



HAL
open science

Étude du polymorphisme du gène RHD chez les femmes enceintes rhésus D négatif : à partir des patientes ayant bénéficié d'une analyse du génotypage RHD fœtal sur sang maternel en région Provence-Alpes-Côte d'Azur - Corse - Monaco (2008-2014)

Loriane de Siano

► To cite this version:

Loriane de Siano. Étude du polymorphisme du gène RHD chez les femmes enceintes rhésus D négatif : à partir des patientes ayant bénéficié d'une analyse du génotypage RHD fœtal sur sang maternel en région Provence-Alpes-Côte d'Azur - Corse - Monaco (2008-2014). Gynécologie et obstétrique. 2016. dumas-01412325

HAL Id: dumas-01412325

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01412325>

Submitted on 8 Dec 2016

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.

AIX MARSEILLE UNIVERSITE
Ecole Universitaire de Maïeutique Marseille Méditerranée

**ETUDE DU POLYMORPHISME DU GENE RHD
CHEZ LES FEMMES ENCEINTES RHESUS D
NEGATIF : A partir des patientes ayant
bénéficiées d'une analyse du génotypage
RHD foetal sur sang maternel en région PACA-
CORSE-MONACO (2008-2014)**

Présenté et publiquement soutenu

Le 29 avril 2016

Par

DE SIANO Loriane née le 23 avril 1992

A Brignoles

Pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Sage-Femme

Directeur de mémoire : Dr Annie Levy-Mozziconacci

Maitre de Conférence des Universités Praticien Hospitalier

Responsable de l'unité fonctionnelle de biologie foeto-maternelle AP-
HM

AIX MARSEILLE UNIVERSITE
Ecole Universitaire de Maïeutique Marseille Méditerranée

**ETUDE DU POLYMORPHISME DU GENE RHD
CHEZ LES FEMMES ENCEINTES RHESUS D
NEGATIF :
A partir des patientes ayant bénéficiées d'une
analyse du génotypage RHD fœtal sur sang
maternel en région PACA-CORSE-MONACO (2008-
2014)**

DE SIANO Loriane

Née le 23 avril 1992

Pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Sage-Femme

Année universitaire 2016.

Validation session juin 2015

Mention :

Félicitations du jury

Très bien

Bien

Assez bien

Passable

Validation session septembre 2015

Visa de l'école

REMERCIEMENTS

Je tenais à remercier toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce mémoire :

Le Docteur Annie Levy-Mozicconacci ma Directrice de mémoire pour m'avoir fait découvrir ce sujet intéressant

Marthe Tsochandaridis, Ingénieur du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire de l'hôpital Nord pour sa disponibilité et son aide si précieuse.

Le Docteur Bernard Guisiano de m'avoir aidé pour les statistiques.

Mes parents et ma famille pour m'avoir toujours soutenu.

Mes copines, Alice, Elsa, Léa, Hélène, Salomé, Ludivine, Pauline, Mélissa pour leurs soutiens durant toutes ces années.

SOMMAIRE :

LISTE DES ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION	2
CONTEXTUALISATION	7
MATERIELS ET METHODES.....	17
RESULTATS	23
ANALYSE ET DISCUSSION	35
CONCLUSION	46
BIBLIOGRAPHIE.....	47
ANNEXES.....	51
TABLE DES MATIERES.....	67

LISTE DES ABREVIATIONS :

- **ADN** : acide désoxyribonucléique
- **ANAES** : agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé
- **AP-HM** : assistance publique des hôpitaux de Marseille
- **ARS** : agence régionale de santé
- **CH** : centre hospitalier
- **CHU** : centre hospitalier universitaire
- **CNGOF** : conseil national des gynécologues-obstétriciens Français
- **EFS** : établissement français du sang
- **HAS** : haute autorité de santé
- **HRM** : high resolution melting
- **IgG** : Immunoglobulines G
- **PACA** : Provence Alpes Cote d'Azur
- **PCR** : polymérisation en chaine
- **PHRC** : programme hospitalier de recherche clinique
- **RHD** : rhésus D
- **RQ-PCR** : polymérisation en chaine en temps réel
- **SA** : semaine d'aménorrhées

Introduction

L'allo-immunisation foëto-maternelle se définit par la production d'allo-anticorps maternels dirigés contre les antigènes portés par des figurés sanguins foëtaux provenant de gènes paternels, comme les hématies ou plaquettes.

Il existe une trentaine de groupes sanguins référencés (1). Dans la majorité des cas c'est le système Rhésus qui est impliqué dans ces réactions immunologiques.

En cas d'immunisation, une anémie hémolytique plus ou moins sévère peut-être retrouvée chez le foëtus et le nouveau-né.

Avant les années 1970, aucune recommandation n'avait été édictée par le Conseil National des Gynécologues-Obstétriciens Français (CNGOF).

La prévention a été initiée dans les années 1970 et a eu comme effet de réduire par un facteur 6 à 10 des allo-immunisations (2), en pratiquant une immunoprophylaxie ciblée sur les situations à risque d'hémorragie foëto-maternelle.

Devant la persistance d'immunisations résiduelles notamment au dernier trimestre, le CNGOF préconise, en 2005, une prévention prénatale systématique par l'injection immunoglobulines humaines anti-D à 28 semaines d'aménorrhées (SA).

Cependant, toutes ces mesures mises en place n'ont pas permis l'éradication de l'allo-immunisation érythrocytaire, son incidence est estimée de 0,1% à 0,7% avec une prévention systématique et ciblée. Un quart des allo-immunisations spontanées se font sans facteur de risque identifié. (2)

Plusieurs causes sont évoquées par le journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction ; un défaut d'application des recommandations (administration tardive, pas de test de Kleihauer réalisé, oubli) ou bien par l'échec d'une prévention bien réalisée. (3)

C'est en 1997 que Lo et son équipe mis en évidence de l'Acide Désoxyribonucléique (ADN) fœtal libre dans le sang maternel en quantité suffisante pour l'analyser (4).

Cette découverte ouvre de nouvelles perspectives quant au diagnostic prénatal non invasif (sexe fœtal, rhésus fœtal).

Le développement du génotypage RHD fœtal à partir du sang maternel a permis de prodiguer une immunoprophylaxie uniquement aux patientes RHD négatif portant un fœtus RHD positif.

Le génotypage fœtal sur sang maternel se place dans les recommandations grade B selon l'ANAES.

Ce grade découle d'une étude réalisée dans le cadre d'un PHRC en 2010, au sein de laboratoire de biochimie et biologie moléculaire de l'hôpital Nord, prouvant une performance diagnostique de 98,6% sur une cohorte de 400 patientes sur une étude prospective. (5)

Les recommandations pour le génotypage sont reportées en annexe I.

Environ 15 % de la population française est rhésus D négatif et il y a 150 000 à 165 000 patientes enceintes rhésus D négatif chaque année. Dans environ 40% des cas, les patientes RHD négatif sont enceintes de fœtus également RHD négatif et peuvent donc être dispensées d'immunoprophylaxie. (6).

Le phénotype RHD négatif est retrouvé à 15 à 17% dans la population Caucasienne, 3 à 5% en Afrique et à moins de 0,1% en Asie. (7)

Dans la population caucasienne, le phénotype RHD négatif est dans plus de 98% des cas associé à une délétion complète du gène RHD.(8)

A l'origine , l'analyse du génotypage Rhésus fœtal dans le sang maternel est basé sur la recherche du gène Rhésus D dans le sang maternel : sa présence signifiant donc obligatoirement que le fœtus est RHD positif

Il a été montré un polymorphisme géographique associé au gène Rhésus D. Ainsi la délétion n'est pas toujours associée au phénotype Rhésus D négatif.

On rapporte la présence d'un polymorphisme spécifique de certaine région comme le Pseudogène présent dans environ 67% des sujets RHD négatif d'Afrique subsaharienne (9).

De plus de nombreux variants du gène RHD ont été décrits (polymorphisme de type hybride : D-(CE)-D, Rhésus D faible, Rhésus D partiel).

Ces caractéristiques peuvent influencer la performance du test, la présence du polymorphisme RHD maternel pouvant occulter l'ADN fœtal et rendre le résultat inconclusif.

Le service de Biochimie et Biologie Moléculaire de l'Hôpital Nord effectue en routine hospitalière le génotypage du RHD fœtal sur sang maternel.

Les outils moléculaires utilisés ciblent 3 des 10 exons du gène (exons 5, 7 et 10) permettant de mettre en évidence la présence de polymorphisme du gène RHD provenant de la mère et de pouvoir rendre un résultat conclusif même pour les patientes présentant un polymorphisme RHD maternel de type hybride ou pseudogène.

Seules les patientes présentant un polymorphisme RHD de type Dfaible/Dpartiel ne peuvent avoir de résultat conclusif concernant le statut du RHD fœtal.

Pour la période 2008-2014, les patientes RHD négatif de la région PACA, Corse et Monaco ont bénéficié de la prise en charge par l'ARS du génotypage RHD fœtal effectué au service de Biochimie et Biologie Moléculaire de l'Hôpital Nord, centre de référence de l'ADN libre circulant.

Ce rayonnement conséquent a permis l'analyse de 22 134 patientes de 2008 à 2014 dont 602 cas de femmes enceintes présentant un polymorphisme du gène RHD.

Afin de mieux améliorer la prise en charge de ces patientes , il nous a semblé intéressant d'étudier la population présentant un polymorphisme du rhésus D dans la région PACA-Corse-Monaco et d'établir des liens entre génotype, phénotype et les origines géographiques.

La question de recherche est « En quoi les patientes enceintes présentant un polymorphisme du rhésus D peuvent-elles influencer la prise en charge immunoprophylactique de l'incompatibilité materno-fœtale en région PACA- Corse-Monaco ? »

Pour répondre à cette question, deux objectifs ont été dégagés :

L'objectif principal est d'étudier la population présentant un polymorphisme du rhésus D.

Le second est de corrélérer le gène faible à une catégorie de population afin d'en améliorer la prise en charge.

La finalité de cette étude serait de faire ressortir un lien entre les origines géographiques, le génotype et phénotype afin d'améliorer la prise en charge des patientes qui bénéficient actuellement d'une immunoprophylaxie inutile.

Ce travail a été effectué à partir des données de génotypages fait à l'Hôpital Nord et consignées dans une base de données. Pour répondre à l'objectif secondaire, une collaboration avec l'interne en biologie du laboratoire a été nécessaire pour effectuer les manipulations de biologie moléculaire.

Contextualisation

Allo-immunisation du rhésus D

Physiopathologie

Passage d'hématies fœtales à travers le compartiment maternel

L'allo-immunisation se produit lors du passage d'hématies fœtales présentant l'antigène RH:1 au niveau maternel. Les IgM maternelles vont se lier à l'antigène. Le complexe anticorps-antigène va être détruit par des phénomènes de lyses ou phagocytoses (10).

La probabilité de passage d'hématies fœtales est d'autant plus élevée que la grossesse évolue et que la gestité augmente. (2)

Le passage d'hématies est favorisé par des situations à risque. (Reportées en Annexe II).

Immuno-hémolyse fœtale et conséquences néonatales.

Au niveau fœtal et néonatal, la conséquence de l'hémolyse est l'anémie.

Des conséquences fœtales sont retrouvées lorsque l'hémoglobine est proche de 7g/dL au second semestre et 9 g/dL à terme. (11)

Une insuffisance cardiaque apparaît à cause de l'augmentation du travail et débit cardiaque. Le rythme cardiaque fœtal devient sinusoïdal (Annexe III).

Une anasarque plus ou moins réversible apparaît par épanchements des séreuses et production d'œdèmes.

En plus de l'anémie, l'ictère est retrouvé chez le nouveau-né car le foie prend le relais pour la conjugaison de la bilirubine à la naissance (qui était jusqu'à présent compensé par l'organisme maternel). Lorsque la glycu-conjugaison est dépassée, il apparaît un excès de bilirubine libre qui est neurotoxique.

Systeme groupe sanguin RH

Le système RH comporte des antigènes fréquemment impliqués dans l'incompatibilité materno-fœtale.

En effet, ce système est indépendant génétiquement, extrêmement polymorphe (50 antigènes identifiés) et de ce fait très immunogène.

Ces gènes se transmettent par théorie Mendélienne et s'expriment de façon autosomique récessive.

Le phénotype RH est codé par deux gènes :

- Le gène RHD codant l'antigène majeur RH 1 (D), la présence ou l'absence du gène à la surface des hématies permet de conclure sur le phénotype de l'individu. Trois combinaisons alléliques sont possibles aboutissant à deux phénotypes (rhésus dit positif : RHD positif et rhésus dit négatif RHD négatif).
- Le gène RHCE, codant pour RH 2 (C), RH 3 (E), RH 4 (c), RH 5 (e).

Ces deux gènes sont homologues (97% de la similarité) et leur organisation spatiale en « tête bêche » sur le chromosome 1 facilite leurs réarrangements génétiques créant des gènes hybrides appelés « variant RH ». (7)

Ces variants modifient l'expression génique qui a pour conséquence une variation du phénotype.

Génotypes RHD.

Génotypes RHD considérés comme phénotype RHD négatif (annexe I):

- **Délétion en totalité du gène RHD** : ce mécanisme est le plus fréquemment retrouvé chez les personnes dites D négatives, notamment chez les patients d'origine Européenne et Chinoise (12)

- **RHD pseudogène** : Dans certaines situations, le gène RHD est présent mais inapte à coder l'antigène RH1 (il est infructueux). Il est appelé pseudogène RHD Ψ , et au niveau génique il peut subir : une insertion de 37 paires de bases (pb) dans l'exon 4, une mutation dans l'exon 6 et des mutations ponctuelles (SNPs) sur les exons 4 et 5. Cela entraîne la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle et qui ne sera pas intégrée dans la membrane des hématies. Le gène RHD ψ est retrouvé chez 66% de la population africaine sub-saharienne de phénotype RHD négatif. (9)

- **Hybride RHD-(CE)-D** : Présence du gène RHD qui a subi des échanges d'exons avec le gène RHCE produit une gène hybride dit RHD-(CE)-D qui est incapable de produire l'antigène RH1.(13)

- **RHD faibles/partiels** : Présence du gène RHD avec des mutations ponctuelles sur un ou plusieurs exons du gène. Si la position de la mutation est au niveau de la partie transmembranaire de l'antigène D, le polymorphisme est dit D faible. Lorsqu'elle est au niveau de l'épitope, le polymorphisme est dit D partiel. Pour les D faibles, il s'agit de polymorphisme entraînant un nombre d'antigène RHD inférieur à celui retrouvé chez un individu RHD positif. Pour les D partiels, il s'agit de polymorphisme entraînant une modification de l'épitope de l'antigène D.
- **DEL** : c'est un variant de l'antigène D très faiblement exprimé et révélé seulement par une technique d'élution.

