grossesse, et ce, malgré l'inclusion de patientes dès la 8^{ème} SA. On regrettera cependant l'absence de mention concernant l'origine ethnique des patientes, ne pouvant exclure un biais de recrutement. En

effet, bien qu'exceptionnelle dans la population caucasienne, l'existence de variants RHD s'observe plus régulièrement dans les populations africaines et pourrait aboutir à l'apparition de FP. Il s'agit de la 1^{ère} étude dont les performances offrent la possibilité d'un passage vers l'usage de routine. Un autre écueil potentiel est constitué par le recrutement de patientes à haut risque d'aneuploïdies chez qui la fraction fœtale d'ADN libre serait plus importante, notamment en cas de trisomie 21 confirmée (Lo et al., 1999 ; Spencer et al., 2003). On soulignera la parfaite corrélation entre la distribution des génotypes négatifs (40%) et positifs (60%) obtenus avec ce que l'on observe classiquement en population générale.

Finning et al., 2002. “Prediction of Fetal D Status from Maternal Plasma.”

Matériels et méthodes

L'équipe de Finning propose en 2002 un modèle de PCR multiplex qui permettrait de distinguer l'existence de variants du gène RHD, dont le pseudogène RHD ψ . Les patientes ont été incluses dans les mêmes conditions que l'étude précédente (Costa et al., 2002). L'amplification génomique a été effectuée sur du plasma maternel, à partir de couples d'amorces incluant les exons 4, 5, 6 et 10, ainsi que des couples d'amorces permettant d'amplifier le pseudogène RHD ψ uniquement. Les tests étalons étaient similaires à ceux utilisés par Costa et al. Un témoin d'extraction et d'amplification de l'ADN a été proposé par la détection du gène codant pour un récepteur de chimiokines (CCR5). Un contrôle interne (partiel) de l'extraction de l'ADN fœtal par amplification du gène SRY a été effectué.

Résultats

Cent trente-sept génotypages RHD ont été réalisés dont 19 au 1^{er} trimestre de grossesse. Tous les fœtus ont été correctement génotypés au 1^{er} trimestre de grossesse.

Conclusion et limites

L'intérêt que porte l'équipe de Finning aux polymorphismes du gène RHD lié à l'ethnie est justifié. Il est cependant fort regrettable qu'aucune mention de l'ethnie des patientes (ni des conjoints) incluses n'ait été faite. De plus, on notera l'absence de contrôles positifs ni négatifs dans la méthodologie employée. Bien qu'ayant une performance diagnostique parfaite, l'approche présentée ici paraît bien trop complexe et possiblement coûteuse pour un usage en pratique courante.

Randen et al., 2003. “Prenatal Genotyping of RHD and SRY Using Maternal Blood.”

Matériels et méthodes

Randen réalise un nouvel essai de génotypage du gène RHD associé au gène SRY, indépendant du terme. Il propose également une sous étude visant à observer l'influence des conditions de stockage (température environnante) des échantillons avant extraction de l'ADN, sur les quantités d'ADN obtenues. Les patientes incluses (RHD négatives) provenaient de divers centres norvégiens (sans précision). L'ADN a été extrait du plasma et amplifié par PCR en temps réel (50 cycles) impliquant l'exon 7 du gène RHD seul et/ou en duplex avec le gène SRY. Entre 2 et 5 réplicats ont été réalisés par échantillon. Les échantillons correspondant à des FP ont bénéficié, à posteriori, d'un contrôle d'extraction et d'amplification via le gène de la β -globine. Dix échantillons ont contribué à l'étude quantitative de l'ADN fœtal par PCR (amplification du gène RHD sans précision : exon7 ?). Les statuts sérologiques des nouveaux-nés ont servi de tests étalons.

