



HAL
open science

Titrage des anticorps anti-érythrocytaires : place dans le suivi des allo-immunisations fœto-maternelles, comparaison de méthodes, et étude de robustesse de la technique de référence

Andréa Adiogo

► To cite this version:

Andréa Adiogo. Titrage des anticorps anti-érythrocytaires : place dans le suivi des allo-immunisations fœto-maternelles, comparaison de méthodes, et étude de robustesse de la technique de référence. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-02071833

HAL Id: dumas-02071833

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02071833>

Submitted on 23 Jun 2020

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.

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

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

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2018

N° 198

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE
DOCTEUR EN MÉDECINE

Titrage des anticorps anti-érythrocytaires : place dans le suivi des
allo-immunisations foëto-maternelles, comparaison de méthodes,
et étude de robustesse de la technique de référence

Présentée et soutenue publiquement
le 4 octobre 2018

Par

Andréa ADIOGO

Née le 11 juillet 1989 à Toulouse (31)

Dirigée par Mme Le Docteur Cécile Toly-Ndour, PH

Jury :

M. Le Professeur Pierre Aucouturier, PU-PHPrésident

M. Le Professeur Marc Vasse, PU-PH

M. Le Docteur Thierry Peyrard, Biologiste médical

Mme Le Docteur Agnès Mailloux, PH

M. Le Docteur Alain Stepanian, PH

M. Le Docteur Ferdinand Dhombres, MCU-PH

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	9
REMERCIEMENTS	11
INTRODUCTION	12
Chapitre 1 : Physiopathologie de l'incompatibilité foeto-maternelle érythrocytaire	13
1. Circonstances déclenchantes.....	13
2. Les principaux facteurs immunologiques associés	14
3. Le processus d'immuno-hémolyse fœtale	15
4. Les conséquences cliniques de l'immuno-hémolyse fœtale/néonatale.....	17
5. Les anticorps impliqués dans l'IFME (hors système ABO)	19
Chapitre 2 : Prise en charge clinico- biologique de l'IFME	22
1. Diagnostic biologique et clinique de l'IFME.....	22
a. Pendant la grossesse.....	22
b. En postnatal.....	29
2. Mesures thérapeutiques en situation d'IFME	31
a. Pendant la grossesse.....	31
b. En postnatal.....	32
Chapitre 3 : Problématique	34
MATERIEL ET METHODE	35
Chapitre 1 : Prise en charge immuno-hématologique de la femme enceinte allo-immunisée	35
1. Enquête nationale.....	35
2. Enquête internationale	46
Chapitre 2 : Comparaison de différentes méthodes de titrage des anticorps anti-érythrocytaires	47
1. Echantillons et réactifs.....	47
2. Technique de titrage en tube-cyto-centrifugation (<i>technique de référence</i>)	48

3. Technique de titrage en carte gel neutre (Biorad®).....	49
4. Technique de titrage en carte gel IgG (Diamed®).....	50
5. Etudes de répétabilité / reproductibilité des différentes techniques.....	50
Chapitre 3 : Etude de la robustesse de la technique de référence de titrage.....	51
Chapitre 4 : Traitement des données	52
RESULTATS.....	53
Chapitre 1 : Surveillance immuno-hématologique de la femme enceinte allo-immunisée	53
1. Résultats de l'enquête nationale	53
2. Résultats de l'enquête internationale	66
Chapitre 2 : Comparaison des méthodes de titrage tube-cyto centrifugation vs carte gel neutre (Biorad®) vs carte gel IgG (Diamed®).....	71
1. Comparaison de méthodes de titrage : anti-D (RH1)	71
2. Comparaison de méthodes de titrage : anti-K (KEL1)	72
3. Comparaison de méthodes de titrage : anti-c (RH4)	74
4. Etude de corrélation entre les techniques/ répartition des différences de titres 75	
5. Etudes de répétabilité et reproductibilité	78
Chapitre 3 : Etude de la robustesse de la technique de référence de titrage.....	80
1. Le phénotype de l'hématie-test : D+C+E+c+e+ vs D+C+E-c-e+, et D+C+E+c+e+ vs D+C-E+c+e-	81
1. Le nombre d'hématies-tests : 1 hématie-test vs pool de 3 hématies-tests	83
2. La concentration en hématie-test : 4% vs 2% et 6%	83
3. Le mode de dilution : dilution automatisée (TECAN) vs dilution manuelle..	84
4. La durée d'incubation : 60 min vs 45 min et 75 min	85
5. La concentration en antiglobuline : AGH diluée au 1/3 vs AGH pure	86

6.	La durée de la dernière centrifugation avant lecture : 20 secondes vs 60 secondes, et 20 secondes vs 120 secondes	87
7.	La vitesse de la dernière centrifugation avant lecture : 179g vs 500 g et 179 g vs 779 g	89
8.	Le délai de lecture des agglutinats : immédiat vs 5 min et 10 min.....	90
9.	La variabilité inter-opérateur	91
	DISCUSSION	93
	Chapitre 1 : Les résultats de l'enquête nationale	93
	Chapitre 2 : Les résultats de l'enquête internationale	95
	Chapitre 3 : La comparaison des méthodes de titrage	99
	Chapitre 4 : La robustesse du titrage	101
	CONCLUSION	104
	BIBLIOGRAPHIE	105
	LE SERMENT D'HIPPOCRATE	110

SOMMAIRE DES ILLUSTRATIONS

TABLEAUX

Tableau 1. D'après S. Huguet-Jacquot et al, RFL 2015 [31].	21
Tableau 2. Calendrier des RAI pour les femmes enceintes sur la base des recommandations de l'HAS (D'après L. Mannessier, 2009) [32].	23
Tableau 3. Taux critiques opérationnels appliqués pour le déclenchement d'un suivi spécifique foetal (D'après A. Mailloux, CNRHP, hôpital Saint-Antoine 75012 Paris). SA : Semaines d'aménorrhée ; 1 µg/ml = 5 UI/ml = 250 UCHP/ml.	26
Tableau 4. Quelques données générales sur le suivi immuno-hématologique de la femme enceinte dans 13 pays.	67
Tableau 5. Techniques de titrage utilisées dans 13 pays.	68
Tableau 6 (Gauche). Tableau 7 (Droit). Seuils critiques (titrage et dosage pondéral) pour la mise en œuvre d'une surveillance clinique par vélocimétries doppler de l'ACM dans 13 pays.	70
Tableau 8. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-D : titres.	71
Tableau 9. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-D : scores.	72
Tableau 10. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-K : titres.	73
Tableau 11. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-K : scores.	74
Tableau 12. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-c : titres.	74
Tableau 13. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-c : scores.	75
Tableau 14. Différence de titres carte gel neutre vs tube et carte gel IgG vs tube pour les anti-D, -K, -c.	77
Tableau 15. Etudes de la répétabilité et de la reproductibilité des titres du témoin titrage anti-D dans les 3 techniques.	78
Tableau 16. Etude de la répétabilité du témoin titrage anti-D dans les 3 techniques et de la reproductibilité en technique tube.	79
Tableau 17. Etude de la robustesse de la technique de titrage en tube pour l'anti-D : titres.	80

Tableau 18. Etude de la robustesse de la technique de titrage en tube pour l'anti-D : scores.....	81
--	----

FIGURES

Figure 1. Etapes du développement de la maladie hémolytique fœtale (Inspiré de Kuby Immunology sixth edition, 2007).....	15
Figure 2. Schéma représentant différents facteurs pouvant expliquer la sévérité de l'atteinte fœtale dans la MHFN (d'après A. Hadley et al, 1998) [19] .	17
Figure 3. Pathogenèse et conséquences de la MHFN (d'après M. De Haas et al, 2015) [20].	19
Figure 4. D'après S. Huguet-Jacquot et al, 2015 [31].	24
Figure 5. Prise en charge d'une femme enceinte allo-immunisée avec un anti-RH1 ou anti-KEL1 ou anti-RH4 (CNRHP, hôpital Saint-Antoine Paris).	30
Figure 6. Gamme d'intensité d'agglutination en technique tube (D'après le CNRGS, INTS-Institut National de la Transfusion Sanguine Paris).	49
Figure 7. Gamme d'intensité d'agglutination en technique carte gel (D'après le CNRGS, INTS Paris).	50
Figure 8. Répartition des laboratoires réalisant la RAI (147 réponses).	53
Figure 9. Destination des prélèvements pour les laboratoires ne réalisant pas de RAI (15 réponses).	54
Figure 10. Les différentes techniques utilisées pour la RAI : mode de réalisation de la RAI (128 réponses/132), supports utilisés pour la RAI (92 réponses/132).	55
Figure 11. Sensibilisation de la RAI (enzymes) et contexte obstétrical (132 réponses)...	56
Figure 12. Répartition des laboratoires réalisant l'IAI (132 réponses).	56
Figure 13. Destination des prélèvements pour les laboratoires ne réalisant pas d'IAI (73 réponses/75).	57
Figure 14. Les différentes techniques utilisées pour l'IAI : mode de réalisation de l'IAI (56 réponses/57), supports utilisés pour l'IAI (52 réponses/57).	58
Figure 15. Sensibilisation de l'IAI (enzymes) et contexte obstétrical (57 réponses).	59