Polymorphismes RHD faibles considérés comme phénotype RHD positif

Certains polymorphismes RHD types D faibles peuvent être considérés comme RHD positif grâce au taux d'Antigènes suffisamment présents à la surface des hématies : les D faibles de types 1, 2 et 3. Les D faibles type 1 sont les plus communs en Europe (13).

Recommandations et Préventions

Les mesures générales mises en place pendant la grossesse ont été édictées par le collège national des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF) en 2005 revues en 2006.

Les recommandations concernant l'allo-immunisation Rhésus-D fœto-maternelle reposent sur deux types de préventions :

- Une prévention ciblée qui survient lorsqu'il existe un événement potentiellement immunisant quelque soit le terme de la grossesse. Les évènements « à risque » sont consignés dans un tableau et classés en fonction du terme de grossesse (Annexe II)

- Une prévention systématique :
 - Lors du 3^{ème} trimestre (Grade A), expliquée par la plus forte probabilité d'hémorragies fœto-maternelles spontanées. En l'absence de facteurs de risque identifiable, le passage d'hématies fœtales dans la circulation maternelle est estimé à 4% au premier trimestre, 12 % au second et 45 % au troisième. (2)

La prévention consiste en une injection d'Immunoglobulines anti-D de 300 µgrammes par voie intramusculaire à 28 semaines d'aménorrhées (plus ou moins une semaine)

- Post-natale en cas de nouveau-né RHD positif (groupage effectué au sang du cordon ombilical) (Grade A).

Les immunoglobulines sont d'origine exclusivement humaines. Elles proviennent de donneurs sains hyperimmunisés et rémunérés.

Eviter l'utilisation de ces produits humains aurait pour but d'irradier l'exposition inutile aux produits dérivés du sang dont le risque viral ne peut jamais être totalement isolé.

Environ un tiers des patientes RHD négatifs sont porteuses d'enfants RHD négatifs également. (14)

De ce constat, le CNGOF préconise en 2006 « L'utilisation systématique du génotypage fœtal chez les femmes RHD négatif dont le conjoint est RHD positif permettrait d'éviter les injections d'immunoglobulines anti-D, qu'elles soient d'indication ciblée ou systématique. »

Les recommandations pour le génotypage fœtal sur sang maternel sont reportées en annexe IV.

Appliquer le génotypage RHD fœtal de façon systématique à toutes les patientes enceintes de rhésus D négatifs reviendrait à une économie de 3,6 millions d'euros (coût immunoglobulines et coût administration). (15)

Le génotypage fœtal est une méthode sensible et spécifique démontré par plusieurs études (16). Cependant il reste inconclu pour les patientes portant un polymorphisme D faible/ D partiel.

Une économie d'autant plus importante en découlerait si l'analyse du D faible incluait sur certains critères, un certain phénotype ou une origine géographique.

Méthode de génotypage non invasive du RHD fœtal sur sang maternel

Extraction de l'ADN fœtal et Technique Polymérisation En Chaîne (PCR) quantitative en temps réel

Le génotypage du RHD fœtal comporte une étape d'extraction de l'ADN maternel et fœtal présents dans le plasma puis de l'analyse de celui-ci par PCR quantitative.

L'extraction de l'ADN est une technique de biologie moléculaire qui consiste à purifier l'ADN présent dans un échantillon par des étapes de lyse, de lavage et d'élution.

Entre chaque lavage, l'ADN est fixé sur une membrane de silice puis récupéré dans un tube lors de l'étape d'élution.

La polymérisation en chaîne est une technique d'amplification d'un fragment d'ADN spécifique grâce à l'utilisation de deux amorces (oligonucléotides de 20 paires de bases environ) se fixant de part et d'autre de la séquence cible, et de l'enzyme TAQ polymérase.

L'amplification d'un fragment peut se modéliser par une courbe sigmoïde qui se compose de deux phases (17) (Annexe V):

- une phase exponentielle modélisable. Au cours de celle-ci il existe un temps (Ct) à partir duquel on peut déduire le nombre de copies initiales d'ADN en fonction des produits de PCR obtenus.
- une phase en plateau difficilement modélisable, expliquée par l'épuisement des produits de réaction.

La réaction de PCR peut être suivie en temps réel par l'ajout d'une sonde fluorescente : il s'agit alors de PCR quantitative en temps réel.

C'est une sonde bi-marquée dont l'augmentation d'émission est proportionnelle au produit de PCR.

L'analyse des résultats de la PCR quantitative en temps réel s'effectue seulement sur une phase exponentielle à partir d'un Ct.

La chimie utilisée par la sonde est de type TAQMAN, c'est un oligonucléotide spécifique à la séquence visée et possédant une fonction exonucléase en 5'→3' polymérase. (Annexe VI)

Sur la partie 5' on retrouve un « reporter » et en 3' un « quencher », ce dernier permettant l'inhibition de l'excitation du reporter par sa proximité.

Si le quencher est dégradé par la polymérase, la fluorescence devient possible.

Les exons du gène RHD amplifiés lors de l'analyse de l'ADN fœtal par PCR quantitative sont les exons 5, 7 et 10.

La présence ou l'absence de ces séquences amplifiées permettront de déterminer la présence du gène RHD chez le fœtus et le potentiel polymorphisme chez la mère.

Technique identification polymorphisme maternel type D faible/ D partiel

La conclusion sur le type de D faible se fait dans un premier temps par une technique dite « High Resolution Melting » (HRM). (Annexe VII)

Il s'agit d'une analyse qualitative qui repose sur l'interprétation d'une courbe de fusion par rapport à une séquence non mutée et permet d'identifier la présence d'une mutation. Cette mutation est ensuite caractérisée grâce au séquençage de la région d'ADN analysé.

Étude

Problématique et Objectifs

La conclusion du génotype RHD fœtus dépend de la présence ou non du gène RHD de la mère.

Ainsi, si la mère ne présente pas ce gène, il est possible de déterminer le statut RHD du fœtus en fonction de la détection du gène RHD chez le fœtus.

Dans certains cas, la mère présente un polymorphisme du gène RHD et il n'est pas possible de conclure sur le génotype RHD du fœtus et une prophylaxie est toujours prescrite.

Cependant, les polymorphismes RHD faibles type 1, 2 et 3 n'ont rapportés aucun cas d'immunisation à ce jour. De ce fait, ils peuvent se passer d'immunoprophylaxie. (18) (Annexe VIII)

On peut se demander en quoi les patientes enceintes présentant un polymorphisme du rhésus D peuvent-elles influencer la prise en charge immuno-prophylactique de l'incompatibilité materno-fœtale en région PACA-Corse-Monaco ?

Pour répondre à cette question, il a fallu décliner deux objectifs.

L'objectif principal est d'étudier la population présentant un polymorphisme du rhésus D.

Le second est de corrélérer le gène RHD faible à une catégorie de population afin d'en améliorer la prise en charge.

Matériels et Méthodes

Etude de la population présentant un polymorphisme du rhésus D.

Il s'agit d'une étude descriptive rétrospective sur une période de 7 ans (2008-2014) en région PACA, Corse et Monaco.

La population étudiée est l'ensemble des femmes enceintes de phénotype RHD négatif qui ont bénéficié du génotypage fœtal sur sang maternel effectué dans le laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire de l'hôpital Nord.

Les critères d'inclusions sont les femmes enceintes de phénotype RHD négatif, non immunisées, issues de la région PACA-Corse-Monaco, présentant un polymorphisme de rhésus D découvert lors du génotypage du rhésus fœtal sur plasma maternel effectué entre 2008 et 2014.

Trois variables qualitatives ont été recueillies dans cette étude : origine géographique maternelle, phénotype maternel et génotype maternel.

Les critères d'exclusion retenus sont : les patientes dont le phénotype n'a pas été retrouvé à l'EFS et les patientes n'ayant pas répondu aux contacts téléphoniques et pour qui les renseignements sur les origines géographiques n'ont pas été remplis sur la prescription du génotypage (Annexe IX).

Taille de la population initiale est de 602 patientes recueillies entre 2008 et 2014.

Corrélation du gène RHD faible à une catégorie de population afin d'en améliorer la prise en charge.

Afin de mettre en relation le gène RHD faible avec les origines géographiques et le phénotype correspondant, des analyses de biologie moléculaire ont été réalisées par les internes du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire de l'hôpital Nord pour caractériser le type de polymorphisme D faible/partiel.

Par contraintes budgétaires et temporelles, les analyses de biologies moléculaires nécessaires pour connaître le type de polymorphisme RHD faible n'ont pu être réalisées que pour les années 2013-2014 ce qui représente 46 patientes initialement prévues.

Lieu et population à l'étude.

L'Agence Régionale de Santé de la région Provence Alpes Côte d'Azur (PACA), Corse et Monaco a alloué un financement pour les années 2008 à 2014 en ce qui concerne le génotypage du gène RHD fœtal chez les patientes de rhésus négatif (convention passée entre Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille et l'ARS).

Cette demande de financement a été faite par l'Assistance Publique des hôpitaux de Marseille, afin de donner accès à toutes les patientes de la région PACA-Corse-Monaco, au génotypage fœtal, l'analyse étant hors nomenclature.

L'Hôpital Nord est la seule structure dans la région PACA à réaliser ce genre de technique.

En France, d'autres structures effectuent le génotypage RHD fœtal en routine : le CH St Antoine à Paris, le CH Poissy, l'EFS de Lyon, CERBA et BIOMNIS.

Le Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire est dirigé par le Professeur Jean Gabert . Il est situé au 12^{ème} étage de l'Hôpital Nord.

Ce dernier fait parti d'un réseau reconnu au niveau National, Européen et International et leurs locaux sont agréés par l'ARS.

Il est spécialisé dans le diagnostic prénatal non invasif dont la responsable de l'activité est le Dr A.Lévy-Mozziconacci.

Il s'occupe dans ce domaine de l'Allo-immunisation anti-Rhésus D et mène entre autre des études avec l'étranger.

Recueil des données

Le recueil des données s'est fait grâce à un tableau Excel dans lequel a été consigné des informations exhaustives telles que :

- Les origines géographiques parentales de chacun des parents
- Le lieu de provenance de la prescription
- Date du prélèvement
- Terme auquel la prise de sang a été faite
- Phénotype maternel retrouvé
- Génotype RHD maternel (après identification par PCR quantitative en temps réel)
- Type de mutation sur le gène RHD

Ces informations ont été complétées à l'aide des dossiers récupérés aux archives du laboratoire.

Diagnostic du RHD fœtal en routine

- Préparation des échantillons

L'analyse est faite à partir du plasma maternel.

Le plasma est séparé par deux centrifugations (10 minutes à 1650g) et conservés à -80°C.

L'ADN est extrait par un automate biorobot EASYMAG, à partir de 500 µL de plasma maternel selon le protocole du fabricant.

Afin de réaliser le contrôle de l'isolement de l'ADN, chaque étape inclus un plasma provenant d'une mère rhésus négatif portant un fœtus rhésus positif et d'une mère rhésus positif portant un fœtus rhésus négatif.

- PCR quantitative

L'ADN a été quantifié à l'aide de PCR quantitatives en temps réel (RQ-PCR) grâce à l'ABI PRISM 7900 Sequence Detection System ®. La RQ-PCR vise à quantifier les exons 5,7, 10 et le gène de la β-globine.

Le nombre de copies est déduit en fonction d'une droite de calibration plasmatique. Ces droites ont été déterminées pour la β-globine, et les exons 5,7 et 10 à une dilution standard de 5 à 50 000 copies/6µL.

Le Ct sélectionné est de 0,03. La quantité d'exons du gène RHD et de la β-globine est exprimée en copie par millilitre de plasma ou de sérum.

- Détection de polymorphisme lors du génotypage

En principe, la fraction d'ADN fœtale dans le sang maternel varie de 3 à 6% au cours de la grossesse (19). Lorsque la quantification du gène RHD est supérieure à 20% par rapport à l'ADN plasmatique (gène de la β -globine), un polymorphisme est suspecté.

Les ratios entre les différents exons étudiés (5,7 et 10) et la β -globine permettent de conclure sur le type de polymorphisme.

Polymorphisme	Ratio exon 5/ β - globine	Ratio exon 7/ β - globine	Ratio exon 10/ β - globine
Pseudogène RHD psi (5-,7+,10+)	<20% et RHD psi pos	> 20%	> 20%
Hybride RHD-CE- D (5-,7-,10+)	< 20%	< 20%	> 20%
RHD faible/Dpartiel (5+,7+,10+)	> 20%	> 20%	> 20%

Tableau explicatif pour l'interprétation du type de polymorphisme.

Analyse moléculaire des polymorphismes de type D faible : High Resolution Melting (HRM).

Les échantillons de 2013 à 2014 présentant un polymorphisme sur les 3 exons ont été étudiés par HRM afin de déterminer la présence de RHD faible type 1,2 ou 3.

L'extraction a été faite par l'automate EZ1 selon les recommandations du fournisseur à partir de 200 µL de sang total.

Une PCR ciblant les exons 6,9 et 1 correspondant aux RHD faible type 1, 2 et 3 a été réalisée.

Une courbe de fusion a été réalisée pour être comparée aux contrôles « RHD normal » et « RHD faible » correspondants.

Les résultats positifs pour un D faible ont été analysés ensuite par séquençage afin de confirmer la présence de RHD faible type 1,2 ou 3.

Analyse statistique:

Les tests du Chi-2, les calculs de pourcentage et les graphiques ont été réalisés avec le logiciel « R » :R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Le test du Chi 2 a été appliqué aux données avec une valeur de $p < 0.001$ prouvant une réelle significativité des différences entre les distributions.

L'approximation du Chi2 peut-être incorrecte lorsque les effectifs théoriques sont inférieurs à 5 mais la différence entre les distributions des proportions est telle que le regroupement ou la suppression des modalités dont l'effectif est trop petit montreraient sans aucun doute des résultats aussi significatifs.

Résultats

Population à l'étude

Parmi les informations recueillies dans la grille de recueil, seulement 3 ont été retenues : origine géographique maternelle, phénotype maternel retrouvé, et génotype RHD maternel.

Dans un premier temps il a fallu compléter la grille de recueil à partir des 602 dossiers retrouvés dans les archives.