Résultats

Un total de 290 *runs* de PCR a été réalisé (54 au 1^{er} trimestre), correspondant à 114 patientes. Concernant le 1^{er} trimestre, 9 fœtus ont été génotypés RHD positif (dont 3 FP) et 9 fœtus ont été génotypés RHD négatif (dont 2 FN) aboutissant à une sensibilité de 70% et à une spécificité de 75%. Les auteurs signalent un taux de discordance des réplicats de l'ordre de 28%. Avant extraction de l'ADN, la conservation des échantillons à température réfrigérée (<10°C) semble être meilleure qu'à température ambiante.

Conclusion et limites

Les écueils sont nombreux pour cette étude dont la puissance et la performance diagnostique au 1^{er} trimestre restent médiocres. Le schéma expérimental est peu rigoureux :

- Pas d'information concernant le recrutement des patientes (statut immunologique, contexte de prélèvement)

- Pas de justification de la multiplicité des réplicats et de la variation du nombre de runs d'un échantillon à l'autre
- Pas d'information sur d'éventuels résultats indéterminés
- Pas de contrôle systématique d'extraction et d'amplification de l'ADN (hors SRY chez les fœtus masculins : 1 seul génotypage SRY réalisé sur les 18 patientes du 1^{er} trimestre) : l'amplification du gène de la β -globine n'a été effectuée qu'à posteriori, après connaissance du statut FP.
- Pas d'information concernant le contrôle positif ni le contrôle négatif de la technique.

Les auteurs signalent néanmoins que tous les résultats FP provenaient de patientes caucasiennes (à l'exception d'une patiente pakistanaise), excluant avec quasi certitude l'implication du pseudogène RHD ψ : l'ingénieur responsable de la programmation de la PCR a été impliqué par les auteurs. Concernant les FN, les auteurs réfutent l'hypothèse de variants en raison de l'amplification de l'exon 7, au profit de l'hypothèse d'une insuffisance d'ADN fœtal. Cette hypothèse est renforcée par l'inclusion de patientes dès la 6^{ème} SA. La conclusion fournie par les auteurs est sans appel, indiquant l'impossibilité d'utilisation en pratique courante de cette méthode du fait de sa mauvaise sensibilité.

Rouillac-Le Sciellour et al., 2004. “Large-scale Pre-diagnosis Study of Fetal RHD Genotyping by PCR on Plasma DNA from RhD-negative Pregnant Women.”

Matériels et méthodes

Deux ans après les travaux de Costa, l'équipe de Christelle Rouillac-Le Sciellour a publié les résultats d'une nouvelle cohorte d'effectif supérieur à 100 fœtus pour le 1^{er} trimestre et près de 900 fœtus quelque soit le terme. L'amplification de l'ADN fœtal a été réalisée en duplicats par méthode de PCR en temps réel et de PCR conventionnelle. Les exons 7 et 10 ont été ciblés par l'amplification. Le recrutement des patientes s'est effectué de façon prospective : soit des patientes non immunisées à l'occasion d'une consultation de diagnostic prénatal, soit des patientes allo-immunisées lors du titrage des anticorps anti-RHD. Les tests étalons étaient représentés par une PCR sur liquide amniotique et / ou par une sérologie néonatale sur sang de cordon. En cas de génotypage RHD fœtal positif, un contrôle du patrimoine génétique maternel était effectué par PCR sur cellules mononuclées afin d'exclure l'existence d'un variant. En cas de génotypage RHD fœtal négatif, un 2^{ème} test était réalisé à au moins 2 semaines d'intervalle. L'utilisation de contrôles positifs et négatifs a bien été mentionnée.

Résultats

Un total de 106 examens a été réalisé au 1^{er} trimestre de grossesse, avec une sensibilité de 98,5% et une spécificité de 94,7% (2 FN rattrapés lors d'un nouveau prélèvement à 2 semaines d'intervalle et 1 faux positif lié à un pseudogène RHD ψ hérité du père). Le taux d'examens non concluants a été fourni, mais uniquement pour l'ensemble des trimestres (sans précision pour le 1^{er} trimestre).