Figure 16. Répartition des laboratoires effectuant l'IAI pour le titrage des anticorps à risque obstétrical chez la femme enceinte (57 réponses).....	59
Figure 17. Destination et fréquence d'envoi des titrages pour les laboratoires effectuant les IAI sans titrage (respectivement, 28 réponses et 26 réponses/28).....	60
Figure 18. Les différentes techniques utilisées pour le titrage (29 réponses).	61
Figure 19. Les conseils mentionnés sur un compte-rendu de titrage (29 réponses).	62
Figure 20. Répartition des laboratoires effectuant le microtitrage en plus du titrage des anticorps (29 réponses).	63
Figure 21. Destination et motifs d'envoi des prélèvements pour microtitrage (respectivement, 44 réponses et 30 réponses /32).....	64
Figure 22. Destination et rythme d'envoi des prélèvements pour dosage pondéral (respectivement,51 réponses et 41 réponses).....	65
Figure 23. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-D : titres.....	72
Figure 24. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-K : titres.....	73
Figure 25. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-c : titres.....	75
Figure 26. Etude de corrélation entre la technique tube et les techniques en carte gel neutre et carte gel IgG pour l'anti-D, l'anti-K et l'anti-c.....	76
Figure 27. Influence du phénotype de l'hématie-test sur les titres d'anti-D : D+C+E-c-e+ vs D+C+E+c+e+ (a) ; D+C-E+c+e- vs D+C+E+c+e+ (b).....	82
Figure 28. Influence du nombre d'hématies-test (1 hématie-test vs pool de 3 hématies-tests) sur les titres d'anti-D.	83
Figure 29. Influence de la concentration en hématies-tests (2% vs 4% vs 6%) sur les titres d'anti-D.	84
Figure 30. Influence du mode de dilution des échantillons (dilution automatisée vs manuelle) sur les titres d'anti-D.....	85
Figure 31. Influence du temps d'incubation (45 min vs 60 min vs 75min) sur les titres d'anti-D.	86
Figure 32. Influence de la concentration en antiglobuline (AGH diluée au 1/3 vs AGH pure) sur les titres d'anti-D.	87
Figure 33. Influence de la durée de centrifugation sur les titres d'anti-D :20 sec vs 60 sec (a) ; 20 sec vs 120 sec (b).....	88

Figure 34. Influence de la vitesse de centrifugation sur les titres d'anti-D : 179 g vs 779 g (a) ; 179 g vs 779 g (b).....	90
Figure 35. Influence du délai de lecture des agglutinats (lecture immédiate vs après 5 min vs après 10 min) sur les titres d'anti-D.	91
Figure 36. Influence du changement d'opérateur sur les titres d'anti-D.	92

ABREVIATIONS

AAP: *American Academy of Pediatrics*

Ac : Anticorps

ACM : Artère cérébrale moyenne

ADCC : *Antibody Dependant Cellular Assay*

Ag : Antigène

BFI : Basse Force Ionique

CLT : *Chemiluminescence Test*

CNGOF : Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français

CNRGS : Centre National de Référence des Groupes Sanguins

CNRHP : Centre National de Référence en Hémodiologie Périnatale

Cofrac : Comité français d'accréditation

EFS : Etablissement Français du Sang

HAS : Haute Autorité de Santé

HFM : Hémorragie fœto-maternelle

HLA : *Human Leucocyte Antigen*

IAI : Identification d'agglutinines irrégulières

IFME : Incompatibilité fœto-maternelle érythrocytaire

Ig : Immunoglobulines

INTS : Institut National de la Transfusion Sanguine

ISBT: *International Society of Blood Transfusion*

LISS : *Low Ionic Strength Solution*

MHFN : Maladie hémolytique du fœtus et/ou du nouveau-né

MHNN : Maladie hémolytique du nouveau-né

MMA : *Monocyte Monolayer Assay*

PVC-ACM : Pic systolique de vélocité de l'artère cérébrale moyenne

RAI : Recherche d'agglutinines irrégulières

SFTS : Société Française de Transfusion Sanguine

TIA : Test indirect à l'antiglobuline

TIU : Transfusion in utero

vs : versus

REMERCIEMENTS

La rédaction de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je voudrais tout d'abord adresser ma profonde gratitude à la directrice de thèse, le Dr Cécile TOLY-NDOUR, pour sa patience remarquable, sa disponibilité et les ajustements qu'elle a apportés tout au long de ma réflexion.

Je souhaite également remercier le Dr Agnès Mailloux pour tout le temps qu'elle m'a accordée et ses précieux conseils dans le choix de mon sujet.

Je remercie toute l'équipe du CNRHP pour leur bienveillance.

Je tiens à remercier spécialement le Dr Thierry Peyrard pour le questionnaire qu'il a préparé, puis proposé au groupe de travail « *Immunohaematology* » de l'ISBT.

Je remercie l'ensemble du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance envers ma famille. Premièrement, je l'adresse à ma sœur Annie, à mes parents, et à mon frère Jason pour leur soutien indéfectible. C'est une grâce qui m'a été accordée d'être liée à de telles personnes. Mais aussi, à mon oncle Gaspard, mes tantes Odile et Marcelline pour leur présence réconfortante.

Je souhaite rendre grâce à Dieu, et à Jésus-Christ, le prince de la paix. Malgré les épreuves de la vie, je m'attache à ces mots de la parole de vie tirés du livre d'Esaië (40 :31, Bible version *Louis Segond*) : « Mais ceux qui se confient en l'Eternel renouvellent leur force. Ils prennent le vol comme les aigles ; Ils courent, et ne se lassent point, Ils marchent, et ne se fatiguent point. ».

INTRODUCTION

On parle d'incompatibilité fœto-maternelle érythrocytaire (IFME) lorsque la mère produit des allo-anticorps dirigés contre un ou plusieurs antigènes érythrocytaires exprimés par son fœtus, absents chez elle et hérités du père, transmissibles par voie placentaire. Son incidence est estimée à 4/1000 naissances en France. La conséquence redoutée est la survenue d'une maladie hémolytique du fœtus ou du nouveau-né (MHFN), qui dans les formes sévères, moins de 5% des cas [1], peut entraîner le décès ou de graves séquelles. Les incompatibilités du système érythrocytaire ABO représentent plus de 50% des cas et sont responsables d'atteintes plutôt modérées, quasi-exclusivement néonatales. Le terme d'incompatibilités « non ABO » inclut un ensemble très varié d'anticorps anti-érythrocytaires, mais les plus importants en termes de rapport fréquence/dangerosité sont l'anti-D (RH1)¹, l'anti-K (KEL1) et l'anti-c (RH4), qui exposent au risque d'anémie sévère dès le stade fœtal. Le suivi immuno-hématologique des femmes enceintes est obligatoire et fait l'objet de recommandations officielles depuis 1985. Il permet de dépister les immunisations maternelles, d'assurer une surveillance obstétricale adaptée au couple mère/enfant, afin de détecter précocement d'éventuels signes cliniques de MHFN et mettre en place les mesures thérapeutiques qui s'imposent.

¹ Nomenclature internationale.

Chapitre 1 : Physiopathologie de l'incompatibilité fœto-maternelle érythrocytaire

La grossesse est un processus physiologique au cours duquel la femme porte en son sein un organisme étranger, son fœtus, qui ne possède que la moitié de son patrimoine génétique, l'autre moitié venant du père. L'issue est favorable dans la grande majorité des cas grâce au phénomène de tolérance immunitaire. Une rupture de cette tolérance pourra être observée dans certaines situations, avec des traductions cliniques variées.

Dans le cadre de l'incompatibilité fœto-maternelle érythrocytaire, cela se manifeste par l'immunisation maternelle anti-érythrocytaire. C'est la synthèse par le système immunitaire de la mère, d'allo-anticorps anti-érythrocytaires susceptibles de reconnaître des antigènes étrangers spécifiques sur des hématies homologues, en l'occurrence celle de son fœtus, et d'induire leur destruction (cf. figure 1). Elle touche 1-2 femmes/1000 [2].