Ce qui correspond à 2,72 % de l'ensemble des patientes RHD de la région PACA-Corse-Monaco analysée.

Parmi ces dossiers, 129 étaient sans phénotypes. L'Etablissement Français du Sang a été contacté à plusieurs reprises par fax afin de compléter les phénotypes maternels manquants.

Pour l'EFS de Nice, il y avait 21 patientes sans phénotypes. Au final 1 seul dossier n'a pas été retrouvé à l'EFS.

Pour l'EFS de Marseille, il y avait 108 patientes sans phénotype. Seulement 9 dossiers n'ont pas été retrouvés à l'EFS.

Pour l'EFS de Saint Laurent du Var, il y avait 5 patientes sans phénotype. Toutes ont été retrouvées.

Au final, 10 patientes ont été exclues à cause du phénotype manquant.

Parmi les patientes restantes, les origines géographiques parentales demandées sur la prescription de diagnostic prénatal non invasif étaient incomplètes pour 74 d'entre elles (Annexe IX).

Dans le but d'éviter l'anxiété pouvant être provoquée par l'appel, seules les patientes ayant bénéficié du génotypage pendant les années 2013-2014 ont été contactées par téléphone

Cela correspondait à 20 patientes.

Il a été réalisé 20 appels, au cours de ces derniers, nous nous présentions comme employée de l'APHM ayant pour but de clôturer le dossier obstétrical.

In fine, sur les 20 patientes appelées, 4 n'ont pas répondu aux 3 appels effectués sur des jours différents et 3 patientes n'avaient pas laissé leurs coordonnées, 2 patientes ne parlaient pas français.

Au total, 9 patientes ont été exclues à cause des données géographiques manquantes sur les années 2013-2014.

Les patientes qui étaient revenues plusieurs fois à l'occasion de nouvelles grossesses, ont été comptées qu'une seule fois ; 65 doublons ont été supprimés.

Au final l'étude de population répondant au premier objectif s'est faite sur 464 patientes.

En ce qui concerne l'étude de population du second objectif (corrélation du gène RHD faible à une catégorie de population), elle s'est déroulée sur les années 2013-2014 soit 46 patientes initialement incluses.

Parmi ces dernières, les données géographiques maternelles manquaient pour 20 d'entre elles.

Comme décrit ci-dessus, elles ont été contactées par téléphone et 9 d'entre elles ont été exclues.

Sur la période donnée, 3 patientes étaient venues deux fois pour des grossesses différentes, les doublons ont été supprimés.

Au final, la population étudiée pour répondre au second objectif est de 34 patientes.

En ce qui concerne les origines maternelles, elles ont été classées par continents : Afrique du Nord, Caucase, Afrique du Sud, Amérique du Nord, Amérique du Sud, Asie, Moyen-Orient, Pays de l'Est, Mayotte-Madagascar-Antilles-Caraïbes-Guyane-Réunion.

Dans un second temps Amérique du Nord, Amérique du Sud et Pays de l'Est ont été déplacés dans la population Caucasienne, faute d'effectif assez grand.

Le Moyen Orient a été mis dans l'Afrique du Nord pour la même raison.

Ces données ont été recueillies par l'intermédiaire de la prescription d'examens génétiques. (Annexe IX)

Pour les patientes qui avaient déclaré deux origines géographiques différentes (origines maternelles du côté paternel et maternel), seul l'origine géographique la plus polymorphique a été sélectionnée.

Description de la population étudiée.

Parmi la population étudiée présentant un polymorphisme RHD, 39,44% était d'origine Caucasienne, 28,23% provenait d'Afrique du Nord, 23,71% d'Afrique Subsaharienne, 8,41% de Mayotte-Madagascar-Antilles-Caraïbes-Guyane-Réunion et seulement 0,21 % d'Asie.

Le phénotype C+c+E-e+ était le plus rencontré (51,51%) venait ensuite le C-c+E-e+ à 35,56% , C-c+E+e+ à 6,25% , C+c+E+e- à 2,80% , C+c-E-e+ à 2,37% et enfin C+c+E+e+ retrouvé à 1,51%.

En ce qui concerne la répartition des types de polymorphisme dans la population ;

33,19% des patientes étaient de génotype 10+/7-/5- soit hybride.

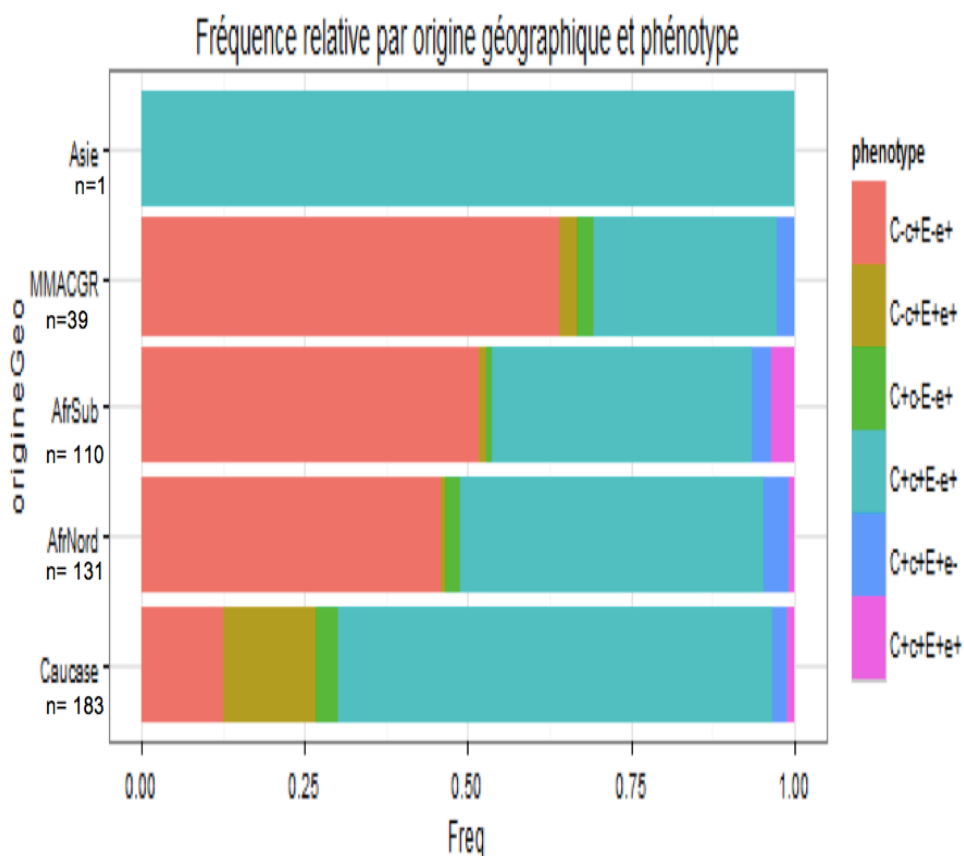
35,56% des patientes avaient un génotype 10+/7+/5- parmi elles 82,42 % avaient un ψ positif soit pseudogène.

31,25% des patientes étaient de génotype 10+/7+/5+ soit RHD faible/partiel.

Etude de la population présentant un polymorphisme du rhésus D.

Etude du lien entre origines géographiques et phénotypes :

Graphique 1 : Fréquence relative des phénotypes en fonction des origines géographiques.



Origines géographiques :

MMACGR : Mayotte-Madagascar-Antilles-Caraïbes-Guyane-Réunion

AfrSub : Afrique Subsaharienne

AfrNord : Afrique du Nord

En somme, les deux variables qualitatives : phénotypes et origines géographiques sont liées selon le test du Chi 2 ($p < 0,001$)

Chez les caucasiens, le phénotype C+c+E-e+ (66,7%) est prédominant, puis à un moindre degré statistique le phénotype C-c+E+e+ (14,2%).

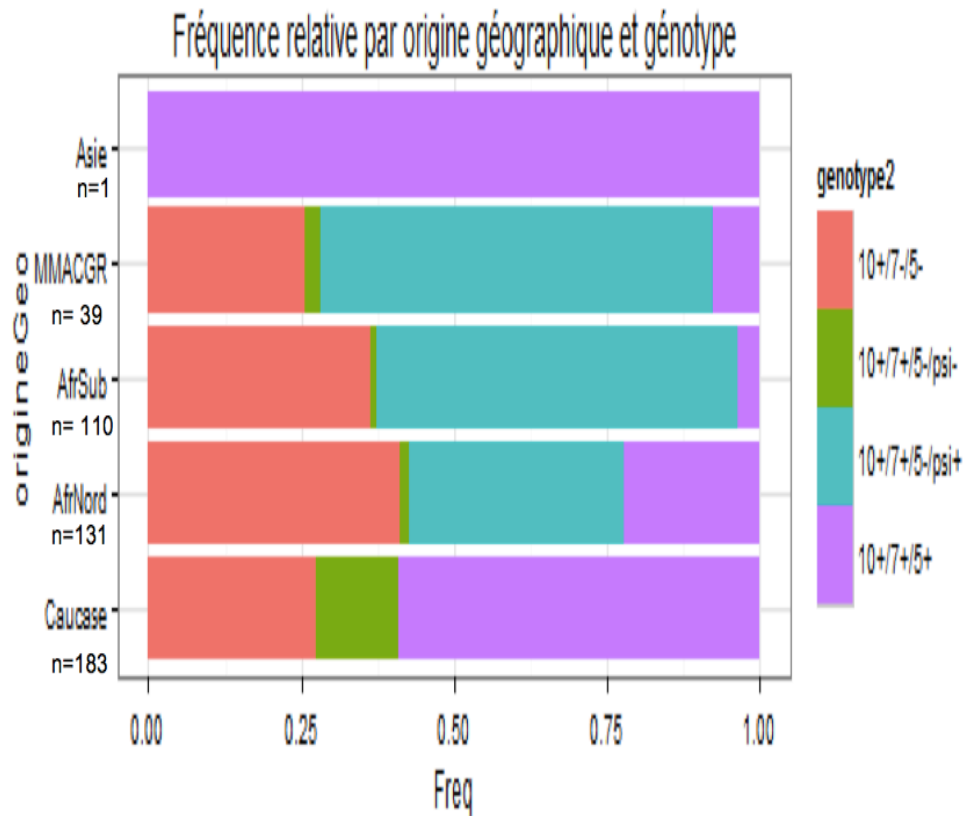
A l'inverse, le phénotype C+c+E+e+ (1,1%) est significativement moins retrouvé dans cette catégorie de population. (Annexe X)

En ce qui concerne la population d'Afrique du Nord, la proportion des différents phénotypes est comparable aux proportions globales de la population représentée par l'échantillon. Il est retrouvé une majorité de C-c+E-e+ (45,8%) et C+c+E-e+ (46,6%).

Pour l'Afrique Subsaharienne et Mayotte-Madagascar-Antilles-Caraïbes-Guyane-Réunion, le phénotype C-c+E-e+ (respectivement 51,8% et 64,1%) prédomine de façon significative.

Etude du lien entre origines géographiques et génotype :

Graphique 2 : Fréquence relative des génotypes en fonction des origines géographiques



Selon le test du Chi 2 réalisé avec une valeur de $p < 0,001$, les variables origines géographiques et génotypes sont liées. (Annexe XI)

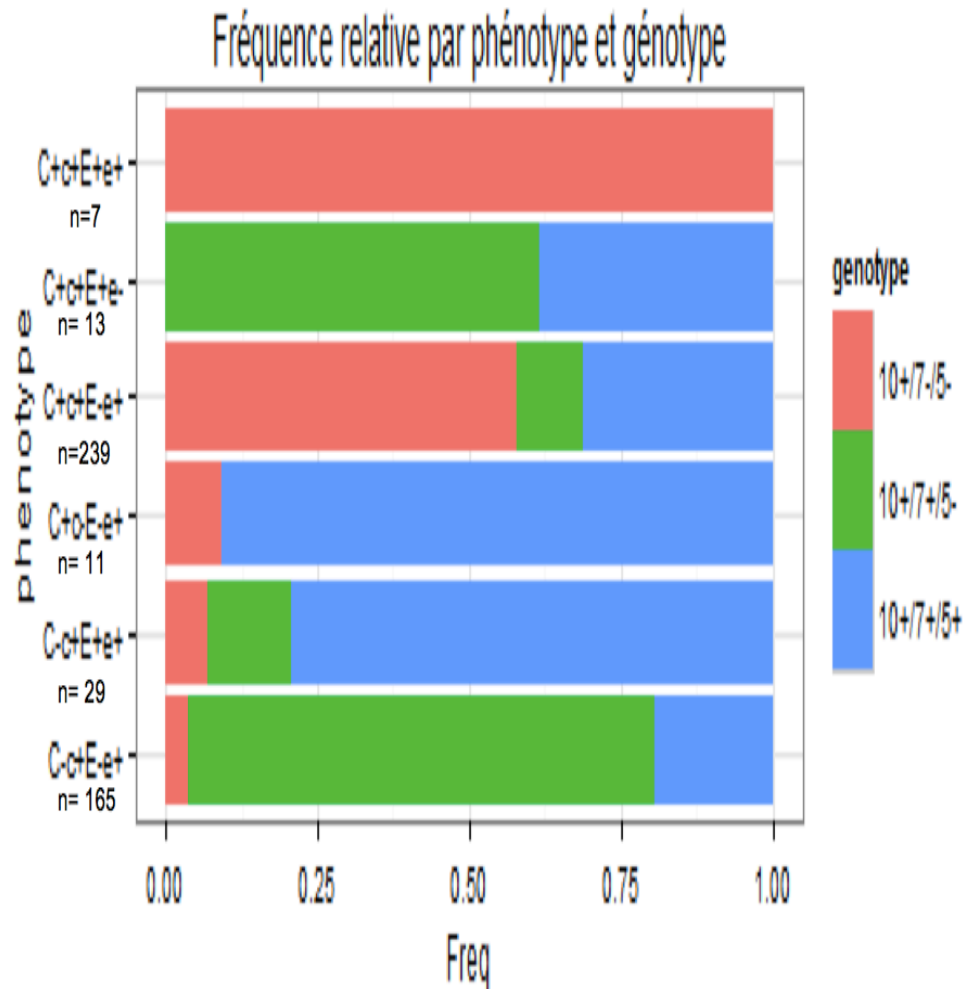
Dans la population caucasienne, le RHD faible/partiel est le polymorphisme significativement le plus fréquent (59%), le gène Hybride représente 27,3% de cette population.