Conclusion

Il s'agit ici d'une publication à la méthodologie robuste objectivant une très bonne performance diagnostique. D'un point de vu expérimental, l'utilisation de la PCR conventionnelle en duplicat de la PCR en temps réel est valide mais difficilement

applicable à un usage de routine. En effet, elle nécessite plus de temps dans sa réalisation. De plus, les risques de contamination sont plus importants et sa spécificité est moins bonne pour une sensibilité équivalente à la PCR en temps réel. On signalera cependant dans cette étude, l'absence de contrôle d'extraction et d'amplification de l'ADN ainsi que l'absence de témoins de présence d'ADN fœtal en quantité suffisante. Ces derniers auraient probablement permis d'éviter l'existence des 2 FN de cette étude.

Brojer et al., 2005. “Noninvasive Determination of Fetal RHD Status by Examination of Cell-free DNA in Maternal Plasma.”

Matériels et méthodes

L'équipe de Brojer a publié en 2005 une série de 30 génotypages au 1^{er} trimestre (issus d'une cohorte de 321 génotypages). L'originalité de leur approche réside dans la tentative de pallier au problème du contrôle de l'extraction de l'ADN fœtal. Ils ont procédé par amplification par PCR en temps réel (exons 7, 10 et intron 4). Le phénotypage RHD sur sang de cordon à la naissance constituait l'étalon or. Les auteurs ont procédé à un génotypage du gène SRY qui servait de contrôle d'extraction de l'ADN fœtal chez les garçons. En cas de concordance (RHD+/SRY+ ou RHD-/SRY-), les auteurs concluaient au statut RHD. En cas de discordance, (RHD+/SRY- ou RHD-/SRY+), une analyse en duplicat était effectuée. En cas de génotypage RHD-/SRY-, une étude de polymorphismes était effectuée : un panel de gènes chez la mère (prélèvement de la fraction cellulaire) et chez le père était testé afin d'isoler un gène candidat (absent chez la mère et présent chez le père) : ce gène candidat était ensuite testé en duplicat sur le plasma maternel. Un contrôle interne de l'extraction de l'ADN total par amplification du gène codant pour la β -actine était effectué. Les auteurs ont par ailleurs réalisé une étude annexe concernant les modalités de conservation du plasma ainsi que sur le rendement d'extraction de l'ADN par différents types de kits commerciaux.

Résultats

Trente génotypages RHD contributifs ont été réalisés au 1^{er} trimestre : 1 FP, 2 FN (sensibilité = 90,5%, spécificité = 88,9%). Indépendamment du terme, les auteurs ont pu confirmer l'extraction d'ADN fœtal chez 69 des 75 fœtus génotype RHD négatif.

Conclusion

Il faut souligner la qualité des informations fournies concernant les échecs techniques, notamment les discordances entre les répliquats de PCR. En revanche, aucune information concernant le recrutement des patientes n'est fournie. Nous noterons également un risque d'erreur technique lié à l'ouverture des tubes de prélèvement lorsqu'il s'agissait de tubes

secs (risques de contamination). De plus, les auteurs n'ont cherché à confirmer l'extraction de l'ADN fœtal qu'en cas de génotypage RHD négatif, ne tenant pas compte du risque de résultat faussement positif en l'absence de matériel génomique d'origine fœtale.

Nous présenterons succinctement les résultats des 3 prochaines études dont les effectifs au 1^{er} trimestre sont faibles.

Dricot et al., 2006. “Le génotype RhD fœtal sur sang maternel dans le suivi prénatal des patientes RHD négatif.”

Seuls 10 génotypages ont été effectués au 1^{er} trimestre, dans cette étude, dont les aspects techniques sont peu détaillés. En synthèse, les auteurs concluent à la possibilité de mettre en place une immunoprophylaxie ciblée à 28 SA des patientes RHD - et au génotype fœtal RhD + en raison de la bonne performance diagnostique de leur test (PCR des exons 4, 5 et 10).