1. Circonstances déclenchantes

Les allo-anticorps maternels peuvent apparaître à la suite de différents événements immunisants qui sont :

- Les hémorragies fœto-maternelles (HFM). Elles résultent de microlésions placentaires et correspondent au passage d'hématies fœtales dans la circulation sanguine maternelle au cours de la grossesse. Leur incidence augmente tout au long de la grossesse : jusqu'à 45% au 3^e trimestre [3], près de 50% à l'accouchement [4]. Elles sont le plus souvent spontanées, et de faible abondance (*0.1 ml, microhémorragies occultes*). Lorsqu'elles sont provoquées par des complications obstétricales (mort fœtale *in utero*, accouchement dystocique etc.) ou des facteurs extérieurs (version, amniocentèse, etc.), on peut observer des hémorragies massives. C'est en général à la grossesse suivante que l'immunisation devient problématique : un nouveau passage d'hématies fœtales chez la mère entraîne une réponse secondaire plus rapide et délétère du système immunitaire. S'il est admis que le risque d'apparition d'un anticorps est corrélé à l'importance de l'HFM, la répétition de microhémorragies est tout autant préjudiciable, puisqu'elle favorise les réactivations de l'immunisation. Bien que le phénomène soit rare, on notera qu'un anticorps peut

apparaître et être cliniquement significatif au décours d'une 1^{ère} grossesse (« bonnes répondeuses »).

-La transfusion sanguine (culots érythrocytaires, sang total). Aujourd'hui, c'est une étiologie très rare en France du fait de la réglementation transfusionnelle. Cette dernière vise à prévenir l'immunisation dans les systèmes sanguins les plus immunogènes : respect de la phéno-compatibilité ABO-RH1 RH-KEL1 des CGR sélectionnés en transfusion, et choix de produits K - (KEL:-1) pour toutes les femmes en âge de procréer [5]. Elle est plus souvent en cause dans les immunisations concernant les autres systèmes érythrocytaires (*MNS, FY, JK*).

- Autres (*circonstances exceptionnelles*) : allogreffe de moelle osseuse, transplantation d'organes solides, toxicomanie IV etc.

2. Les principaux facteurs immunologiques associés

❖ Facteurs favorisants

- L'immunogénicité des antigènes. C'est la capacité d'un antigène à induire une réponse immunitaire. Au sein des systèmes de groupes sanguins, les antigènes les plus immunogènes sont par ordre décroissant : D>K> E>c [6].

- La densité antigénique à la surface des hématies fœtales.

- Le système HLA maternel. Des études ont montré une association entre certains allèles du locus HLA-DR et la fréquence de l'immunisation érythrocytaire [7], de même que des taux élevés en anticorps [8].

❖ Facteurs limitants

-L'incompatibilité ABO. Elle restreint le risque de survenue d'une allo-immunisation par HFM en fin de grossesse, avec davantage d'efficacité pour les fœtus du groupe A (90%), que B (55%) [9]. La destruction des hématies fœtales par les anticorps maternels correspondants se ferait dès leur arrivée dans la circulation maternelle.

3. Le processus d'immuno-hémolyse fœtale

La 1^{ère} étape est la reconnaissance des anticorps maternels circulants de nature IgG par des récepteurs spécifiques (FcγRn), fonctionnels dès 10 SA [10], au niveau de la barrière placentaire (*syncytiotrophoblaste*). Il en résulte le passage actif des anticorps maternels dans la circulation fœtale. La fixation des anticorps maternels sur leur cible antigénique entraîne la formation de complexes-immuns Ag-Ac à la surface des globules rouges fœtaux qu'ils recouvrent. Les complexes immuns se lient aux récepteurs FcγR des macrophages spléniques fœtaux et les activent : c'est le phénomène d'immuno-adhérence. La dernière étape est la destruction extravasculaire (rate) des hématies fœtales par phagocytose ou lyse de contact.

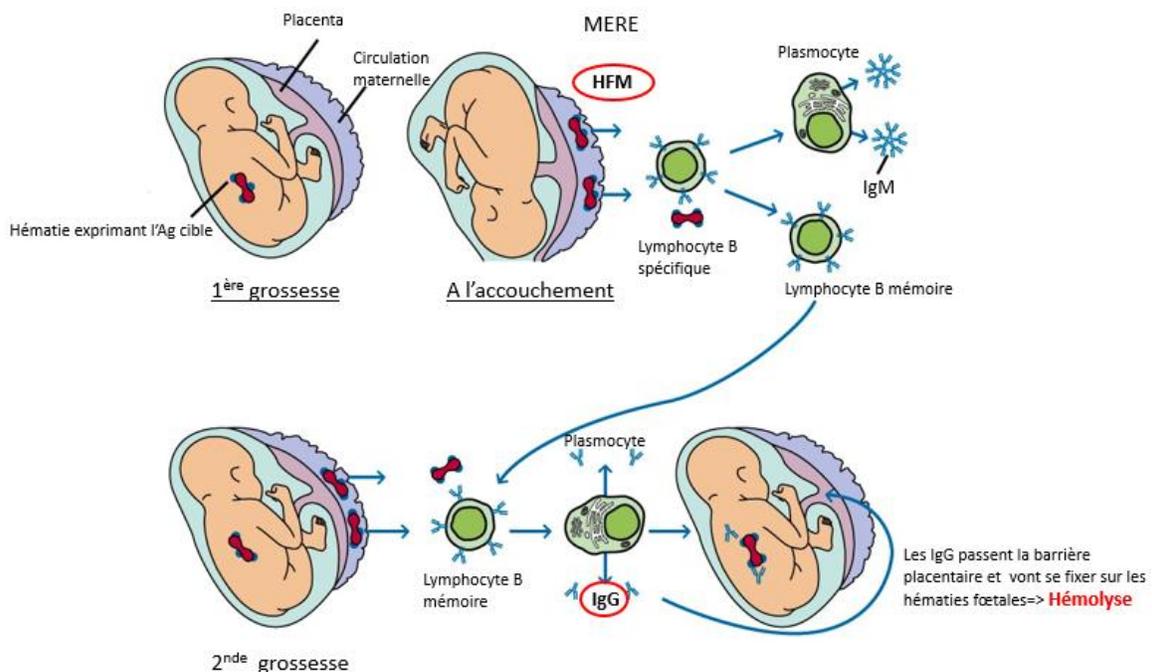


Figure 1. Etapes du développement de la maladie hémolytique fœtale (Inspiré de Kuby Immunology sixth edition, 2007).

La vitesse d'installation et le retentissement clinique de l'hémolyse varient en fonction de plusieurs paramètres (Cf. figure 2).

Les paramètres prépondérants sont :

- La spécificité de l'anticorps maternel (*ou des anticorps maternels*)
- Le taux maternel d'anticorps
- Le transfert placentaire des anticorps. Il dépend de l'âge gestationnel. En effet, si à 20 SA le taux fœtal d'anticorps correspond à 10% du taux maternel, au 3e trimestre de la grossesse il peut être supérieur au taux maternel.
- L'affinité pour l'antigène. De principe, plus elle est élevée, plus l'anticorps est dangereux.

S'y ajoutent :

- Les sous-classes d'anticorps. Les IgG1 et IgG3 sont très majoritaires (IgG2, IgG4 plus rares). Leur répartition, celle de leurs variants allotypiques, ainsi que leur profil de glycosylation ont une importance [11]. Cela conditionne également la capacité d'activation des récepteurs macrophagiques via le fragment Fc. Quelques données sont en faveur d'une surreprésentation des IgG1 et des IgG riches en galactose à des termes relativement précoces [12, 13]. Cependant, dans la littérature l'association entre la sous-classe d'IgG et le degré d'hémolyse est plus soumise à controverse [14-16].
- Le nombre de copies d'antigène à la surface des hématies fœtales.
- La présence d'anticorps anti-HLA dirigés contre les monocytes fœtaux. C'est un facteur protecteur. Des anticorps anti-HLA de classe I [17] et II [18] dirigés contre les monocytes fœtaux ont été mis en évidence chez des patientes ayant des taux très élevés d'anticorps, mais dont les nouveau-nés présentaient paradoxalement une MHNN modérée.