La population d'Afrique du Nord montre une répartition différente : le gène Hybride est le plus fréquent (41,2%) et le RHD faible/partiel a 22,1% . A noter la présence du Pseudogène dans 36,6%.

Pour l'Afrique du Sud et Mayotte-Madagascar-Antilles-Caraïbes-Guyane-Réunion présentent le même profil de répartition des différents polymorphismes, le pseudogène est prédominant de façon significative (60%et 66,7%), l'Hybride (36,4%, 25,6%) et le RHD Faible/Partiel est le polymorphisme le moins retrouvé dans cette population (3,6%et 7,7%).

Etude du lien entre génotype et phénotype :

Graphique 6 : Fréquence relative des génotypes en fonction des phénotypes.



Les variables phénotypes et génotypes sont liées ($\chi^2 = 285,55$, $df = 10$, $p < 0,001$).

Dans les phénotypes C-c+E-e+ ,le pseudogène est retrouvé de façon significative (77%), à l'inverse les D faibles/ partiels et les hybrides sont significativement moins retrouvés avec respectivement 19,4% et 3,6% .(Annexe XII)

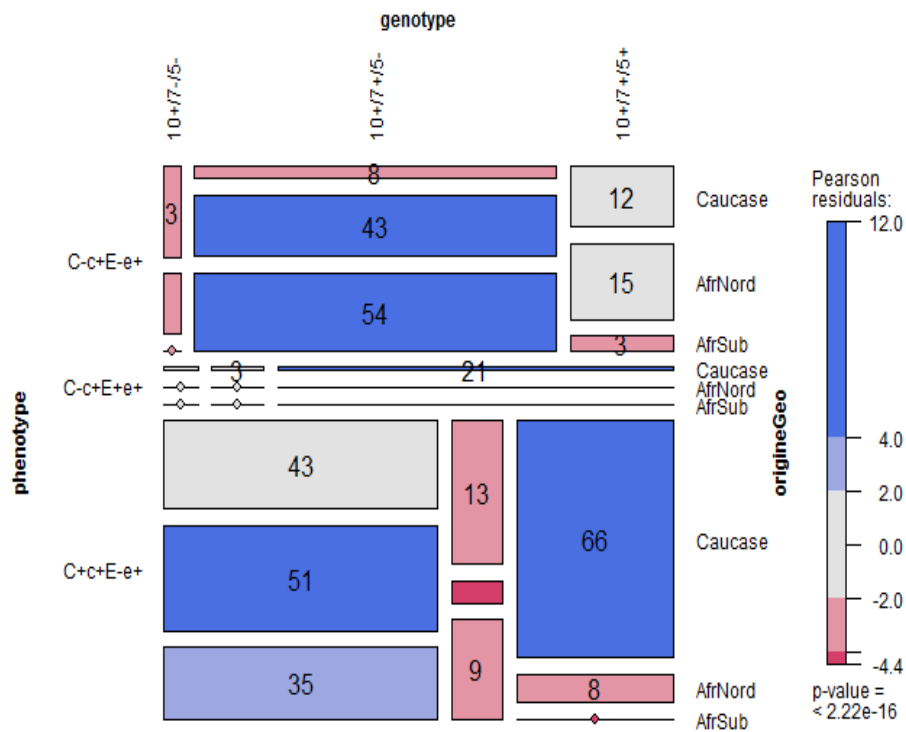
Les génotypes RHD faibles/partiels sont significativement plus important que dans la population globale dans les phénotypes C-c+E-e+(22,1%) et C+c-E-e+ (51,7%).

Pour les phénotypes C+c+E-e+ ,le gène hybride prédomine(57,7%) à la différence du pseudogène qui est significativement moins retrouvé (10,9%).

Dans le phénotype C+c+E+e+,il est retrouvé exclusivement le gène hybride de façon significative.

Etude du lien entre génotype, phénotype et origines géographiques :

Graphique 7: Test du Chi2 appliqué aux origines géographiques , phénotype et génotype.



Le gène hybride est significativement présent chez les patientes de phénotype C+c+E+e+ originaires d'Afrique du Nord et à un moindre degré statistique d'Afrique Subsaharienne.

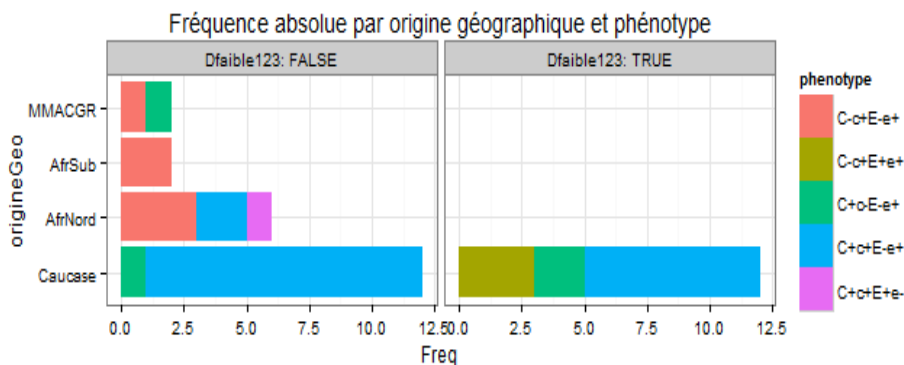
Le pseudogène est significativement présent dans les populations Africaines, notamment d'Afrique Subsaharienne et chez les patientes originaires de Mayotte-Madagascar-Caraïbes-Guyane-Réunion, porteuses du phénotype C-c+E-e+.

:

Les D faibles/ D partiels sont retrouvés de façon significative dans la population Caucasienne de phénotype C+c+E-e+.

Répartition des polymorphismes de type RHD faible type 1, 2 ,3 dans les différentes populations étudiées

Graphique 8 : Fréquence absolue du phénotype en fonction des origines géographiques



L'effectif total pour répondre à cette question était de 34 patientes, seulement 12 ont été génotypées D faible 1,2 ou 3. (Dfaible123 : TRUE, sur le graphique 8).

Les 22 autres patientes pouvaient être D faible non 1, 2 ou 3 ou D partiels (Dfaible123 : FALSE, sur le graphique 8).

Dans cet échantillon, les D faibles 1, 2 et 3 ont été seulement retrouvés dans la population caucasienne.

Parmi cette population , le phénotype C+c+E-e+ prédomine et vient ensuite le phénotype C-c+E+e+ et C+c-E-e+.

Analyse et Discussion

Limites de l'étude

Pour répondre au second objectif qui est de corréler le gène RHD faible type 1,2 et 3 à une catégorie de population, seules les patientes qui ont bénéficiées d'un génotypage foetal sur les années 2013-2014 et qui au cours de cet examen, le polymorphisme RHD partiel/faible a été déclaré ont été incluses.

Au départ 46 patientes ont été incluses, mais 12 d'entre elles ont été secondairement exclues, 9 à cause des données géographiques manquantes et 3 doublons (expliqué dans la partie résultat).

La caractérisation du type de D faible par HRM et séquençage a été effectuée seulement sur les années 2013-2014 par manque de temps et de par le coût engendré par cette technique.

Au vu du nombre de patientes, ces résultats manquent de représentativité.

Biais

Le principal biais repose sur la sélection des origines géographiques déclarées lors de la prescription du génotypage foetal.

En effet, pour certaines patientes, deux origines géographiques ont été retrouvées (origine maternelle et paternelle) et seul l'origine la plus polymorphique a été retenue, il s'agit d'un biais d'information.

Difficultés rencontrées

La difficulté initiale a été la compréhension du sujet.

La contextualisation du thème s'est faite en anglais accompagnée de termes dans le domaine de la génétique très spécifique.

Il a fallu comprendre le sujet de génétique pure et les techniques de biologie moléculaire, tout deux très éloignés du domaine de la maïeutique mais très enrichissant et intéressant.

L'autre difficulté explique la limite décrite ci-dessus, le délai imparti pour réaliser les techniques de biologie moléculaire n'ont permis de génotyper seulement 46 patientes.

Cela explique une cohorte trop peu faible pour transposer les résultats dans la population générale.

Analyse des résultats et discussion

Population Caucasienne :

Lien entre origines géographiques et génotype :

Dans la population Caucasienne, le polymorphisme RHD le plus présent selon l'étude est le D faible/D partiel à 59%. (Annexe XIII)

Vient ensuite le génotype hybride à 27,3% et l'exon 5 muté à 13,7%.

L'exon 5 muté se traduit par un génotype 10+/7+/5- ψ négatif, cela équivaut à un génotype D faible/partiel.

Aucun pseudogène n'a été retrouvé dans cette population.

Franz F Wagner (20), dans son étude sur une population de 50 patients ayant un polymorphisme du rhésus D , décrit que le polymorphisme le plus présent chez le Caucasien est l'hybride à 68% et notamment le RHD-CE (2-9)-D2 à 27%. (Intervalle de confiance à 95%).

Seulement 5 patientes sur 50 ont été génotypées D faible, ce qui correspond à 10% de sa population. Le nombre de D partiels n'a pas été précisé.

A noter que, il retrouve le génotype pseudogène chez les caucasiens avec une fréquence de 1 :37,431.

Or, selon l'étude menée par Belinda K.Singleton (8) et son équipe, sur 285 patients, elle ne retrouve aucun caucasien comportant un pseudogène.

L'étude de Wagner est critiquable dans la mesure où elle porte sur 50 échantillons .et est difficilement comparable à la notre puisque seuls les D faibles ont été pris en compte.

Selon l'étude de C. Gassner (21) et son équipe portant sur la présence du RHD chez les patients européens ayant pour phénotype C/E+ sur une cohorte de 1 700 échantillons prouve que l'hybride est le plus retrouvé dans cette population . Il est présent chez 59 patientes alors que le D faible chez 5 patientes seulement.

Même résultats pour l'étude de l'équipe de C.P Engelfriet (22) qui porte sur 738 patients Autrichiens.

Ces études sont une fois de plus peu comparables à la notre car ils sélectionnent les patients d'après le phénotype C/E+. Or selon notre étude ce phénotype est retrouvé à 89,61% dans les hybrides.

En Allemagne , une étude menée sur 6 ans portant sur 46 133 patients de phénotype RHD négatif montre une majorité de variants (n=96) , parmi eux les Del et les D faibles sont les plus retrouvés. (23)

Lien entre origines géographiques et phénotype

Selon notre étude le phénotype le plus retrouvé dans la population Caucasienne est C+c+E-e+ à 66,7% ensuite vient le phénotype C-c+E+e+ à 14,2 % et C-c+E-e+ à 12,6%.(Annexe XIV)

Ces pourcentages correspondent aux résultats retrouvés dans la littérature.

L'étude de Wagner et al (20) menée sur 1 068 patients Européens retrouve 40 ,54% le phénotype C+c+E-e+.

Selon l'étude Hyland CA (24) et son équipe, les phénotypes C+c-E-e+ et C-c+E+e- sont les plus retrouvés parmi RHD négatifs.

En effet, sur une population de 187 patientes d'origine caucasienne, seulement 27 sont de phénotype C-c+E-e+ soit 12,6% contre 160 patientes comportant C+ et/ou E+.

Dans notre étude sur une population de 183 caucasiens, seulement 23 (12,57%) sont de phénotype C-c+E-e+ contre 160 (87,43%) avec C+ et/ou E+.

Ces résultats sont comparables malgré le fait que la sélection de population soit différente (Hyland CA sélectionne des patients RHD négatifs).

L'étude de Wagner et son équipe trouvent des résultats différents de notre étude (20).

Sur une population de 1068 Européens de phénotype RHD négatif, il retrouve 40 ,54% de phénotype C+c+E-e+ et 29,40% de phénotype C-c+E-e+.

Sur l'ensemble de sa population, l'haplotype C+ et/ou E+ est estimé à 70,60% de la population.

Cette différence de pourcentage vient du fait que la population étudiée dans l'étude de Wagner est une cohorte contenant 1020 patients génotypés RHD négatif par délétion totale alors que notre population à l'étude est composée exclusivement de patients porteurs de polymorphismes.

Les 48 patients ayant un gène RHD sont de phénotype C+ et/ou E+ ce qui nous conforte dans l'explication de la différence.

Population d'Afrique du Nord

Lien entre origines géographiques et génotype

L'effectif de patientes provenant d'Afrique du Nord est de 131 (Annexe XIII)

Le génotype prédominant dans cette étude pour cette population est l'hybride (n=54), vient ensuite le pseudogène (n=46), le RHD faible/partiel (n=29).

H. Moussa et son équipe (25) ont étudié les bases moléculaires du phénotype D négatif dans la population Tunisienne.

Son étude a été menée sur 448 patients, 437 furent diagnostiqués RHD négatif par délétion complète du gène RHD et dans 11 échantillons ont été retrouvés l'exon 10 amenant à faire davantage d'explorations. Ont été retrouvés 2 pseudogènes, 5 hybrides, et 4 variants.

Comme dans notre étude, H. Moussa retrouve les 3 types de polymorphisme avec une légère prédominance de l'hybride (41,22 % dans son étude contre 45,45% dans notre étude). Le pseudogène est retrouvé dans 18,18% dans l'étude de H.Moussa alors qu'il est retrouvé à 35,11% dans notre étude.

Cette différence peut venir du fait que l'étude de H. Moussa n'a été réalisée qu'en Tunisie et est difficilement transposable à tous les pays du Maghreb.

En effet, la Tunisie a moins de frontières avec l'Afrique Subsaharienne, lieu où le pseudogène est le plus retrouvé.

Plus on augmente la superficie de la frontière avec l'Afrique Subsaharienne, plus l'effectif de pseudogène est grand.

Lien entre origines géographiques et phénotype :

Les phénotypes les plus présents dans la population nord Africaine sont C+c+E-e+ à 46,6% et C-c+E-e+ à 45,8% .(Annexe XIV)

La répartition des phénotypes selon l'étude de H.Moussa (25) menée en Tunisie, montre une prédominance du phénotype C-c+E-e+ à 85,95% et C+c+E-e+ à 6,47%.

Cependant, ces pourcentages ont été calculés sur toute la population étudiée, incluant donc aussi les RHD négatif par délétion totale.

Si seul le polymorphisme est pris en compte, le phénotype prédominant est C+c+E-e+ (n=7) et ensuite C-c+E-e+ (n=2) sur une cohorte de 11 patients.

C'est ce qui est retrouvé dans une étude plus récente de H.Moussa et son équipe (26) sur 100 patients dans la population Tunisienne.