Machado et al., 2006. “Fetal Rhd Genotyping from Maternal Plasma in a Population with a Highly Diverse Ethnic Background.”

Machado et al. ont effectué des génotypages RHD par une technique de PCR conventionnelle qui comporte un temps obligatoire de migration sur gel d'agarose. Leur cohorte comporte une forte hétérogénéité ethnique (européens, africains, indigènes). Quinze patientes ont bénéficié du génotypage au cours du 1^{er} trimestre (18,5% de la cohorte). Les auteurs mentionnent un taux de résultats indéterminés de 7,4% obtenus uniquement au 2^{ème} et 3^{ème} trimestre. On note l'existence d'un résultat FN, aboutissant à une sensibilité de près de 91% (spécificité de 100%). Aucune précision n'est donnée concernant le résultat FP (terme de réalisation notamment).

Al-Yatama et al., 2007. “Polymerase-chain-reaction-based Detection of Fetal Rhesus D and Y-chromosome-specific DNA in the Whole Blood of Pregnant Women During Different Trimesters of Pregnancy.”

Il s'agit d'une étude conjointe des génotypes RHD et SRY par PCR conventionnelle. Les auteurs ont inclus 14 patientes au 1^{er} trimestre (6 à 13 SA). Ils ont introduit les différents contrôles nécessaires à la bonne réalisation de la PCR (témoin positif, témoin négatif, contrôle d'extraction). La sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 100% et 85,7%, cependant, l'analyse de l'ensemble des génotypes RHD (indépendante du terme) objective une spécificité insuffisante (81,0%).

Minon et al., 2008. “Routine Fetal RHD Genotyping with Maternal Plasma.”

Matériels et méthodes

Jean-Marc Minon a conduit en 2008 une série prospective de 563 génotypages RHD associés à SRY, dont 39 avaient été réalisés avant 14 SA, par PCR en temps réel. Il s’est servi d’une approche multi-exons (4, 5, 10) afin de limiter le risque de faux positifs que l’on peut observer dans des populations RHD ψ ou hybrides RHD-CE-D.

Trente-neuf patientes ont été incluses au 1^{er} trimestre. Les oligonucléotides employés pour la PCR avaient déjà fait la preuve de leur efficacité (Finning et al., 2002 ; Lo et al., 1998). Les PCR ont été effectuées en duplicat afin d’améliorer la sensibilité. L’amplification de SRY (associé au gène codant pour le récepteur de chimiokine CCR5) a servi de contrôle d’extraction de l’ADN fœtal pour les fœtus masculins. Un fœtus était considéré comme RHD positif lorsqu’au moins un des deux duplicats aboutissait à un résultat positif pour l’ensemble des 3 exons amplifiés. En cas de résultats discordants, une procédure complexe était mise en route, impliquant la réalisation d’une PCR selon les mêmes modalités, sur les cellules mononuclées sanguines maternelles et paternelles. En cas d’amplification isolée de l’exon 10, une PCR conventionnelle (sur le même matériel), était effectuée afin d’objectiver l’existence de variants type RHD ψ ou RHD-CE-D.

Résultats

Sur les 39 génotypages RHD effectués au 1^{er} trimestre, on note une parfaite corrélation (sensibilité = 100% ; spécificité = 100%) entre les génotypes et les phénotypes réalisés à la naissance sur sang de cordon. Les auteurs rapportent l’exclusion à posteriori d’un résultat FP (génotypage anténatal RHD positif / SRY positif – phénotype naissance : RHD négatif / fille). L’histoire de cette patiente était marquée par une greffe rénale issue d’un homme RHD positif.

Conclusion

Malgré un faible effectif au 1^{er} trimestre, l’équipe de Minon rapporte une excellente performance diagnostique de la PCR en temps réel avec amplification de 3 exons. Son

équipe a cherché à limiter au maximum l'obtention de résultats non interprétables, ce qui, par conséquent, complexifie notablement une procédure destinée à un usage en routine.