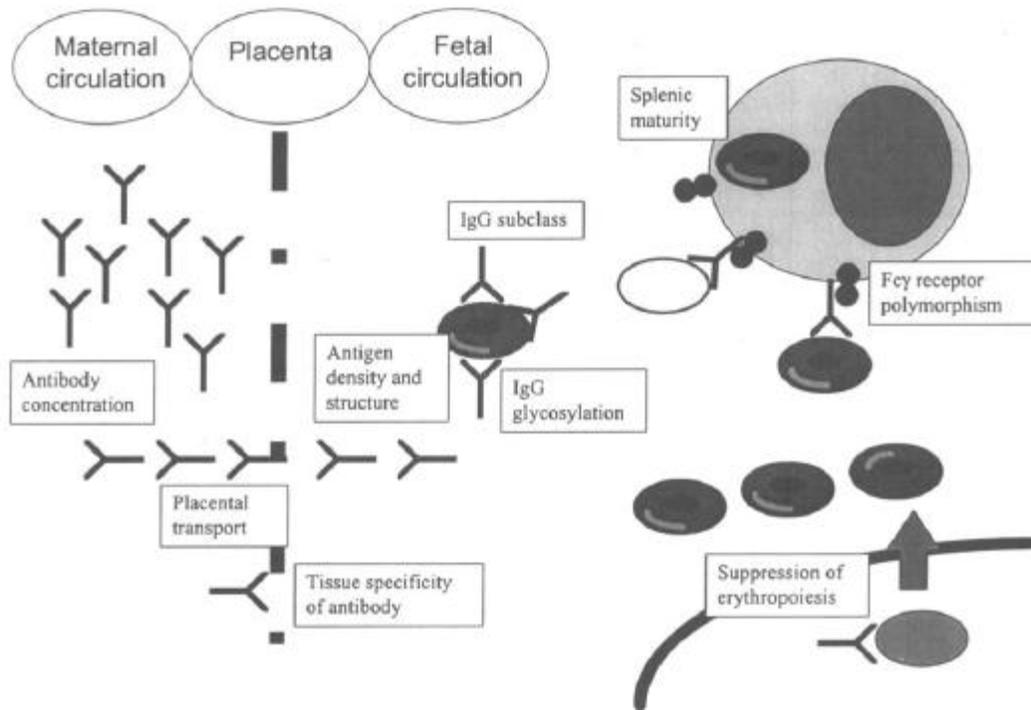


Figure 2. Schéma représentant différents facteurs pouvant expliquer la sévérité de l'atteinte fœtale dans la MHN (d'après A. Hadley et al, 1998) [19] .

4. Les conséquences cliniques de l'immuno-hémolyse fœtale/néonatale

Les 2 principales conséquences de l'hémolyse fœtale/néonatale sont : l'anémie et l'hyperproduction de bilirubine (Cf. figure 3).

Si l'hémolyse est modérée, l'IFME sera asymptomatique ou d'expression clinique essentiellement postnatale, caractérisée par un ictère et une anémie de sévérité variable. L'ictère néonatal, coloration jaune de la peau et des conjonctives, est le résultat du dépôt de la bilirubine au niveau des muqueuses et téguments (taux de bilirubine $\geq 50 \mu\text{mol/L}$). Il est précoce, observé dans les 72 premières heures de vie. Pendant la grossesse, la bilirubine (produit de dégradation de l'hémoglobine) libérée en excès, est en grande partie éliminée via le placenta vers la circulation maternelle. Mais à la naissance, elle va s'accumuler rapidement du fait de l'immaturité hépatique les premiers jours de vie. Sa présence à des taux élevés peut devenir nocive car, la bilirubine libre non liée dans la

circulation (saturation de la liaison à l'albumine, puis aux phospholipides membranaires) est liposoluble et capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, exposant à un risque de toxicité neurologique. L'anémie quant à elle se traduit par une pâleur cutanéomuqueuse, et s'accompagne parfois d'une hépatosplénomégalie. Suivant l'intensité du processus hémolytique, elle peut être présente dès la naissance ou apparaître après une semaine, voire 3 semaines de vie. Elle évolue tant que les anticorps maternels sont présents et que l'érythropoïèse est insuffisante pour compenser les besoins. Sa durée est variable mais n'excède pas 3 mois et demi.

Si l'hémolyse est sévère, l'IFME peut s'exprimer dès la vie fœtale par une anémie profonde (taux d'Hb <6 g/dl). En effet, la destruction massive et continue des hématies fœtales entraîne une hyperstimulation de l'érythropoïèse essentiellement extra-médullaire (rate et foie) jusqu'au 6^e mois fœtal, puis médullaire, à visée compensatoire. Au niveau hépatique, cette intensification de la production peut être à l'origine de perturbations de la circulation portale qui concourent au développement d'une ascite. D'autres complications pourront apparaître : hépatomégalie, aspect de placenta épaissi, hydramnios. De façon concomitante à l'aggravation de l'anémie, l'évolution de l'atteinte hépatique aboutit à une anasarque fœto-placentaire liée à une réduction significative de la production d'albumine. Initialement réversible par transfusion (stade d'insuffisance cardiaque fonctionnelle), elle ne l'est plus une fois les lésions cérébrales hypoxiques constituées : la mort fœtale est inévitable. A la naissance, l'ictère est souvent majeur. Lorsque chez un nouveau-né à terme, dans les 96 premières heures de vie, le taux de bilirubine est supérieur à 340 µmol/L (hyperbilirubinémie sévère) on peut craindre une fixation irréversible de la bilirubine sur les noyaux gris centraux, ce qui déclenche des processus de nécrose cellulaire. L'atteinte des structures cérébrales dénommée sous le terme « d'ictère nucléaire », se traduit cliniquement par une encéphalopathie bilirubinémique, et peut se compliquer de séquelles motrices (*syndrome extrapyramidal*), sensorielles (*surdité centrale*), voire du décès.

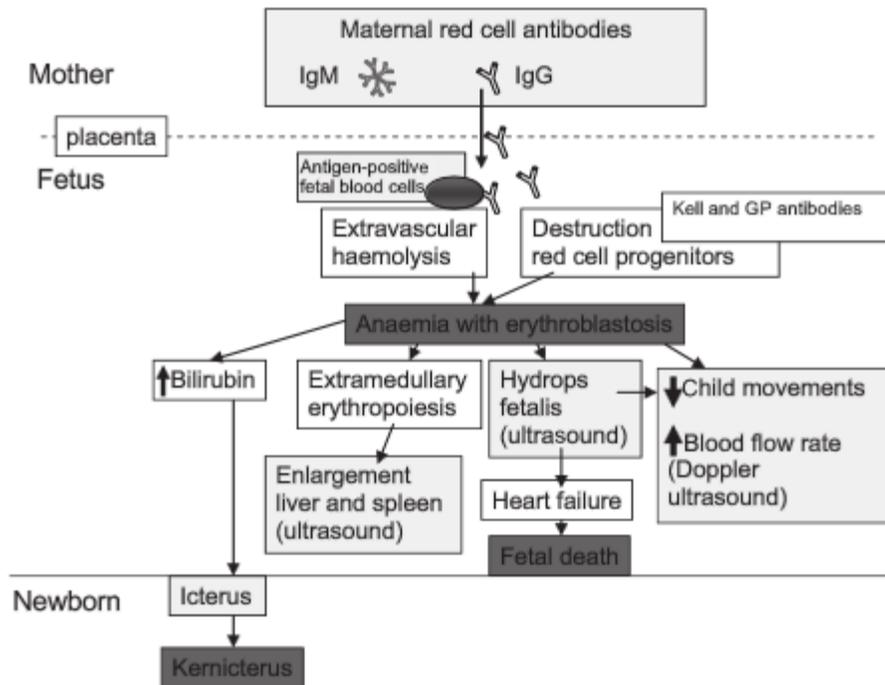


Figure 3. Pathogenèse et conséquences de la MHFN (d'après M. De Haas et al, 2015) [20].

5. Les anticorps impliqués dans l'IFME (hors système ABO)

Les 3 principaux anticorps quant à la gravité clinique potentielle sont (Cf. tableau 1) :

- L'anti-D (RH1). C'est la 1^{ère} cause d'IFME non ABO : elle concerne en France environ 0,9 naissances /1000 par an. 50% des cas sont symptomatiques, avec près de 12% de formes sévères d'expression anténatale [3]. En effet, l'antigène D, le plus immunogène de tous les antigènes érythrocytaires, est bien exprimé à la surface des hématies fœtales dès le 30^e jour de gestation. Il est impliqué dans 81% des cas d'anémie fœtale sévère d'après les données rétrospectives récentes du CNRHP (2007-2016). L'allo-immunisation anti-D maternelle reste néanmoins une condition rare. En France chaque année, sur les 15% de femmes enceintes D-, 1% sont immunisées. Son incidence a considérablement diminué depuis la généralisation de la prévention par immunoprophylaxie anti-D introduite au cours des années 1970. Elle repose aujourd'hui sur l'administration systématique chez toutes les femmes enceintes D négatif non immunisées, (sauf si fœtus confirmé de génotype *RHD* négatif) de 300 µg de Rhophylac® (*immunoglobulines anti-D*

polyvalentes issues du plasma de donneuses fortement immunisées rémunérées) à 28 SA. Une dose standard de 200 µg supplémentaire adaptable si besoin (test de Kleihauer), est recommandée à l'occasion d'évènements ou gestes à risque d'HFM pendant la grossesse (prévention ciblée), et à l'accouchement (prévention du postpartum) suivant les données immuno-hématologiques maternelles et fœtales/néonatales.