Dans son étude, le phénotype C+c+E-e+ est prédominant chez les patients présentant un polymorphisme du rhésus D (22 patients phénotypés C+c+E-e+ sur 25) et notamment chez les hybrides (21 sur 23 hybrides de phénotype C+c+E-e+).

Population d'Afrique Subsaharienne

Lien entre origines géographiques et génotype :

Dans notre étude, c'est le pseudogène qui est le plus retrouvé parmi la population d'Afrique Subsaharienne à 59,1%. Vient ensuite l'hybride à 36,4% et les variants à 3,6%. (Annexe XIII)

Des résultats quasiment similaires ont été retrouvés dans la littérature.

L'étude de Belinda K. Singleton et al (9), décrit la répartition du polymorphisme sur une population de 285 patients Africains. Le pseudogène est retrouvé à 67% et l'hybride est retrouvé à 15% chez les populations noires Africaines.

Le pourcentage de pseudogène est concordant avec les résultats de notre cohorte, une plus grande différence est trouvée pour les hybrides. Ceci vient du biais de regroupement effectué pour les patients qui avaient des origines mixtes.

Lien entre origines géographiques et phénotype :

Concernant les phénotypes, il a été retrouvé sur 110 patientes, plus de phénotypes C-c+E-e+ (51,8%) et de phénotypes C+c+E-e+ (40%).(Annexe XIV)

Nos résultats montrent une moins forte différence de pourcentage que celle de Belinda K. et son équipe.

Sur leur cohorte de 74 patientes, le phénotype C-c+E-e+ est présent à 85,41% et C+c+E-e+ à 14,86%.

Cette différence peut venir du fait que notre étude nous n'avons pas différencié les patientes ayant des origines géographiques mixtes et avons sélectionné l'origine en fonction de son degré de polymorphisme.

Concernant les populations de Mayotte Madagascar Antilles Caraïbes Guyane Réunion, aucune étude n'a pu être retrouvée afin de comparer les résultats.

Nous pouvons remarquer une ressemblance en terme de pourcentage entre Mayotte Madagascar Antilles Caraïbes Guyane et Réunion avec l'Afrique Subsaharienne.

En effet, le pseudogène est retrouvé à 59,1% dans la population d'Afrique Subsaharienne et à 60% pour Mayotte-Madagascar-Caraïbes-Guyane-Réunion. L'observation est similaire pour le phénotype avec une majorité de C-c+E-e+ pour ces deux origines.

Population d'Asie

En ce qui concerne l'Asie pour notre étude, aucune conclusion ne peut-être tirée.

Une seule patiente est d'origine asiatique et s'est révélée être D faible/partiel. (Annexe XIII et XIV)

Selon la littérature, notamment une étude de X.Qun (27) et son équipe sur 74 patients, c'est l'hybride qui est le plus retrouvé en ce qui concerne les polymorphismes.

L'étude de Shao (28) et son équipe, menée sur 114 patients prouve que le phénotype est lié au polymorphisme et aucun phénotype n'a été décrit sur cette étude pour les variants.

Lien entre phénotype et génotype

Dans la population comportant un hybride, le phénotype C+c+E-e+ prédomine à 89,61%. Les autres phénotypes sont retrouvés à moins de 5%.(Annexe XV)

Selon l'étude « RHD positive among C/E+ and D-negative blood donors in Tunisia » (26), le phénotype C+c+E-e+ est prédominant dans les polymorphisme type hybride (21 / 23 patientes portants un hybride)

Notre étude retrouve parmi les RHD faibles/partiels 51,72% de la population ayant comme phénotype C+c+E-e+, 22,07% dans les phénotypes C-c+E-e+ et 15,86% pour C-c+E+e+.

Selon l'étude de Willy A. Flegel (18), la répartition des phénotypes dans les D faibles dépend du type de D faible. Cette dernière sera détaillée ultérieurement.

Quant aux phénotypes retrouvés chez les D partiels, aucune étude n'a été retrouvée parmi les articles gratuits.

Le phénotype C+c+E-e+ est le plus retrouvé chez les pseudogènes (85,29%) puis le phénotype C+c+E-e+ (8,82%).

Ces résultats sont en accord avec l'étude de Singleton (12) qui retrouve le phénotype C-e+E-e+ chez 85,13% des patientes ayant un pseudogène.

Caractérisation des D faibles ::

L'étude est menée sur 34 patientes.

Parmi les 34, 24 sont d'origines Caucasiennes, 6 d'Afrique du Nord, 2 Afrique Subsaharienne et 2 de Mayotte-Madagascar-Antilles-Caraïbes-Guyane-Réunion.

Les D faibles type 1, 2,3 ont été retrouvés seulement chez les patientes caucasiennes. 7 de type 1, 3 de type 2 et 2 de type 3.

L'étude de Willy.A Flegel (18) sur 31 patientes, montre que 90% des D faibles types 1 à 4 sont retrouvés dans la population Européenne.

Pour les phénotypes associés aux D faibles type 1, 2, 3, l'étude retrouve des résultats identiques à ceux de la littérature.

Pour le D faible type 1, le phénotype retrouvé est C+c+E-e+.

Pour le D faible type 2, le phénotype retrouvé est C-c+E+e+.

Pour le D faible type 3, le phénotype retrouvé est C+c-E-e+.

Ces phénotypes sont également associés à ces types de D faibles dans l'étude de Willy.A Flegel décrite précédemment, et aussi dans l'étude de Franz.F Wagner et son équipe(20) sur une cohorte de 161 patients.

Chez les patientes D faibles, il ressort une origine géographique commune qui est l'Europe.

Par contre aucune conclusion ne peut être tirée d'après les phénotypes puisque ils sont variables en fonction du type de D faible.

Il serait donc intéressant d'étudier de façon plus approfondie le type de phénotype pour les D faible 1,2 et 3 sur une cohorte d'une plus grande ampleur.

Les origines géographiques lors du génotypage foetal devraient davantage être pris en compte.

En effet, l'étude laisse suspecter que les D faibles 1,2 et 3 qui pourraient se passer d'immunoprofylaxie sont retrouvés chez les patientes Caucasiennes dans notre population. La recherche de ces 3 types de D faibles pourraient être spécifiquement effectuée pour ce profil de patientes.

La recherche systématique du D faible et de son type chez les patientes caucasiennes ayant un exon 10 positif pourraient leur éviter l'exposition aux immunoglobulines humaines et engendrerait une économie financière.

Conclusion

Le but de cette étude était de décrire dans un premier temps la population ayant bénéficié du génotypage foetal sur sang maternel sur les années 2008-2014.

Il est à noter que la population provenant d'Afrique du Nord présente des différences significatives avec la population d'origine Européenne au niveau des polymorphismes retrouvés avec la présence du pseudogène dans 36% des cas

La population d'origine Subsaharienne présente la même répartition des polymorphismes que celle provenant de Mayotte-Madagascar-Caraïbes-Guyane-La Réunion.

Ces résultats vont nous permettre de mieux orienter nos analyses lors du génotypage rhésus D foetal.

Dans un souci d'amélioration de la stratégie de soin, afin d'affiner davantage la nécessité d'une immunoprophylaxie, le second objectif était d'étudier la population présentant le gène RHD faible type 1,2 et 3.

Nos données actuelles ne permettent pas de généraliser à l'ensemble des populations, ainsi une étude sur une plus grande cohorte pourrait conforter l'idée que les D faibles 1,2 et 3 sont retrouvés chez les Caucasiens.

Ce résultat permettrait de systématiser pour la population Caucasienne la recherche du type de D faible et réduirait davantage l'administration d'immunoglobulines inutiles.

L'étude nous ne permet pas de faire ressortir un phénotype précis pour les D faibles, en revanche il serait intéressant d'étudier la population en scindant les couples d'antigènes C/c et E/e pour faire apparaître un lien.

Bibliographie

- (1) **Helias V, Saison C, A Ballif B, Peyrard T, Takahashi J, Takahashi H, et al.** ABCB6 is dispensable for erythropoiesis and specifies the new blood group system Langereis. *Nature Genetics* 2012 ; 44 :170–173 doi:10.1038/ng.1069
- (2) **CNGOF.** Texte des recommandations- Prévention de l'allo-immunisation Rhésus D maternelle. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 2006 ; 35 (suppl 1) : 1S131-1S135.
- (3) **CNGOF.** Recommandation pour la pratique clinique-Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D fœto-maternelle. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 2006; 35 (suppl.au n°1): 1S93-1S103.
- (4) **Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, et al.** Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350(9076): 485-7.
- (5) **Coulomb MA,** Génotypage rhésus fœtal sur sang maternel : Recommandations biologiques et cliniques pour une utilisation standardisée à grande échelle [Thèse, médecine, Gynécologie Obstétrique]. Faculté de médecine de Marseille ; 2010.
- (6) **CNGOF.** Prévention de l'allo-immunisation Rhésus D fœto-maternelle. Recommandations pour la pratique clinique (texte court). Paris : 2005.
- (7) **Westhoff CM.** The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. *Transfusion* 2004; 44 (11): 1663-1673

- (8) **Mc Gann PT, Despotovic JM, Howard TA, Ware RE.** A novel laboratory technique demonstrating the influences of the RHD zygosity and the RhCcEe phenotype on erythrocyte D antigen expression. *American Journal of Hematology* 2012 ; 87(3) :266-71.
- (9) **Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A et al** 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* 2000 ; 95 (1) :12-18.
- (10) **CNGOF.** Incompatibilité foeto-maternelle érythrocytaire. Extrait des mises à jour en Gynécologie et Obstétrique. Tome XXV publiée 6.12.2001.
- (11) **Branger B, Winer N.** Epidémiologie de l'allo-immunisation anti-D pendant la grossesse. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 2006 ; 35 (suppl. au n°1) : 1S87-1S92.
- (12) **Wagner FF, Flegel WA.** RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 2000, 95 (12) : 3662-3668.
- (13) **Flegel WA.** The genetics of the Rhesus blood group system. *Blood Transfusion* 2007; 5: 50-57.
- (14) **Cortey A, Mailloux A, Huguet-Jacquot S, Castaigne-Meary V, Mace, N'Guyen A et al.** Incompatibilités foeto-maternelles érythrocytaires. *EMC - Pédiatrie* 2012; 7(3):1-22 [Article 4-002-R-25].

- (15) **Ravinet. J, Carbonne B** .Analyse économique de la prévention de l'allo-immunisation anti-D. Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction 2006 ; 35 (suppl au n°1) :1S104-1S111.
- (16) **Moussa H, Tsochandaridis M, Jemni-Yacoub S, Hmida S, Khairi H, Gabert J et al.** Fetal RhD genotyping by real time quantitative PCR in maternal plasma of RhD-negative pregnant women from the Sahel of Tunisia. Annales de Biologie Clinique 2012 ; 70(6) :683-8.
- (17) **Généthon.** La PCR quantitative en temps réel ou la « Taqman »- Evaluation in vivo. 2001, <http://www.ensam.inra.fr/biochimie/td/UB/TD/VMJ-taqman.pdf> (10 janvier 2016).
- (18) **Flegel WA,** How I manage donors and patients with a weak D phenotype. Transfusion Medicine 2006 ; 13 : 476-483
- (19) **Lo YM, Tein MS , Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM et al.** Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum : implications for noninvasive prenatal diagnosis. American Journal of Human Genetics 1998 ; 62(4) :768-75.
- (20) **Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA.** RHD positive haplotypes in D negative Europeans . BMC Genetics 2001; 2 (10) : 1471-2156.
- (21) **Gassner C, Doescher A, Drnovsek TD, Rozman P, Eicher NI , Legler TJ et al.** Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals : a European multicenter study .Transfusion 2005 ;45 : 527-538.

- (22) **C.P. Engelfriet, H.W. Reesink, G.F. Körmöczi, W.R. Mayr, S. Panzer, D. Schönitzer, et al.** Testing for Weak D. *Vox Sang* 2006; 90: 140-153.
- (23) **Flegel WA, von Zabern I , Wagner FF.** Six years' experience performing RHD genotyping to confirm D-red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion* 2009 ; 49(3) :465-71.
- (24) **Hyland CA, Wolter LC, Saul A.** Three unrelated Rh D gene polymorphisms identified among blood donors with Rhesus CCee (r'r') phenotypes. *Blood* 1994 ; 84 :321-324.
- (25) **Moussa H, Tsochandaridis M, Chakroun T, Jridi S, Abdelneji B, Hmida S et al.** Molecular background of D-negative phenotype in the Tunisian population. *Transfusion medicine* 2012 ; 22(3) : 192-8.
- (26) **Moussa H, Tsochandaridis M, Kacem N, Chakroun T, Abdelkefi S, Gabert J et al.** RHD positive among C/E+ and D-negative blood donors in Tunisia. *Transfusion clinique et biologique* 2014 ; 21 :320-323.
- (27) **X.Qun, M.G. H Grootkerk-Tax, P.A Maashant-van Wijk , C.E . van der Schoot.** Systemic analysis and zygosity determination of the RHD gene in a D-negative Chinese Han population reveals a novel D-negative RHD gene. *Vox Sanguinis* 2005 ; 88 : 35-40.
- (28) **C-P. Shao, T.-H Maas, Y.-Q Su, M. Köhler , T.J Legler.** Molecular background of Rh-D positive, D-negative, Del and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sanguinis* 2002 ; 83 : 156-161.