Cardo et al., 2010. “Non-invasive Fetal RHD Genotyping in the First Trimester of Pregnancy.”

Matériels et méthodes

Il s'agit de la 2^{ème} étude ciblant spécifiquement le génotypage RHD fœtal au 1^{er} trimestre de la grossesse. L'année 2010 marque la fin des essais impliquant la PCR conventionnelle et également l'amplification de l'exon 10. Les patientes ont été incluses de façon rétrospective : les sérums ayant servi au programme de dépistage des aneuploïdies au 1^{er} trimestre ont été employés pour la réalisation des génotypages. Le génotypage RHD a été obtenu par amplification (PCR multiplex en temps réel) des exons 5 et 7. L'auteur fait mention de la réalisation des manipulations en triplicats. Le fœtus était considéré comme RHD positif lorsqu'au moins chaque exon était amplifié (en duplicat) ou, lorsqu'uniquement l'exon 5 était amplifié. En cas de discordance (exon 5 négatif, exon 7 positif), le résultat rendu était ininterprétable (implication possible du pseudogène RHD ψ). Les auteurs ont utilisé des contrôles témoins positif et négatif ainsi qu'un contrôle de l'extraction et de l'amplification de l'ADN (gène de la β -globine).

Résultats

L'analyse de 111 sérums du 1^{er} trimestre à l'aide de l'amplification de 2 exons a permis d'obtenir une sensibilité de 100% ainsi qu'une spécificité de 93%. Deux résultats étaient ininterprétables. On notera l'absence non négligeable de données postnatales (phénotypes) recueillies pour 11 patientes (9,9%). En ne tenant compte que d'une amplification mono-exonique, on obtient des sensibilités de 96,5% (exon 5) et de 91,2% (exon 7). Les auteurs objectivent également une absence d'influence du terme, ni du sexe fœtal, sur la concentration en ADN fœtal libre circulant.

Conclusion

Les auteurs démontrent la faisabilité du génotypage par PCR en temps réelle par l'amplification des exons 5 et 7 avec des résultats tout à fait satisfaisants au 1^{er} trimestre. La perte d'information liée au caractère rétrospectif est cependant préjudiciable pour la

qualité de l'étude. Compte tenu du très faible nombre de résultats indéterminés, la proportion de patientes porteuses du pseudogène RHD ψ semble être sous-représentée.

Sedrak et al., 2011. “Use of Free Fetal DNA in Prenatal Noninvasive Detection of Fetal RhD Status and Fetal Gender by Molecular Analysis of Maternal Plasma.”

Matériels et méthodes

Cette équipe égyptienne a effectué une étude prospective par PCR en temps réel avec étude conjointe des génotypages RHD et SRY. Le protocole d'amplification est classique (amplification des exons 5 et 7 du gène RHD). Tous les contrôles / témoins ont bien été respectés. Aucune information n'est donnée sur la réalisation de réplicats. Les inclusions au 1^{er} trimestre ont débuté dès la 7^{ème} SA.

Résultats

Cinquante-cinq génotypages ont été réalisés au 1^{er} trimestre. Deux résultats FN ont été signalés, aboutissant à une sensibilité de 93,5%. De même, 2 FP ont été objectivés (spécificité de 96,7%). Ces quatre résultats non conformes étaient en lien avec des prélèvements précoces (8 SA, 8 SA, 10 SA et 11 SA). Les auteurs n'ont pas fait mention de résultats indéterminés (oubli ? aucun résultat indéterminé ?).