- L'anti-K (KEL1). L'IFME liée à un anti-K est beaucoup moins fréquente que celle causée par l'anti-D. On dénombre 0,05 cas symptomatiques /1000 naissances [3]. L'antigène K est porté par 9% de la population chez sujets d'origine caucasienne, et 2% chez les sujets d'origine africaine [21]. Lorsque l'immunisation est d'origine transfusionnelle, le risque de grossesse incompatible en l'absence de phénotype paternel connu est faible, environ 5%. L'anti-K est impliqué dans 13% des cas d'anémie fœtale sévère d'après les données rétrospectives récentes du CNRHP (2007-2016). Sa dangerosité obstétricale provient de sa capacité à réduire l'érythropoïèse, par inhibition voire destruction des progéniteurs érythroïdes médullaires fœtaux [22, 23], conduisant à une aggravation rapide de l'anémie non compensée (*érythroblastopénie*) quelques fois très précoce (début du 2^e trimestre).
- L'anti-c (RH4). Son mécanisme d'action est comparable à celui de l'anti-D. Avec l'anti-E, il en cause dans la moitié des IFME non ABO non anti-D : son incidence est de 0,1 cas symptomatiques /1000 naissances [3]. Il représente 1% des cas d'anémie fœtale sévère d'après les données rétrospectives récentes du CNRHP (2007-20016).

On retrouve, également :

- Dans le système RH : l'anti-E (RH3), rarement en cause dans les anémies fœtales (3^e trimestre), l'anti-e (RH5), anti-C (RH2), l'anti-G (RH12) essentiellement à risque postnatal avec atteintes modérées.

- Dans les autres systèmes : les plus fréquents sont l'anti-M (MNS1), l'anti-Fy^a (FY1), l'anti-Jk^a (JK1), susceptibles d'induire une MHNN et exceptionnellement une anémie fœtale [24] [25].

Les anticorps « anti-publics » (dirigés contre des antigènes de fréquence élevée, prévalence >99 % dans la population générale) ex : anti-Jr^a, anti-U, et « anti-privés » (dirigés contre des antigènes de faible fréquence, prévalence <1% dans la population générale) sont rares, mais peuvent être responsables de MHNN sévères [26-28]. Au total, près d'une centaine d'anticorps ont été décrits dans la MHFN [29].

Des associations d'anticorps sont possibles. L'existence d'une allo-immunisation érythrocytaire multiple augmente le risque de MHFN cliniquement significative [30].

Tableau 1 – Allo-anticorps courants et risque de maladie hémolytique du nouveau-né.			
Spécificité (nomenclature traditionnelle)	Spécificité (nomenclature numérique)	Risque d'anémie fœtale	Maladie hémolytique néonatale
Anti-D	Anti-RH1	OUI après 15 SA	OUI
Anti-Kell	Anti-KEL1	OUI après 15 SA	OUI
Anti-c	Anti-RH4	OUI après 20 SA	OUI
Anti-E	Anti-RH3	RARE (3 ^e trimestre)	OUI
Anti-e	Anti-RH5	Exceptionnel	OUI
Anti-Fya	Anti-FY1	Exceptionnel	OUI
Anti-Jka	Anti-JK1	Exceptionnel	OUI
Anti-Kpa	Anti-KEL3	Exceptionnel	OUI
Anti-M	Anti-MNS1	Exceptionnel	OUI
Anti-A	Anti-ABO1	NON	OUI
Anti-B	Anti-ABO2	NON	OUI
Anti-C	Anti-RH2	NON	OUI
Anti-Fyb	Anti-FY2	NON	OUI
Anti-Jkb	Anti-JK2	NON	OUI
Anti-S	Anti-MNS3	NON	OUI
Anti-G	Anti-RH12	NON	OUI

Tableau 1. D'après S. Huguot-Jacquot et al, RFL 2015 [31].

Chapitre 2 : Prise en charge clinico- biologique de l'IFME

1. Diagnostic biologique et clinique de l'IFME

a. Pendant la grossesse

Recherche d'une immunisation maternelle

❖ La RAI (*recherche d'agglutinines irrégulières ou d'anticorps anti-érythrocytaires*)

C'est l'examen-clé. Elle fait partie du bilan obligatoire prescrit lors de la 1^{ère} visite prénatale, associé au groupage ABO-RH1/ phénotypage érythrocytaire RH-KEL1. Dans un premier temps, le but est de dépister par un test indirect à l'antiglobuline (TIA) les anticorps anti-érythrocytaires non ABO. Chez la femme enceinte, la surveillance est renforcée et les textes réglementaires prévoient un calendrier des RAI suivant le statut immunologique (Cf. tableau 2). Car, si la majorité des allo-anticorps sont détectés au 1^{er} trimestre, une faible proportion d'anticorps ne sera décelée qu'au 2^e trimestre, parce qu'initialement absents ou à des taux « infra-sérologiques » (en-dessous du seuil de détection de la technique) (*ex : anti-D*).

Femme enceinte	Date des RAI
Femme RHI primigeste sans antécédent transfusionnel	Avant la fin du 3 ^e mois Au cours du 8 ^e ou 9 ^e mois
Femme RHI primigeste avec antécédent transfusionnel	Avant la fin du 3 ^e mois Au cours du 6 ^e mois Au cours du 8 ^e mois Au cours du 9 ^e mois
Femme RH-I	Avant la fin du 3 ^e mois Au cours du 6 ^e mois Au cours du 8 ^e mois* Au cours du 9 ^e mois Avant l'injection d'immunoglobuline Dans les 8 semaines suivant l'accouchement
Chez toutes les femmes Femmes allo-immunisées	En cas de besoin transfusionnel RAI régulièrement avec titrage et dosage pondéral (pour les anti-RH)

Tableau 2. Calendrier des RAI pour les femmes enceintes sur la base des recommandations de l'HAS (D'après L. Mannesier, 2009) [32].

(*) Sauf si injection d'Ig Rh à 28 SA (*recommandation CNGOF*)

Tout dépistage positif chez une femme enceinte, impose une seconde étape d'identification (IAI) sans délai de la spécificité de l'anticorps pour déterminer s'il existe un risque hémolytique fœtal ou néonatal (Cf. figure 4). Si l'anticorps identifié expose le fœtus ou nouveau-né à un risque d'hémolyse, il doit faire l'objet d'une quantification [33], parce que certains anticorps, à des taux élevés, pourront être cliniquement patents dès la fin du 1^{er} trimestre (*ex : anti-D, anti-K*).

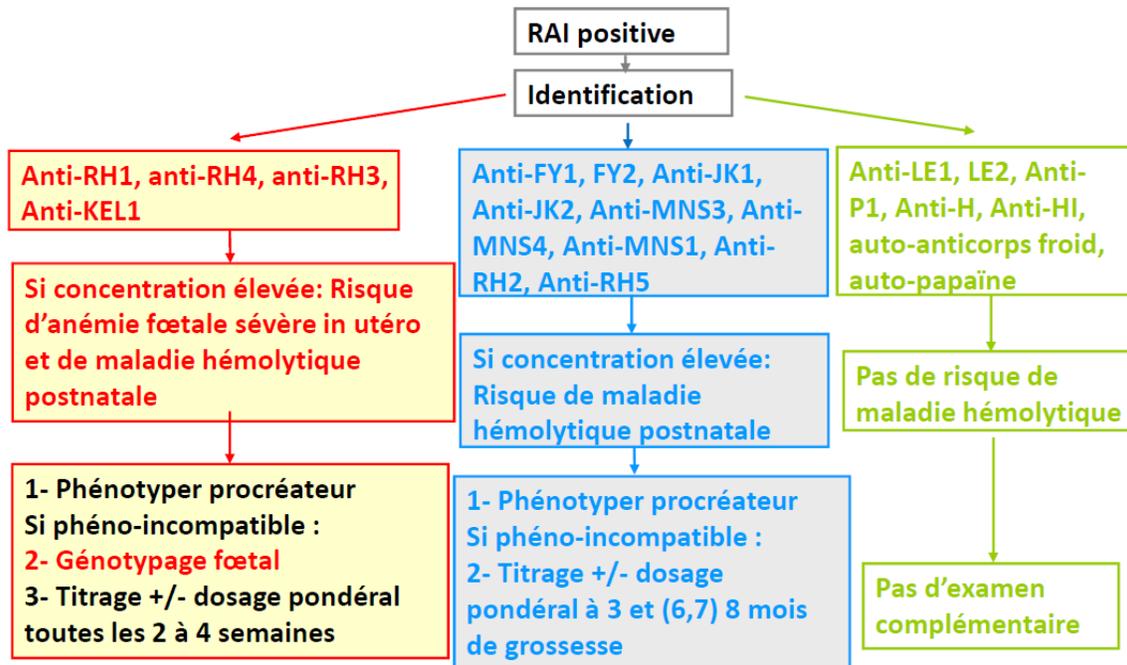


Figure 4. D'après S. Huguet-Jacquot et al, 2015 [31].