Annexes

Annexe I : Types de polymorphisme

Annexe II : Situations à risque de passage d'hématies fœtales

Annexe III : Rythme cardiaque fœtal sinusoïdal

Annexe IV : Recommandations pour le génotypage rhésus fœtal sur sang maternel par PCR quantitative

Annexe V : Courbe d'amplification de la réaction de PCR

Annexe VI : Chimie de TACQMAN

Annexe VII : High Résolution Melting

Annexe VIII : Différents types de D faibles

Annexe IX : Feuille prescription génotypage fœtal sur sang maternel

Annexe X : Mosaïque origines géographiques –phénotypes

Annexe XI : Mosaïque origines géographiques – génotypes

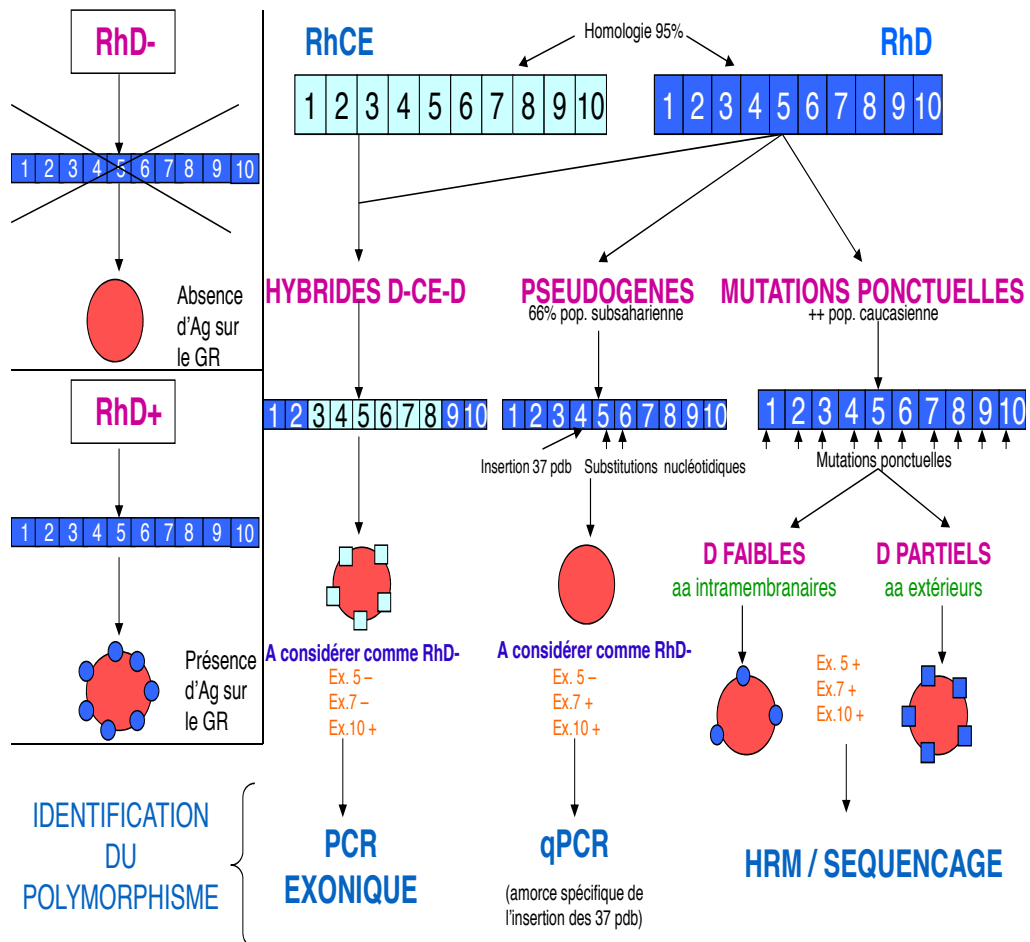
Annexe XII : Mosaïque phénotype-génotype

Annexe XIII : Tableau de répartition des origines géographiques en fonction des phénotypes.

Annexe XIV : Tableau des répartitions des génotypes en fonction des origines géographiques.

Annexe XV : Répartition génotype en fonction phénotype

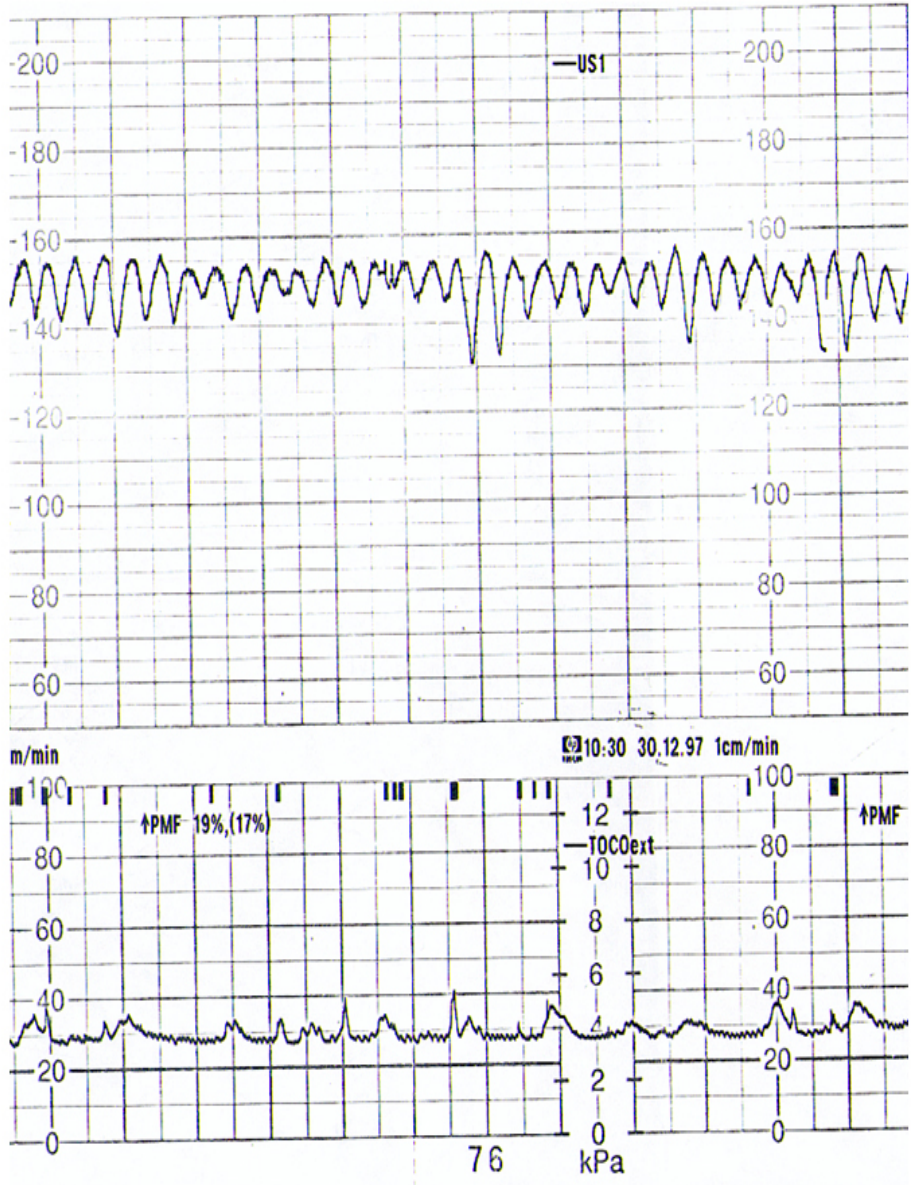
Annexe I : Types de polymorphisme



Annexe II : Situations à risque de passage d'hématies fœtales (recommandations CNGOF-2005)

Recommandations pour la prévention de l'allo-immunisation fœtomaternelle Rh(D) chez les femmes Rh(D)-négatif d'après les recommandations pour la Pratique Clinique d CNGOF (décembre 2005).					
Terme de grossesse	Avant 15 SA	De 15 à 27 SA	De 27 à 29 SA	De 29 SA à l'accouchement	Accouchement
Effectuer une recherche d'agglutinines irrégulières avant toute injection de dose de gamma-globuline anti-D					
Type de prévention anti-D (Rh)	<ul style="list-style-type: none"> • Prévention ciblée : <ul style="list-style-type: none"> ◦ FCS, IVG ◦ GEU ◦ IMG ◦ Métorragies dans le cadre de menace de FCS ◦ Grossesse molaire ; ◦ Réduction embryonnaire ◦ Cerclage du col utérin ◦ Traumatisme abdominal ◦ Amniocentèse ◦ Biopsie de trophoblaste 	<ul style="list-style-type: none"> • Prévention ciblée : <ul style="list-style-type: none"> ◦ Risque élevé d'hémorragie fœtomaternelle : <ul style="list-style-type: none"> ▪ FCS tardive ▪ IMG ▪ MFIU ▪ Traumatisme abdomino-pelvien ▪ Cordocentèse ◦ Risque faible d'Hémorragie fœtomaternelle : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Amniocentèse simple ▪ Métorragies ▪ Cerclage tardif. 	Prévention systématique pour éviter de la survenue d'immunisation asymptomatique, sans facteur de risque d'hémorragie fœtomaternelle identifiable, donc elle échappe à la prévention ciblée.	<ul style="list-style-type: none"> • Prévention ciblée : <ul style="list-style-type: none"> ◦ Abstention si 300 µg à 28 SA Sauf risque élevé d'hémorragie fœtomaternelle : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Version par manœuvres externes. ▪ MFIU ▪ Traumatisme abdomino-pelvien. ▪ Ponction du cordon ou organe fœtal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Administration de gamma-globuline anti-D si nouveau-né RH(D) positif : <p>Abstention possible si :</p> <ul style="list-style-type: none"> • moins de 3 semaines après une administration de gamma-globuline anti-D • et test de Kleihauer négatif • et taux sérique maternel d'anti-D supérieur à 6 ng/ml
Test de Kleihauer	non	oui si risque élevé d'hémorragie fœtomaternelle	non	oui si risque élevé d'hémorragie fœtomaternelle	oui
Dose d'immunoglobuline humaine anti-D (Rh) à administrer	Injection de 200 µg (=1000 UI) en intra-veineux dans les 72 heures	Injection de 200 µg en intra-veineux dans les 72 heures	Injection de 300 µg en intra-musculaire ou en intra-veineux	Injection de 200 µg en intra-veineux dans les 72 heures	Injection de 200 µg en intra-veineux dans les 72 heures

Annexe III : Rythme cardiaque foetal sinusoidal



Annexe IV: Recommandations pour le génotypage rhésus fœtal sur sang maternel par PCR quantitative (extrait thèse MA Coulomb réactualisé selon le protocole du laboratoire)

Recommandations pour le génotypage rhésus fœtal sur sang maternel par PCR quantitative

Nature du prélèvement :

- Le plasma est recommandé

La quantification de l'ADN total plasmatique est nécessaire pour définir :

- Le seuil de qualité de l'analyse (5ème percentile)
- Le ratio RHD exon/ADN total pour identifier les polymorphismes maternels (>30%)

L'utilisation de gammes de calibration est nécessaire pour la standardisation de l'analyse dans chaque laboratoire.

Les exons 10,7 et 5 doivent être testés simultanément

Replicates :

- Duplicate pour chaque exon testé

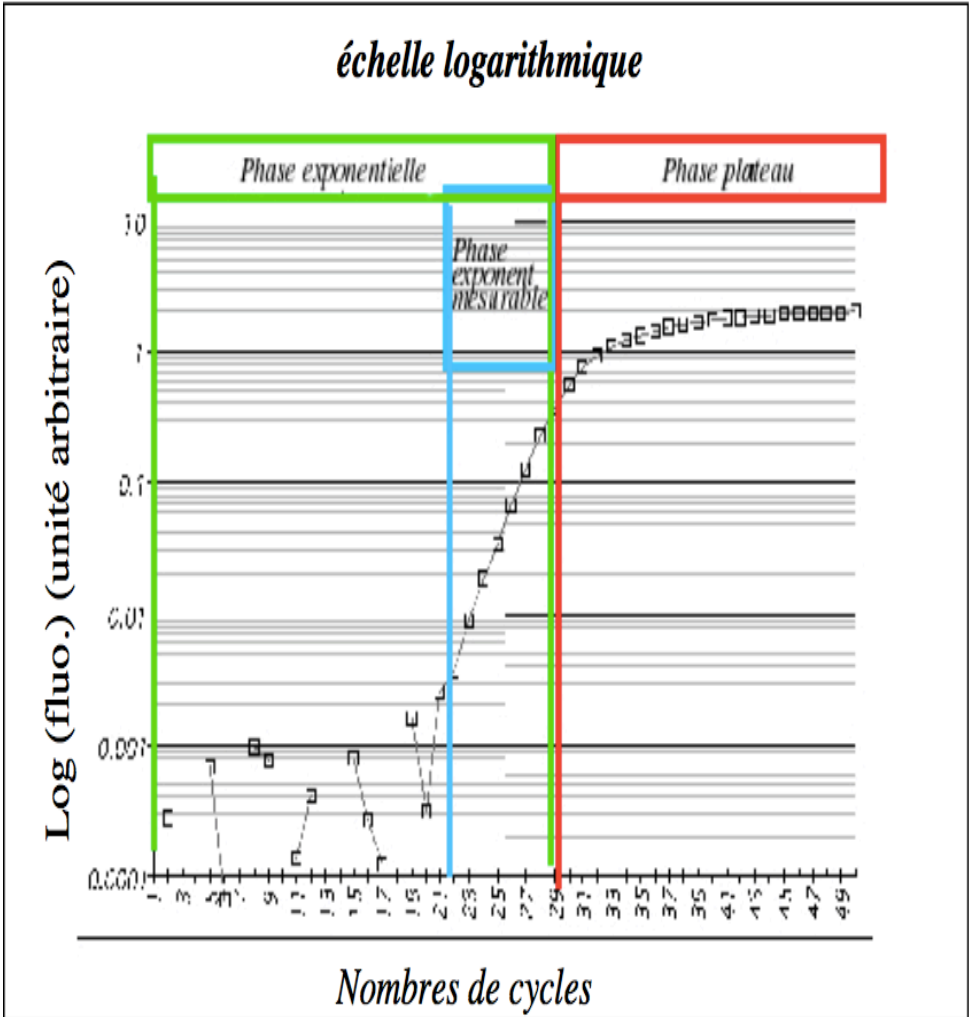
Age gestationnel

- Le génotypage du RHD fœtal peut-être proposé à partir de 10 SA

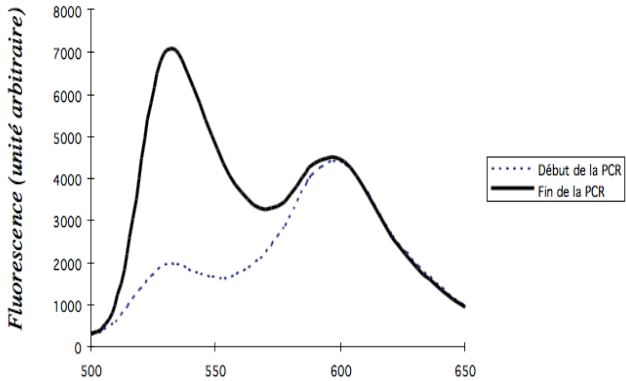
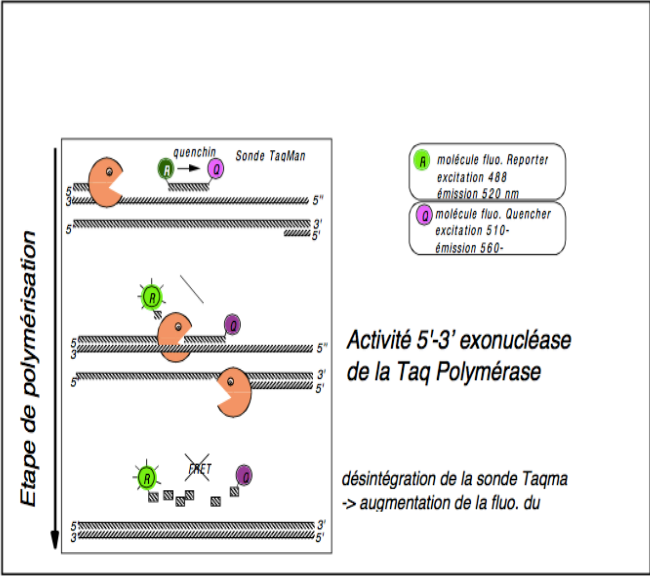
Résultats négatifs nécessitant un contrôle