Conclusion

En raison d'un faible effectif, 2 résultats FN grèvent la performance diagnostique du génotypage RHD au 1^{er} trimestre. Cela ne pose pas de problème majeur dans une démarche de prévention de l'allo-immunisation RHD. Mais lorsqu'il s'agit d'alléger la surveillance d'une patiente déjà allo-immunisée, ces résultats ne sont pas acceptables. Cependant dans cette étude, la limitation de la prescription des génotypages rhésus à partir de la 12^{ème} SA permet d'aboutir à une sensibilité parfaite (100%). Il est à noter que la sensibilité globale du génotypage SRY semble meilleure que celle du génotypage RHD à un terme inférieur à 10SA.

Akolekar et al., 2011. “Fetal RHD Genotyping in Maternal Plasma at 11-13 Weeks of Gestation.”

Matériels et méthodes

L'équipe de Ranjit Akolekar et de Kypros Nicolaides a procédé à une analyse spécifique du génotypage RHD fœtal entre la 11^{ème} et la 13^{ème} SA sur une large population. De plus, le temps d'extraction de l'ADN fœtal libre circulant a été automatisé, limitant les risques de contamination liés aux multiples manipulations. Ce génotypage RHD a été proposé aux patientes bénéficiant dans le même temps du dépistage combiné de la trisomie 21 au 1^{er} trimestre. L'amplification par PCR en temps réel a concerné les exons 5 et 7. Les auteurs se sont servis du gène CCR5 en tant que témoin d'extraction et d'amplification de l'ADN. Pour la première fois, un contrôle RHD ψ a été introduit (en plus des contrôles usuels). Les critères de positivité de la PCR ont bien été précisés (qualitatifs et quantitatifs).

Résultats

Cinq cent quatre-vingt onze patientes ont été incluses. L'ethnie caucasienne représentait $\frac{3}{4}$ des inclusions (contre près de 20% de patientes africaines). Cinq prélèvements (0,9%) se sont soldés par des échecs d'amplification (défaut d'amplification de CCR5). Au total, 502 résultats concluants (85,7%) ont été notés dont 6 FN (sensibilité de 98,2%) et 0 FP (spécificité de 100%).

Conclusion

Cette étude possède un schéma expérimental rigoureux. On appréciera particulièrement l'exhaustivité des auteurs dans les informations publiées. 85% des génotypes indéterminés ont été suivis d'un phénotypage positif. Ce résultat conforte la nécessité de considérer ces fœtus comme étant de rhésus positif jusqu'à preuve du contraire. Les résultats publiés par Akolekar et al., appuyés par un effectif confortable, confirment la bonne performance du génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle au premier trimestre de la grossesse, à partir de 11 SA.

Bombard et al., 2011. “Fetal RHD Genotype Detection from Circulating Cell-free Fetal DNA in Maternal Plasma in Non-sensitized RhD Negative Women.”

Matériels et méthodes

Alan Bombard, en collaboration avec Ranjit Akolekar, propose une nouvelle technique du génotypage RHD sur sang maternel. Cette dernière associe une amplification usuelle par PCR (exons 4, 5, 7, séquence de 37 paires de bases typique du RHD ψ), associée à une désorption-ionisation laser assistée par matrice à temps de vol (Matrix Assisted Laser Désorption Ionisation - Time of Flight : MALDI-TOF). Les auteurs ont intégré un contrôle d'extraction et d'amplification (gène codant pour TGIF) ainsi que des contrôles positif et négatif. Concrètement, les produits d'amplification de la PCR ont subi une étape de déphosphorylation puis une dernière étape d'amplification dite « single-base extension ». L'analyse des produits d'amplification et la détermination du génotype ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre de masse (couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice à un analyseur à temps de vol). Toutes les analyses ont été réalisées en duplicat.

Résultats

Deux cent trente-six sérums maternels ont été testés à un terme moyen de prélèvement de 12 SA $\frac{1}{2}$. Près de 20% des patientes prélevées étaient d'origine africaine, contre plus de 75% de caucasiennes. On dénombre un total de 4 FP (spécificité = 94,0%) et 2 FN (sensibilité = 98,6%). Seize génotypages (6,8%) se sont révélés indéterminés.