Quantification des anticorps

L'évolution du taux d'anticorps maternel est imprévisible, et impose la répétition des mesures tout au long de la grossesse. Sa corrélation avec le développement d'une anémie fœtale n'est pas linéaire, de sorte que le risque est évalué grâce à la notion de « seuil ». On distingue parmi les examens de quantification :

❖ Le titrage des anticorps anti-érythrocytaires

C'est l'examen le plus répandu. La méthode de référence en tube-cyocentrifugation repose sur un TIA avec des dilutions successives de plasma/sérum et des hématies-tests natives en solution saline. D'autres méthodes existent (carte gel, immunocapture). Un de ses avantages est son accessibilité théorique pour la totalité des anticorps, puisqu'il suffit de disposer d'hématies-tests exprimant l'antigène-cible (hématies *informatives*). En outre, le titrage donne un reflet de la concentration et de l'affinité de l'anticorps, et valorise ainsi les anticorps de forte affinité parfois dangereux dès la fin du 1^{er} trimestre (*anti-D*,

anti-K). Parmi ses autres points forts, on peut citer : sa facilité de mise en œuvre, son coût raisonnable, et son ancienneté « rassurante » auprès des cliniciens accoutumés à s'en servir. En revanche, le pendant de cette technique est la sous-estimation des titres d'anticorps de moyenne et de basse affinité (ex : anti-c), moins en accord avec le risque réel. De plus, sa reproductibilité médiocre (technique répétable à 1 dilution près), impose en intra-laboratoire le traitement d'un échantillon en parallèle du précédent pour pouvoir interpréter toute augmentation de titre (2 dilutions d'écart minimum) [33]. En inter-laboratoire, la majoration des variations inexplicables justifie que le suivi se fasse dans un seul laboratoire.

❖ Le dosage pondéral

C'est une approche quantitative en mesure continue automatisée de valeurs. La concentration en anticorps est calculée à partir des résultats d'étalonnage d'une solution d'anticorps de référence. Différents procédés existent, mais la technique d'hémagglutination en flux continu est la plus souvent utilisée en routine. Avec l'AutoAnalyseur, on peut mesurer 2 variantes de concentration : en « 2 temps » et « 1 temps » qui donnent une approche respectivement de la concentration réelle en anticorps, et de celle de la fraction en IgG1 de haute affinité. Sa reproductibilité est supérieure à celle des titrages, et a facilité l'établissement de seuils plus précis [34] [35] (Cf. Tableau 3). La sensibilité du dosage pondéral, malgré un coefficient de variation de 15-20%, permet de détecter les réactivations plus précocement (augmentation de plus de 30% de la concentration, [35]) que le titrage. Certains automates autorisent le traitement de grandes séries d'échantillons. Comme limites on notera que c'est une technique lourde, coûteuse et difficile à mettre en place (plus que 2 centres en France). Son utilisation est restreinte aux principaux anticorps du système Rh, les solutions d'anticorps de référence ne sont disponibles actuellement que pour l'anti-D et l'anti-c (Royaume-Uni).

	Risque fœtal présent dès :	18 SA	24 SA	28 SA	32 SA	36 SA	
Anti-D	Dosage pondéral	4 µg/ml	3 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,7µg/ml	Titre ≥ 16
Anti-K	Titre :	> 128	128	64	16	16	
Anti-c	Dosage pondéral	2000 UCHP/ml	1500 UCHP/ml	1000 UCHP/ml	700 UCHP/ml	500 UCHP/ml	Titre ≥ 4

Tableau 3. Taux critiques opérationnels appliqués pour le déclenchement d'un suivi spécifique fœtal (D'après A. Mailloux, CNRHP, hôpital Saint-Antoine 75012 Paris). SA : Semaines d'aménorrhée ; 1 µg/ml = 5 UI/ml = 250 UCHP/ml.

❖ Autres méthodes de dosage (non disponibles en France)

D'autres méthodes de dosage existent et s'appuient surtout sur la cytométrie en flux [36] et l'ELISA [37]. Leur précision est comparable au dosage pondéral. Elles sont peu utilisées en pratique courante en raison de leur complexité.

❖ Le microtitrage

C'est une technique de titrage adaptée sur carte gel IgG ou IgG+C3d qui permet de quantifier les anti-D de faible concentration par comparaison des résultats à ceux d'un étalon. Elle permet d'ajuster les prescriptions d'immunoprophylaxie par Ig anti-D, de surveiller la décroissance attendue des taux d'anti-D passif, et de s'assurer de l'absence d'apparition d'anti-D immun associé, par la comparaison du résultat obtenu à la valeur attendue suivant la date d'administration et la quantité reçue (abaque). Elle perd en précision lorsque la concentration dépasse 24 ng/ml.

Evaluation du pouvoir hémolytique des anticorps

❖ Les tests fonctionnels cellulaires

Ils renseignent sur l'impact clinique des anticorps, c'est-à-dire sur leur capacité à activer des cellules effectrices et à induire la lyse accélérée des hématies. Les 3 tests majeurs

sont : le test de cytotoxicité cellulaire dépendant de l'anticorps (ADCC pour *Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity*), le test de chimiluminescence (CTL pour *Chemiluminescence Test*) [37], et le test d'adhésion et de phagocytose par le monocyte (MMA pour *Monocyte Monolayer Assay*) [38]. Les tests ADCC et CTL ont été reconnus comme étant plus aptes à prédire la sévérité de la MHFN que le titrage des anticorps [37] [39]. En dépit de cela, leur utilisation dans le suivi des grossesses avec IFME est aujourd'hui anecdotique (ADCC en Hollande) du fait de l'avènement du dépistage non invasif de l'anémie fœtale dès les années 2000, les techniques étant lourdes et difficiles à valider (sensibilité des résultats à de nombreux facteurs). Le MMA moins spécifique, a depuis été abandonné dans cette indication.

Confirmation de la situation d'IFME

❖ Phénotypage ou génotypage érythrocytaire du géniteur

Il permet d'exclure le diagnostic d'incompatibilité lorsque le père ne possède pas l'antigène-cible correspondant à l'anticorps maternel. Si le père est homozygote dans un système antigénique di-allélique (exemple : C/c, K/k), la grossesse est incompatible. Dans les situations où le risque ne peut être écarté (hétérozygotie, phénotype D positif ou inconnu), le fœtus reste considéré comme « présumé incompatible » jusqu'à l'obtention des résultats du typage moléculaire fœtal, sauf cas échéant.

❖ Génotypage fœtal

Il est essentiellement réalisé aujourd'hui de façon non-invasive à partir du prélèvement maternel : c'est le génotypage fœtal sur sang maternel. Cette méthode tire son origine de la découverte par Lo et al en 1997 [40], de la présence de fragments d'ADN fœtal dans la circulation maternelle en quantités progressivement croissantes avec l'âge gestationnel. Il est disponible dès 12 SA pour les immunisations anti-D, et 13 SA pour les immunisations anti-c, -E, et -K. Lorsque la technique a fonctionné, l'absence de l'allèle-cible sur deux prélèvements distincts permet de lever la surveillance.

Dépistage de l'anémie fœtale

❖ Données échographiques

- Vélocimétries doppler de l'artère cérébrale moyenne. C'est aujourd'hui l'examen de 1^{ère} intention pour la recherche d'une anémie fœtale. La mesure du pic systolique de vélocité de l'artère cérébrale moyenne (PSV-ACM) permet le diagnostic non invasif, précis et précoce d'une anémie fœtale avant l'apparition des signes échographiques [41] entre 16 et 35 SA . Elle découle de l'observation par Mari et al en 1990 [42], de variations de pulsatilité dans différentes artères fœtales dont l'artère cérébrale moyenne après transfusion intravasculaire. En effet, la diminution du taux d'hémoglobine fœtale est corrélée à une accélération des vitesses dans l'ACM, car elle s'accompagne d'une baisse de la viscosité sanguine et d'une augmentation du débit cardiaque. Sous réserve de conditions techniques optimales, avec un opérateur entraîné [43], cet examen permet de limiter le recours aux gestes invasifs (ponction de sang fœtal en particulier), et de retarder l'indication de la 1^{ère} TIU. Dans les IFME, une à deux mesures hebdomadaires sont programmées lorsque les patientes atteignent des taux « critiques » d'anticorps. Physiologiquement, le taux d'Hb fœtale est en moyenne de 9g/dl à 20 SA, et atteint 16g/dl à terme. Une anémie fœtale ≤ 8 g/dl est suspectée pour des valeurs de PSV-ACM ≥ 1.55 MoM (*multiple de la médiane*).
- L'échographie morphologique. Les signes échographiques d'anémie fœtale sont généralement tardifs : hépatosplénomégalie, hydramnios, épanchement des séreuses, œdème sous-cutané, épaissement du placenta. Au stade d'anasarque, l'anémie fœtale est profonde et le pronostic vital déjà engagé. Toutefois, il n'est pas rare que des cas d'anémie fœtale soient découverts devant une anasarque lors des échographies obstétricales systématiques des 2^e et 3^e trimestres.