- Avant 13 SA
- Si la quantité d'ADN total plasmatique est inférieure au 5^{ème} percentile

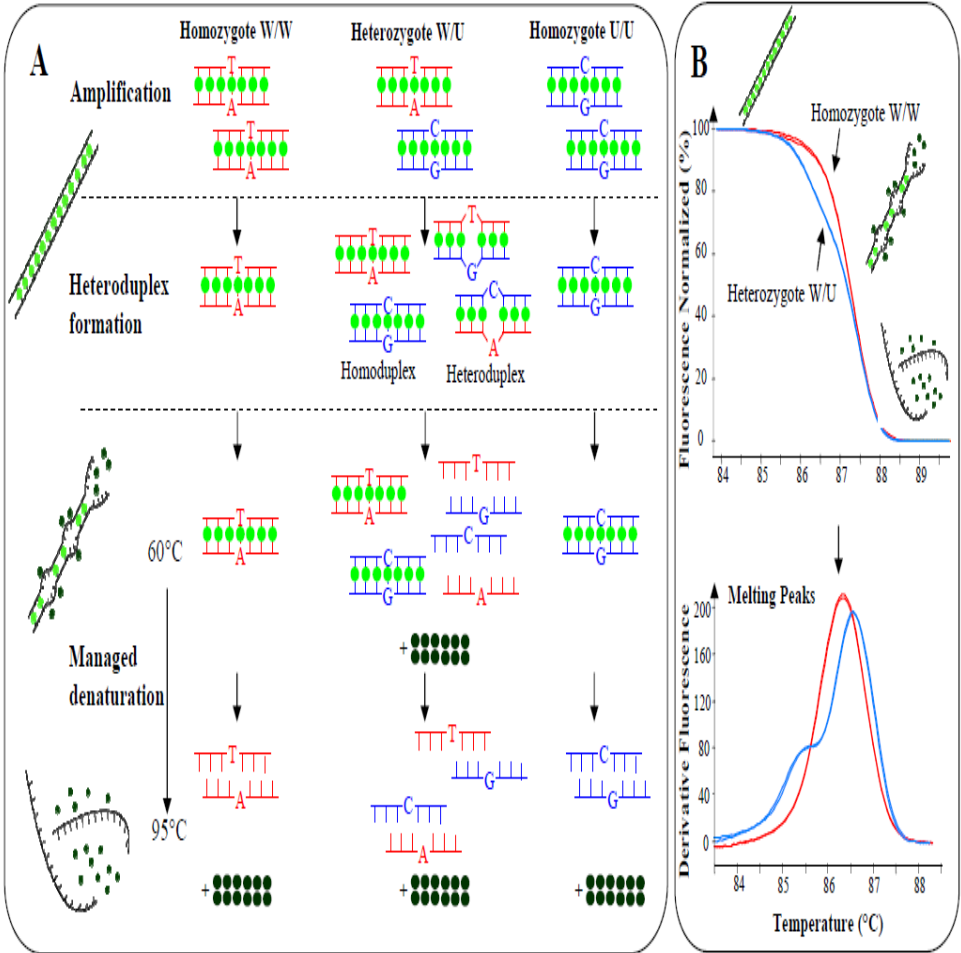
Annexe V : Courbe d'amplification de la réaction de PCR



Annexe VI : Chimie de TACQMAN



Annexe VII : High Résolution Melting



Annexe VIII : Différents types de D faibles

Weak D phenotype	Prevalence in Germany	Haplotype association	Transfusion recipients with anti-D (n) ^a			Recommended management		Clinical consequences	References and remarks
			Total	Allo-anti-D	Auto-anti-D	RBC unit transfusion	Rhlg in pregnancy?		
Type 1	0.2964%	CDe	15	0	15	D-pos.	No	Established	[30]
Type 2	0.0759%	cDE	8	0	8	D-pos.	No	Established	[30]
Type 3	0.0219%	CDe	0	n.a.	n.a.	D-pos.	No	Established	[30]
Type 4.0	0.014%	cDe	3	See remark	See remark	D-pos.	No	Pending	Low-titre allo- or autoantibody [33,36**]
Type 4.1	0.023%	cDe	0	n.a.	n.a.	D-pos.	No	Established	[33,36**]
Type 4.2	Rare	cDe	2	1	1	D-neg.	Yes	Established	DAR phenotype [33,54]
Type 5	0.0035%	cDE	1	0	1	D-neg.	Yes	Pending	[30]
Type 11	>0.0009%, 0.0009%	CDe cDe	1	1	0	D-neg.	Yes	Established	[30]
Type 15	Rare	cDE	1	1	0	D-neg.	Yes	Established	[30,33]
Type 19	0.067%	CDe	0	n.a.	n.a.	D-neg.	Yes	Pending	[36]
Type 20	0.024%	cDE	0	n.a.	n.a.	D-neg.	Yes	Pending	[36]
Other types	Rare	Variable	0	n.a.	n.a.	D-neg.	Yes	Pending	RhesusBase (www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/)

Annexe IX : Feuille prescription génotypage fœtal sur sang maternel

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE - HOPITAL NORD
Service du Professeur Jean GABERT – Chemin des Bourrely – 13015 Marseille
Dr. Annie LEVY-MOZZICONACCI (annie.levy@ap-hm.fr)

Secrétariat ☎ 04 91 96 88 12
 Laboratoire ☎ 04 91 96 53 92 – Fax : 04 91 96 53 94

Laboratoire agréé pour le diagnostic prénatal en génétique moléculaire JO du 23.06.2004 (responsable : Dr. Annie Levy-Mozziconacci)



Assistance Publique
Hôpitaux de Marseille

DIAGNOSTIC DU RHESUS D FŒTAL A PARTIR DU SANG MATERNEL

Tous les champs doivent être obligatoirement renseignés pour un rendu du résultat dans un délai optimal.

IDENTIFICATION DE LA PATIENTE	MEDECIN PRESCRIPTEUR
Nom.....	Nom.....
Prénom.....	Prénom.....
Nom de jeune fille.....	Adresse.....
Date de naissance.....
Nom du Conjoint.....
Tel.:.....	Tel. :
	Fax :

GROSSESSE ACTUELLE (joindre la photocopie du groupe sanguin de la patiente)

DDR : DDG : Grossesse mono-fœtale Grossesse gémellaire
 Age gestationnel :
 Origine géographique des grands-parents :
 Maternels Paternels

Grossesse : Parité : Allo-immunisation (oui/non)
 RAI : Titrage : Dosage pondéral

Une amniocentèse est elle prévue ? : OUI NON
 Date du prélèvement :
 Date et lieu du diagnostic prénatal (si prévu)
 Nom de l'enfant à la naissance.....
 Date présumée de l'accouchement..... Lieu présumé de naissance.....

ATTESTATION ET CONSENTEMENT PREALABLE A TOUTE ANALYSE DE BIOLOGIE EN VUE D'ETABLIR UN DIAGNOSTIC

Je soussigné(e) Docteur en Médecine,
 Conformément à l'article R.162-16-67 du décret n° 95-559 du 6 mai 1995, certifie avoir reçu en consultation ce jour, la patiente ci-dessus désignée afin de lui apporter les informations suivantes :

Les femmes Rhésus négatif portant un enfant Rhésus positif (présence du gène Rhésus) peuvent au cours de leur grossesse produire des anticorps dirigés contre les globules rouges du fœtus pouvant entraîner leur destruction et la mort du bébé. C'est sur la détection et le dosage de ces anticorps que l'on suit actuellement toutes les femmes enceintes rhésus négatif. De plus, une immunoprophylaxie (Rhopylac[®]) peut être proposée devant certaines situations à risque et systématiquement au 7^{ème} mois de grossesse. Mais ce traitement est inutile si le bébé présente le même groupe rhésus que la maman.

Afin de connaître précocement (à partir de la 10^{ème} semaine d'aménorrhée) le rhésus de votre fœtus, il vous est proposé de déterminer celui-ci par analyse génétique de l'ADN fœtal qui circule dans votre sang. Il s'agit d'une simple prise de sang qui ne présente aucun risque pour votre grossesse. Si le résultat est en faveur d'un fœtus Rhésus négatif la prophylaxie (Rophylac[®]) est inutile.

Je soussignée, Madame.....

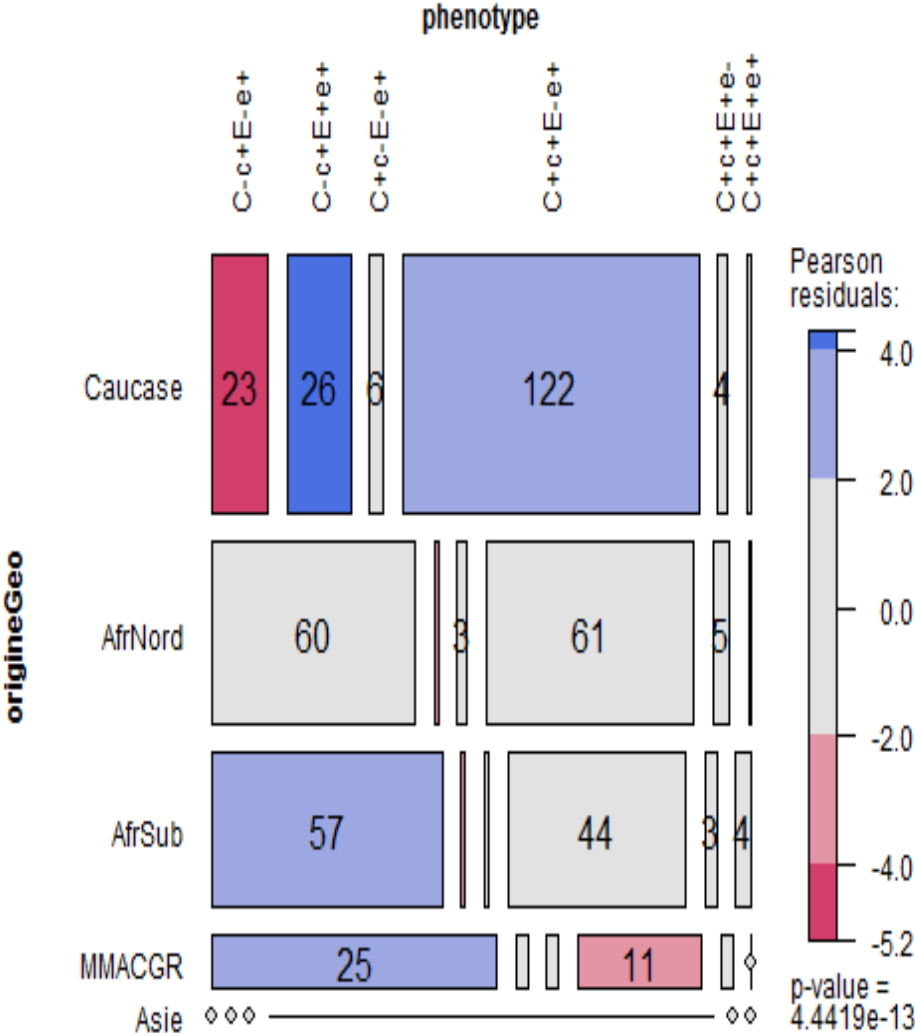
Consens au prélèvement et à la réalisation de cette analyse qui sera effectuée par un laboratoire autorisé à la pratique par le Ministère chargé de la santé. Le résultat de l'examen me sera rendu et expliqué par le médecin qui me l'a prescrit