Discussion

Cette étude a permis de valider l'utilisation de la technologie MALDI-TOF dans le génotypage RHD au 1^{er} trimestre, en terme de non infériorité. Tous les critères de qualité sont réunis dans cette étude. On appréciera particulièrement l'intégration d'oligonucléotides visant la séquence RHD ψ , qui permet d'apporter des éléments de réponse sur les résultats indéterminés, bien que cela n'ait pas d'impact en terme de prise en charge clinique.

Wikman et al., 2012. “Noninvasive Single-exon Fetal RHD Determination in a Routine Screening Program in Early Pregnancy.”

Matériels et méthodes

Cette étude suédoise représente la plus grosse cohorte de patientes testées à ce jour. Il s'agit d'une étude prospective, multicentrique ayant permis de génotyper toutes les patientes RHD négatif lors de leur première consultation obstétricale. Les auteurs ont procédé à une analyse par PCR en temps réel avec amplification d'un seul exon (exon 4). Tous les contrôles de la procédure ont été inclus (hormis un témoin d'extraction d'ADN fœtal). Les résultats des génotypes RHD ont été comparés aux phénotypes obtenus à la naissance.

Résultats

Au total, 4118 patientes ont été incluses (pour 3652 phénotypes obtenus). Les trois-quarts des prélèvements ont été effectués au 1^{er} trimestre de la grossesse. Malheureusement, les auteurs n'ont pas stratifié les résultats des génotypages par trimestre. Cependant, tous trimestres confondus, la sensibilité est excellente (98,6%) pour un taux de résultats indéterminés relativement faible (0,8%).

Discussion

L'équipe de Wikman a permis d'objectiver une excellente performance de ce test employé en routine en Suède, qui a opté depuis 2009 pour une immunoprophylaxie ciblée. Aux vues de ces résultats, cette politique semble justifiée. Bien que les minorités ethniques soient moins représentées en Suède, on soulignera l'absence de mention des origines des patientes dans les résultats.

Moise et al., 2013. “Circulating Cell-free Fetal DNA for the Detection of RHD Status and Sex Using Reflex Fetal Identifiers.”

Matériels et méthodes

Moise, en collaboration avec Bombard, propose une détermination du génotype RHD associant l'amplification de 3 exons du gène RHD (4, 5, 7) à la séquence spécifique du pseudogène RHD ψ (insertion de 37 paires de bases dans l'exon 4). L'algorithme diagnostique prend en compte l'amplification de 3 marqueurs spécifiques du chromosome Y avec une étude de SNP (« single nucleotide polymorphism ») d'origine fœtale, permettant également de déterminer le génotype du sexe fœtal. Les auteurs ont employé la technologie MALDI-TOF précédemment décrite.

Résultats

Cent dix-huit génotypages RHD ont été effectués au 1^{er} trimestre permettant d'aboutir à une sensibilité de 98,6% et une spécificité de 94,6%. On note 9 résultats indéterminés (7,6%).

Discussion

Cette démarche diagnostique permet potentiellement d'améliorer la sensibilité et la spécificité du test au risque de majorer le taux de résultats indéterminés, la complexité du test ainsi que son coût.

Serment d'Hippocrate

Version originale publiée dans les Œuvres complètes d'Hippocrate. Trad. par Émile Littré.
Paris : J.-B. Baillière, 1844 . – Tome 4, pages 629-633