❖ Enregistrement du rythme cardiaque fœtal (ERCF)

Son apport est limité car, les anomalies du RCF sont d'apparition tardive : tracé sinusoïdal (*décrit comme pathognomonique*), diminution voire disparition des

mouvements actifs fœtaux. De plus, les tracés peuvent être normaux en situation d'anémie profonde (peu spécifique). Néanmoins, à partir de 32 SA, il sera systématiquement réalisé pour évaluer le bien-être fœtal.

b. En postnatal

Affirmer le diagnostic d'IFME

❖ Groupage sanguin du nouveau-né

Sa réalisation est indispensable et inclut la détermination du phénotype du nouveau-né pour le(s) système(s) impliqué(s) dans l'IFME.

❖ TDA (Test Direct à l'Antiglobuline ou Test de Coombs Direct)

Il sera systématiquement réalisé dans ce contexte. Il révèle une sensibilisation *in vivo* des hématies du nouveau-né. Sa positivité permet d'affirmer le diagnostic d'IFME. Il est de type « IgG ».

Le TDA positif sera complété d'une élution directe des anticorps. C'est un procédé permettant de détacher les anticorps IgG fixés sur les hématies dans le but de les identifier sur un panel d'hématies-test.

❖ Numération et formule sanguine du nouveau-né

L'anémie néonatale ($Hb \leq 14.5$ g/dl) est retrouvée dans 50% des cas d'incompatibilités [3]. Dans la MHFN, elle est le plus souvent régénérative avec 30 à 40% de réticulocytes.

❖ Dosage de la bilirubine plasmatique

Il est à initier le plus tôt possible pour orienter la prise en charge immédiate. L'ictère hémolytique est à bilirubine libre. Cette composante sera déduite des dosages de bilirubine totale (élevée) et conjuguée (faible le plus souvent). Uniquement disponibles au CNRHP, les dosages de la BNL (bilirubine non liée à l'albumine) et/ou de la BIE (Bilirubine Intra-Erythrocytaire, liée aux phospholipides membranaires) renseignent plus

finement sur le risque d'ictère nucléaire, et peuvent servir à moduler la prise charge. En cas d'ictère, le dosage de la bilirubine plasmatique doit être répété les 1ers jours de vie, et le profil évolutif du taux de bilirubine reporté sur un nomogramme avec l'âge de l'enfant en heures.

En résumé, la prise en charge d'une femme enceinte allo-immunisée pour les principaux anticorps anti-érythrocytaires exposant au risque d'anémie fœtale se fait selon le diagramme ci-dessous :

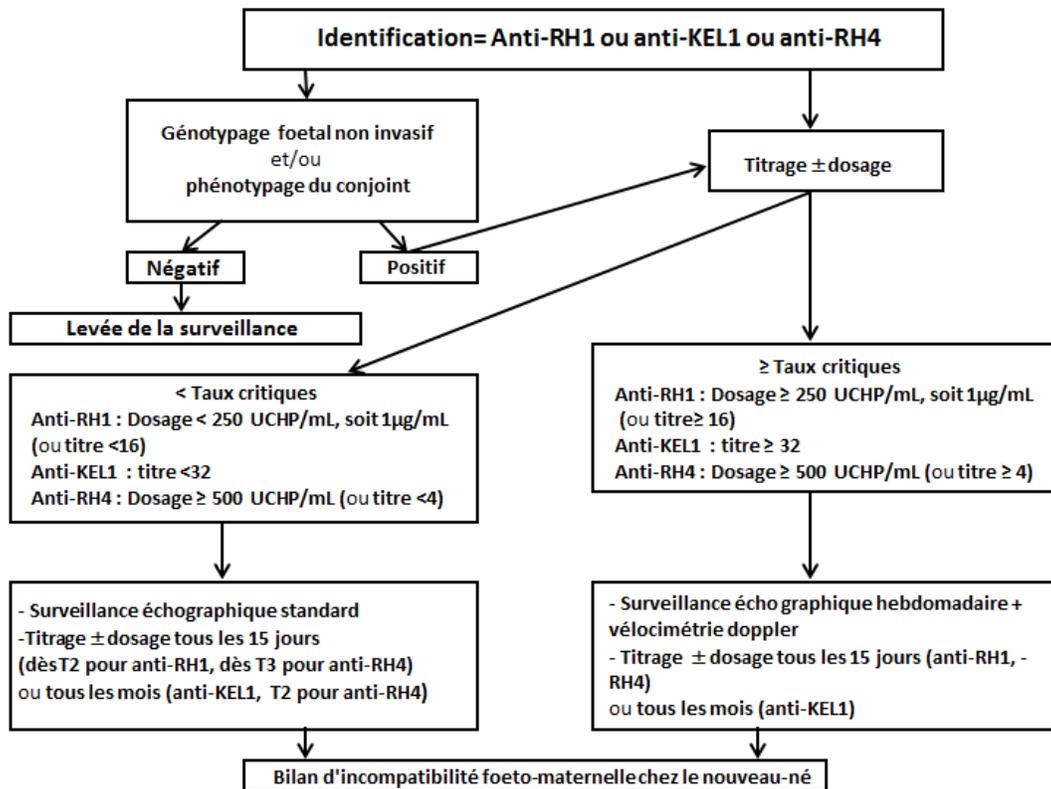


Figure 5. Prise en charge d'une femme enceinte allo-immunisée avec un anti-RH1 ou anti-KEL1 ou anti-RH4 (CNRHP, hôpital Saint-Antoine Paris).

2. Mesures thérapeutiques en situation d'IFME

a. Pendant la grossesse

Traitement de l'anémie : transfusions *in utero*

En cas d'anémie fœtale modérée à sévère, elles permettent de suppléer au défaut de l'érythropoïèse fœtale. Le geste est réalisé au bloc opératoire sous échographie. La transfusion fœtale intravasculaire est la technique de référence actuelle. Elle se fait par abord de la veine ombilicale entre 17-20SA et 32-34 SA [44]. Son principal avantage est de pouvoir réaliser des ponctions de sang fœtal à divers temps de la procédure, ce qui permet entre autres d'estimer précisément le volume de sang à transfuser, de phénotyper le fœtus et de définir le rythme des transfusions. Mais le geste est invasif, et expose à un certain nombre de complications : mauvaise tolérance fœtale, thrombose, etc... Le risque de complications estimé en moyenne à 2.7% par procédure à cumuler suivant le nombre total de TIU ; celui de perte fœtale est d'environ 0.7% par procédure.

La transfusion fœtale par voie intrapéritonéale est essentiellement dévolue aux transfusions à des termes très précoces (<20 SA).

Diminuer la sévérité de la MHFN : Ig IV, échanges plasmatiques thérapeutiques

Ce sont des traitements à instituer précocement (dès 11-12 SA) [45], et parfois combinés. Ils sont réservés aux patientes ayant des taux très élevés d'anticorps d'emblée, ou aux antécédents de MHFN sévère (ex : MFIU). Le principal objectif est de retarder la 1^{ère} TIU. Les immunoglobulines en intraveineux à fortes doses sont utilisées pour leurs effets immunomodulateurs. Les échanges plasmatiques permettent d'épurer mécaniquement les anticorps en séparant le plasma des autres composants sanguins, puis en le remplaçant par une solution colloïde (plasma et/ou albumine) ou une combinaison de solutions cristalloïde et colloïde [46].

L'extraction fœtale

Compte tenu de la majoration constante du processus hémolytique en fin de grossesse, il est préférable de déclencher l'accouchement dès 37 SA, même pour de faibles immunisations [3]. Dans les cas ayant nécessité le recours aux TIU, l'attitude est de préserver la grossesse jusqu'à ce terme (au minimum jusqu'à 34 SA), pour minorer les complications surajoutées liées à la prématurité.

b. En postnatal

Prise en charge de l'ictère hémolytique par IFME

❖ La photothérapie intensive

La photothérapie est le 1^{er} traitement à mettre en place sans délai. Elle consiste à dispenser à l'aide de dispositifs spécifiques, une énergie lumineuse dans le spectre bleu (430 nm à 490 nm) à la peau, absorbée par la bilirubine localisée dans les tissus cutané et sous-cutané, cette dernière étant transformée en photo-dérivés hydrosolubles (élimination urinaire et fécale). La photothérapie dite intensive préconisée dans les IFME, par opposition à la photothérapie conventionnelle est définie par l'utilisation de systèmes plus performants, permettant d'optimiser l'irradiance (intensité lumineuse délivrée à la peau) et la surface cutanée exposée.

❖ L'exsanguino-transfusion

Cet acte instauré dans les années 40 [47], est très peu réalisé de nos jours en raison de l'amélioration de la prise en charge anté- et postnatale de la MHFN. L'indication formelle reste l'hyperbilirubinémie néonatale sévère avec présence de signes neurologiques. L'exsanguino-transfusion correspond à l'échange de deux masses sanguines par du sang total reconstitué à partir de CGR de groupe O et de plasma frais congelé de groupe AB. Ses avantages sont : la correction rapide et simultanée de l'excès de bilirubine et de l'anémie, la clairance d'une partie des anticorps circulants.