Signature de la patiente

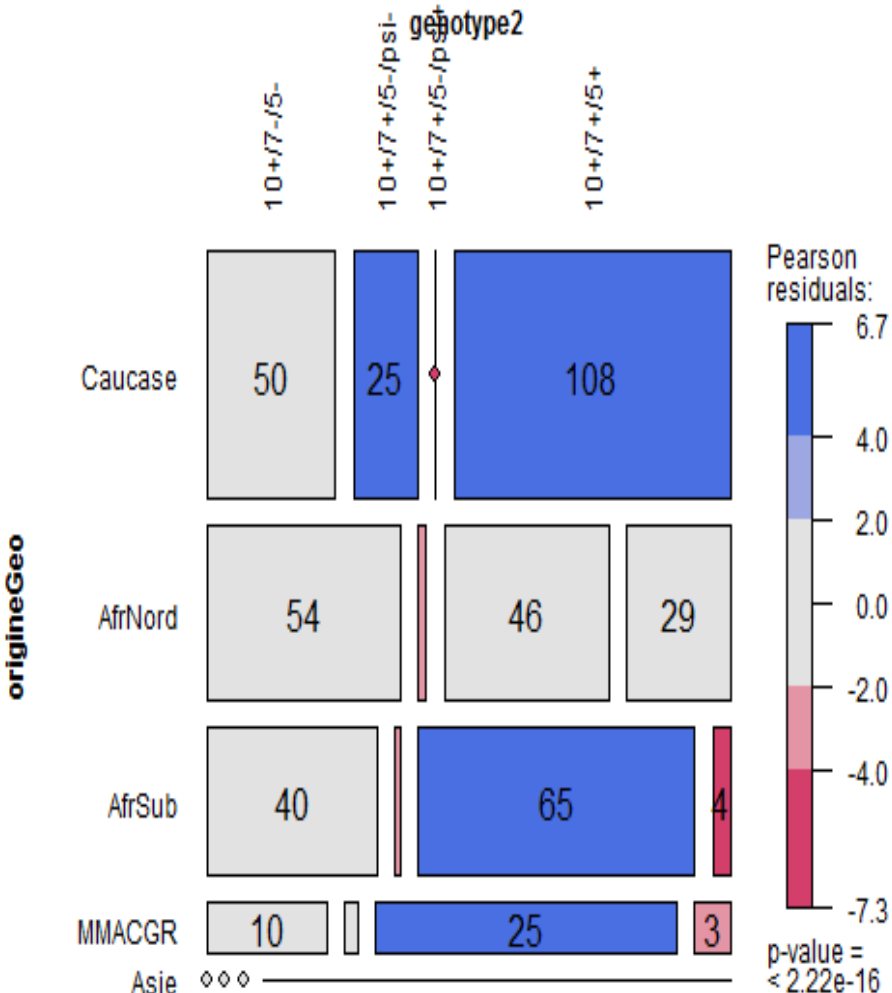
Fait à, le

Signature du prescripteur

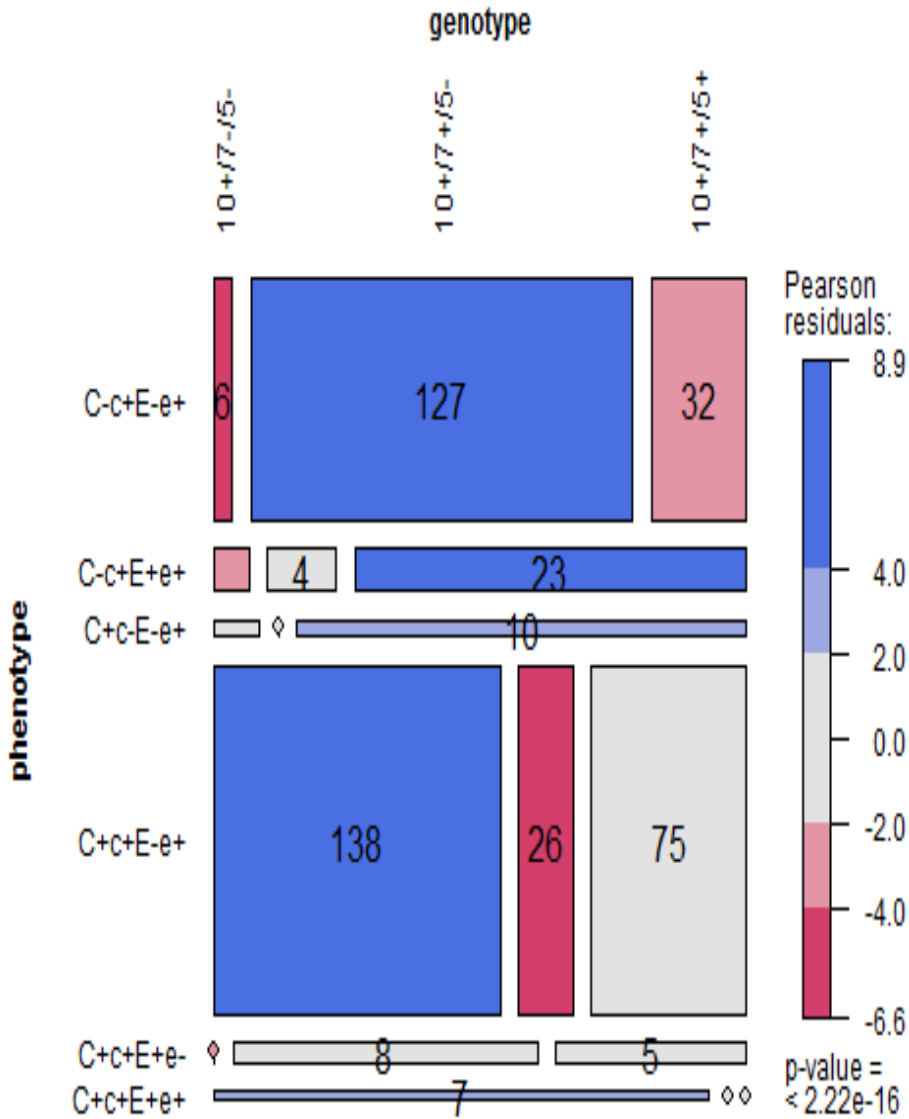
Annexe X : Mosaïque Origines géographiques –phénotypes



Annexe XI : Mosaïque origines géographiques – génotypes



Annexe XII : Mosaique phenotype-genotype



Annexe XIII : Tableau des répartitions des géotypes en fonction des origines géographiques.

Cell Contents					

N					
Chi-square contribution					
N / Row Total					
N / Col Total					
N / Table Total					

Total Observations in Table: 464					
origineGeo	genotype2				Row Total
	10+/7-/5-	10+/7+/5-/psi-	10+/7+/5-/psi+	10+/7+/5+	
Caucase	50	25	0	108	183
	1.898	16.082	53.638	45.148	
	0.273	0.137	0.000	0.590	0.394
	0.325	0.862	0.000	0.745	
	0.108	0.054	0.000	0.233	
AfrNord	54	2	46	29	131
	2.546	4.676	1.506	3.481	
	0.412	0.015	0.351	0.221	0.282
	0.351	0.069	0.338	0.200	
	0.116	0.004	0.099	0.062	
AfrSub	40	1	65	4	110
	0.334	5.020	33.284	26.840	
	0.364	0.009	0.591	0.036	0.237
	0.260	0.034	0.478	0.028	
	0.086	0.002	0.140	0.009	
MMACGR	10	1	25	3	39
	0.670	0.848	16.107	6.926	
	0.256	0.026	0.641	0.077	0.084
	0.065	0.034	0.184	0.021	
	0.022	0.002	0.054	0.006	
Asiq	0	0	0	1	1
	0.332	0.062	0.293	1.512	
	0.000	0.000	0.000	1.000	0.002
	0.000	0.000	0.000	0.007	
	0.000	0.000	0.000	0.002	
Column Total	154	29	136	145	464
	0.332	0.062	0.293	0.312	

Annexe XIV : Tableau de répartition des origines géographiques en fonction des phénotypes.

Cell Contents	
	N
	Chi-square contribution
	N / Row Total
	N / Col Total
	N / Table Total

Total Observations in Table: 464

origineGeo	phenotype						Row Total
	C-c+E-e+	C-c+E-e+	C-c-E-e+	C+c+E-e+	C+c+E-e-	C+c+E+e+	
Caucase	23	26	6	122	4	2	183
	27.204	18.541	0.636	8.163	0.248	0.210	
	0.126	0.142	0.033	0.667	0.022	0.011	0.394
	0.139	0.897	0.545	0.510	0.308	0.286	
	0.050	0.056	0.013	0.263	0.009	0.004	
AfrNord	60	1	3	61	5	1	131
	3.864	6.310	0.004	0.622	0.482	0.482	
	0.458	0.008	0.023	0.466	0.038	0.008	0.282
	0.364	0.034	0.273	0.255	0.385	0.143	
	0.129	0.002	0.006	0.131	0.011	0.002	
AfrSub	57	1	1	44	3	4	110
	8.176	5.020	0.991	2.829	0.002	3.301	
	0.518	0.009	0.009	0.400	0.027	0.036	0.237
	0.345	0.034	0.091	0.184	0.231	0.571	
	0.123	0.002	0.002	0.095	0.006	0.009	
MMACGR	25	1	1	11	1	0	39
	8.935	0.848	0.006	4.112	0.008	0.588	
	0.641	0.026	0.026	0.282	0.026	0.000	0.084
	0.152	0.034	0.091	0.046	0.077	0.000	
	0.054	0.002	0.002	0.024	0.002	0.000	
Asie	0	0	0	1	0	0	1
	0.356	0.062	0.024	0.457	0.028	0.015	
	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.002
	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	
	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	
Column Total	165	29	11	239	13	7	464
	0.356	0.062	0.024	0.515	0.028	0.015	

Annexe XV : Répartition génotype en fonction phénotype

N
Chi-square contribution
N / Row Total
N / Col Total
N / Table Total

Total Observations in Table: 464

phenotype	genotype			Row Total
	10+/7-/5-	10+/7+/5-	10+/7+/5+	
C-c+E-e+	6	127	32	165
	43.420	79.564	7.422	
	0.036	0.770	0.194	0.356
	0.039	0.770	0.221	
	0.013	0.274	0.069	
C-c+E+e+	2	4	23	29
	6.041	3.864	21.435	
	0.069	0.138	0.793	0.062
	0.013	0.024	0.159	
	0.004	0.009	0.050	
C+c-E-e+	1	0	10	11
	1.925	3.912	12.528	
	0.091	0.000	0.909	0.024
	0.006	0.000	0.069	
	0.002	0.000	0.022	
C+c+E-e+	138	26	75	239
	43.404	40.943	0.001	
	0.577	0.109	0.314	0.515
	0.896	0.158	0.517	
	0.297	0.056	0.162	
C+c+E+e-	0	8	5	13
	4.315	2.467	0.216	
	0.000	0.615	0.385	0.028
	0.000	0.048	0.034	
	0.000	0.017	0.011	
C+c+E+e+	7	0	0	7
	9.414	2.489	2.188	
	1.000	0.000	0.000	0.015
	0.045	0.000	0.000	
	0.015	0.000	0.000	
Column Total	154	165	145	464
	0.332	0.356	0.312	

Table des matières

Introduction	2
Contextualisation	7
Allo-immunisation du rhésus D	7
Physiopathologie.....	7
Système groupe sanguin RH	8
Génotypes RHD.....	9
Recommandations et Préventions	11
Méthode de génotypage non invasive du RHD fœtal sur sang maternel	13
Extraction de l'ADN fœtal et Technique Polymérisation En Chaîne (PCR) quantitative en temps réel.....	13
Technique identification polymorphisme maternel type D faible/ D partiel.....	15
Étude	16
Problématique et Objectifs	16
Matériels et Méthodes	17
Etude de la population présentant un polymorphisme du rhésus D.	17
Corrélation du gène RHD faible à une catégorie de population afin d'en améliorer la prise en charge.	18
Lieu et population à l'étude.....	18
Recueil des données	19
Diagnostic du RHD fœtal en routine.....	20
Analyse moléculaire des polymorphismes de type D faible : High Resolution Melting (HRM).....	22
Résultats	23
Population à l'étude	23
Description de la population étudiée.	25
Etude de la population présentant un polymorphisme du rhésus D.	27
Analyse et Discussion	35
Limites de l'étude	35
Biais	35
Difficultés rencontrées	36

Analyse des résultats et discussion	36
Population d'Afrique du Nord	39
Population d'Afrique Subsaharienne	41
Population d'Asie	43
Lien entre phénotype et génotype.....	43
Caractérisation des D faibles ::.....	44
Conclusion	46
Bibliographie	47
Annexes	51

POLYMORPHISME MATERNEL DU RHESUS D CHEZ LES FEMMES ENCEINTES DE PHENOTYPE D NEGATIF : À partir des patientes ayant bénéficiées d'une analyse du génotypage RHD foetal sur sang maternel en région PACA-Corse-Monaco.

Objectifs : Etudier la population présentant un polymorphisme du rhesus D en région PACA-Corse-Monaco et corrélér le D faible à une catégorie de population.

Matériel et Méthodes : Une étude descriptive, des polymorphismes découverts lors du génotypage foetal sur sang maternel au sein du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire de l'hôpital Nord, a été réalisée de 2008 à 2014.

Au total 464 patientes décrites selon trois données qualitatives : origine géographique maternelle, phénotype maternel et génotype maternel. Pour répondre au second objectif, 34 patientes ont été décrites sur les années 2013-2014.

Résultats : Chez les Caucasiens (n=183) il a été retrouvé une majorité de RHD faibles/partiels (n=108) et C+c+E-e+ est le phénotype prédominant (n=122). Pour l'Afrique du Nord (n=131) il a été retrouvé une majorité d'hybrides (n=54) et le phénotype le plus retrouvé est C-c+E-e+ (n=61). Chez patientes d'Afrique Subsaharienne (n=110) et Mayotte-Madagascar-Antilles-Caraïbes-Guyane-Réunion(n=35), le pseudogène est prédominant avec respectivement n=65 et n=25. Le phénotype C-c+E-e+ est le plus fréquent avec n=57 et n=25. Les 3 types de D faibles génotypés (1, 2 et 3) ont été retrouvés seulement chez les Caucasiens.

Conclusion : La population d'Afrique du Nord présente des différences significatives avec la population Caucasienne. Une similarité de répartition des polymorphismes a été mise en évidence entre la population d'Afrique Subsaharienne et Mayotte-Madagascar-Antilles-Guyane-Réunion. Il serait intéressant d'entreprendre une étude sur le gène D faible sur une plus grande cohorte afin d'adapter la stratégie de soin des patientes porteuses de D faibles type 1,2 et 3.

Mots-clés : polymorphisme RHD, immunisation Rhésus D foeto-maternelle, RHD faible, génotypage RHD non invasif.

MATERNAL POLYMORPHISM OF THE RHESUS D AT PREGNANCY WOMEN WITH PHENOTYPE D NEGATIVE: From patients having benefited fetal genotyping on maternal blood in PACA-CORSE-MONACO.

Background: Study the population presenting a polymorphism of the rhesus D in region PACA-Corse-Monaco and to correlate RHD weak polymorphism in a category of population

Study design and methods: A descriptive study, polymorphisms discovered during the fetal genotyping on maternal blood within the laboratory of biochemistry and molecular biology of the Hospital Nord in Marseille, was realized from 2008 to 2014.

All in all 464 patients described according to three qualitative data: maternal geographical origins, maternal phenotype and maternal genotype. To answer the second objective, 34 patients were described over the years 2013-2014.

Results:. In Caucasian (n=183) group was found a majority of weak/partial RHD (n=108) and C+c+E-e+ is the dominant phenotype (n=122). A majority of hybrids (n=54) was found in North Africa's (n=131) patients and the most found phenotype is C+c+E-e+ (n=61). The prevalence of RHD pseudogene polymorphism is higher in patients from Sub-Saharan Africa (n=131) and Mayotte-Madagascar-Antilles-Caraïbes-Guyane-Reunion (n=35) with n=65 and n-25 respectively. The phenotype C-c+E-e+ is the most retrieved with n=57 and n=25 respectively.

Weak D type 1, 2 or 3 has been detected only in the Caucasians population.

Conclusion: The population of North Africa presents significant differences with the Caucasian population. A similarity of distribution of polymorphisms was highlighted between the population of Sub-Saharan Africa and Mayotte-Madagascar-Antilles-Guyane-Réunion. It would be interesting to make a study on the gene D weak on a bigger samples to adapt the strategy of care for the patients who carries D weak 1,2 and 3.

Keys words: Maternal RHD polymorphisms, feto-maternal RHD sensitization, weak D, non-invasive RHD genotyping