« Je jure par Apollon, médecin, par Esculape, par Hygie et Panacée, par tous les dieux et toutes les déesses, les prenant à témoin que je remplirai, suivant mes forces et ma capacité, le serment et l'engagement suivants : Je mettrai mon maître de médecine au même rang que les auteurs de mes jours, je partagerai avec lui mon avoir, et, le cas échéant, je pourvoirai à ses besoins ; je tiendrai ses enfants pour des frères, et, s'ils désirent apprendre la médecine, je la leur enseignerai sans salaire ni engagement. Je ferai part des préceptes, des leçons orales et du reste de l'enseignement à mes fils, à ceux de mon maître, et aux disciples liés par un engagement et un serment suivant la loi médicale, mais à nul autre. Je dirigerai le régime des malades à leur avantage, suivant mes forces et mon jugement, et je m'abstiendrai de tout mal et de toute injustice. Je ne remettrai à personne du poison, si on m'en demande, ni ne prendrai l'initiative d'une pareille suggestion. Je passerai ma vie et j'exercerai mon art dans l'innocence et la pureté. Je ne pratiquerai pas l'opération de la taille, je la laisserai aux gens qui s'en occupent. Dans quelque maison que j'entre, j'y entrerai pour l'utilité des malades, me préservant de tout méfait volontaire et corrompueur, et surtout de la séduction des femmes et des garçons, libres ou esclaves. Quoi que je voie ou entende dans la société pendant l'exercice ou même hors de l'exercice de ma profession, je tairai ce qui n'a jamais besoin d'être divulgué, regardant la discrétion comme un devoir en pareil cas. Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes ; si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire. »

TITRE

Performance diagnostique du génotypage rhésus D fœtal par prise de sang maternelle au premier trimestre de la grossesse

RESUME

Introduction : La détermination non invasive du génotype rhésus D (RHD) fœtal au cours de la grossesse a amélioré les modalités de prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle RHD ainsi que la prise en charge des situations d'incompatibilités fœto-maternelles érythrocytaires. Peu d'études se sont spécifiquement intéressées à la performance diagnostique du génotypage RHD au 1^{er} trimestre de la grossesse.

Méthode : Une revue de la littérature associée à une méta-analyse ainsi qu'une étude rétrospective originale de performance diagnostique du génotypage RHD fœtal non invasif avant la 14^{ème} semaine d'aménorrhée ont été effectuées.

Résultats : Quinze études ont été intégrées dans la méta-analyse permettant l'inclusion de 1328 patientes. La sensibilité globale est de 97,3% (IC95 : 95,9 - 98,3). La spécificité globale est de 91,1% (IC95 : 86,9 - 94,0). Dans l'étude originale, un total de 416 issues de grossesse a été recueilli objectivant une sensibilité de 100% et une spécificité de 95,5%.

Conclusion : Le génotypage RHD fœtal non invasif au 1^{er} trimestre de grossesse possède une bonne performance diagnostique.

TITLE

Diagnostic accuracy of non-invasive fetal rhesus D determination in the first trimester of pregnancy

ABSTRACT

Background: Non-invasive prenatal determination of the fetal rhesus D (RHD) status can be useful in the management of pregnancies of RHD negative women. It allows the identification of pregnancies at increased risk of immunization. Nevertheless, few studies have assessed the diagnostic accuracy of the RHD fetal genotyping in the first trimester of pregnancy.

Methods: A systematic review, with a meta-analysis, was performed. Then we assessed the performance of the first trimester RHD fetal genotyping in an original retrospective study.

Results: Fifteen trials were included (1328 patients) in the meta-analysis. The overall sensitivity was 97.3% (IC95 : 95.9 – 98.3). The overall specificity was 91.1% (IC95 : 86.9 – 94.0). In our retrospective study, 416 pregnancy outcomes were analyzed : the sensitivity was 100%, the specificity was 95.5%.

Conclusion: Our data demonstrate that fetal RHD genotyping can accurately be determined in the first trimester of pregnancy.

DISCIPLINE : Gynécologie-obstétrique (diagnostic prénatal)

MOTS-CLES : Génotypage, allo-immunisation rhésus, ADN fœtal libre circulant, diagnostic prénatal

KEY WORDS : Genotyping, rhesus isoimmunization, cell-free fetal DNA, prenatal diagnosis