❖ Autres traitements

L'utilisation des immunoglobulines ou de l'albumine par voie est réservée aux ictères sévères ne répondant pas suffisamment rapidement à la photothérapie intensive bien conduite.

Prise en charge de l'anémie néonatale

❖ Transfusion du nouveau-né

Les indications transfusionnelles sont celles données par l'HAS (Haute Autorité de Santé) et sont fonction de la tolérance clinique de l'enfant. Le seuil moyen est à 8 g/dl. L'anémie dans la MHNN est évolutive, la nécessité de transfuser peut apparaître après un délai de plusieurs jours voire semaines et justifie une surveillance du taux d'hémoglobine les 2-3 premiers mois de vie.

❖ Mesures supplémentaires

Clampage retardé du cordon, supplémentation en EPO, folates, fer, vitamine E.

Chapitre 3 : Problématique

Bien que les vélocimétries doppler de l'ACM aient révolutionné le dépistage de l'anémie fœtale, dans les IFME les outils biologiques sont indispensables pour apprécier cette potentialité en amont et guider la surveillance clinique des grossesses incompatibles, afin qu'elle soit adaptée au niveau de risque encouru. Le titrage des anticorps par la technique tube-cytocentrifugation (technique de référence) est l'examen historique et le plus utilisé pour évaluer les taux d'anticorps chez les femmes enceintes allo-immunisées. Cependant, son imprécision et sa faible reproductibilité complexifient l'application des seuils décisionnels préétablis. De ce fait, le dosage pondéral, plus sensible et plus spécifique, lui est associé pour les anticorps disponibles dans cette technique en France. En l'état actuel des données scientifiques, le titrage des anticorps n'est pas complètement substituable aujourd'hui dans le suivi des IFME.

Dans un premier temps, nous allons définir la place des techniques de titrage des anticorps anti-érythrocytaires dans la prise en charge des IFME au niveau national et international.

Dans un second temps, il s'agira de comparer les différentes méthodes de titrage disponibles (en tube et colonne-filtration) pour les principaux anticorps impliqués dans la MHFN (anti-D, anti-c, anti-K) ; puis d'étudier différents facteurs pouvant influencer sur les résultats de titrage en technique tube (*technique de référence*) pour l'anti-D

MATERIEL ET METHODE

Chapitre 1 : Prise en charge immuno-hématologique de la femme enceinte allo-immunisée

1. Enquête nationale

Une enquête a été menée sur le suivi immuno-hématologique de la femme enceinte en France à l'initiative du CNRHP, dans le cadre d'un projet plus vaste dirigé par un groupe de travail de la SFTS. Les laboratoires recevant des prélèvements de femmes enceintes pour des examens immuno-hématologiques ont été invités à remplir un questionnaire sur internet via le lien [<https://goo.gl/forms/fjnCdJyuOI0DBNxc2>], proposé dès janvier 2018. La diffusion s'est faite par plusieurs canaux : Collège National des Hôpitaux, adhérents de la SFTS, site internet du CNRHP, correspondants du CNHRP, réseaux de laboratoires privés.

QUESTIONNAIRE

ITEM 1 : recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI)

1.1 Réalisez-vous des RAI ? oui/non

Si non : envoi des prélèvements pour RAI

1.2 Si non : dans quel type de laboratoire envoyez- vous vos prélèvements ?

- ✓ Autre laboratoire du groupement
- ✓ Laboratoire centralisateur
- ✓ EFS local
- ✓ EFS laboratoire central de région
- ✓ Autre laboratoire EFS spécialisé

- ✓ Centre de référence
- ✓ Autres (précisez) :

Si oui : Réalisation des RAI

1.3 Quelle méthode utilisez-vous ?

- ✓ Manuelle
- ✓ Automatisée
- ✓ Gel / Cassette
- ✓ Plaque
- ✓ Immunocapture
- ✓ Tube
- ✓ Autres (précisez) :

1.4 Effectuez-vous des techniques de RAI utilisant des hématies tests traitées par des enzymes (papaine ou autre) de manière systématique quand un contexte de grossesse vous est annoncé ? oui/non

ITEM 2 : identification des anticorps anti-érythrocytaires (IAI)

2.1 Réalisez-vous des IAI ? oui/non

Si non : envoi des prélèvements pour IAI

2.2 Dans quel type de laboratoire envoyez-vous vos prélèvements ?

- ✓ Autre laboratoire du groupement
- ✓ Laboratoire centralisateur
- ✓ EFS local
- ✓ EFS laboratoire central de région

- ✓ Autre laboratoire EFS spécialisé
- ✓ Centre de référence
- ✓ Je n'envoie pas de prélèvements pour identification dans un autre laboratoire en cas de RAI positive.
- ✓ Autres (précisez) :

Si oui : Réalisation des IAI

2.3 Quelle méthode utilisez-vous ?

- ✓ Manuelle
- ✓ Automatisée
- ✓ Gel / Cassette
- ✓ Plaque
- ✓ Immunocapture
- ✓ Tube
- ✓ Autres (précisez) :

2.4 Effectuez-vous des techniques d'IAI utilisant des hématies tests traitées par des enzymes (papaine ou autre) de manière systématique quand un contexte de grossesse vous est annoncé ? Oui/Non

ITEM 3 : Titrage des anticorps anti-érythrocytaires

3.1 Quand vous identifiez un anticorps à risque obstétrical (anticorps du système RH, KEL, FY, JK, MNS et "anti-public"), réalisez-vous des techniques de titrage ?

Oui/Non

Si non : Envoi de prélèvements pour titrage

3.2 Dans quel type de laboratoire envoyez-vous vos prélèvements ?

- ✓ Autre laboratoire du groupement
- ✓ Laboratoire centralisateur
- ✓ EFS local
- ✓ EFS laboratoire central de région
- ✓ Autre laboratoire EFS spécialisé
- ✓ Centre de référence
- ✓ Je n'envoie pas de prélèvements pour titrage une fois l'anticorps identifié
- ✓ Autres (précisez) :

3.3 Si vous envoyez des prélèvements pour titrage, dans quels cas le faites-vous ?

- ✓ Systématiquement à chaque prélèvement reçu
- ✓ A la fréquence préconisée dans une procédure définie de votre laboratoire (document cadre EFS, protocole interne...)
- ✓ A la fréquence préconisée par le laboratoire spécialisé
- ✓ Autres (précisez) :

3.4 Préconisez-vous de manière systématique des conseils pour le suivi de la grossesse, en attendant les résultats de titrage

Oui/Non

3.5 Si oui, quels types de conseils donnez-vous ?

- ✓ Sur le risque ou non de développement d'une anémie fœtale sévère selon la spécificité de l'anticorps identifié
- ✓ Sur l'intérêt de phénotyper le procréateur et/ou de réaliser un génotypage fœtal
- ✓ Sur le risque ou non de développement d'une maladie hémolytique néonatale sévère selon la spécificité de l'anticorps identifié
- ✓ Sur le bilan d'incompatibilité à faire à la naissance
- ✓ Autres (précisez) :

Si oui : Réalisation des titrages

3.6 Quelle(s) technique(s) utilisez-vous ?

- ✓ Manuelle
- ✓ Automatisée
- ✓ Technique de référence en tube
- ✓ Autre technique tube
- ✓ Technique gel (anti-IgG / milieu basse force ionique)
- ✓ Autre technique gel
- ✓ Autres (précisez) :

3.7 Dans quel(s) cas réalisez-vous un titrage ?

- ✓ A chaque prélèvement reçu avec une demande de titrage d'un laboratoire extérieur
- ✓ Pour les prélèvements reçus avec une demande de titrage d'un laboratoire extérieur, uniquement si la demande respecte les critères de fréquence définie par une procédure de votre laboratoire
- ✓ Pour les prélèvements reçus avec une demande de titrage d'un laboratoire extérieur uniquement si la demande respecte les critères de fréquence recommandés par un laboratoire spécialisé
- ✓ Sur chaque prélèvement de femme enceinte que vous recevez directement au laboratoire, dès que vous identifiez vous-même un anticorps anti-érythrocytaire à risque obstétrical
- ✓ Sur les prélèvements de femme enceinte que vous recevez directement au laboratoire, s'ils sont accompagnés d'une prescription médicale avec demande de titrage
- ✓ Pour les prélèvements de femme enceinte pour lesquels vous avez fait l'identification, à la fréquence préconisée dans une procédure définie de votre laboratoire (document cadre EFS, protocole interne)
- ✓ Pour les prélèvements de femme enceinte pour lesquels vous avez fait l'identification, à la fréquence préconisée par un laboratoire spécialisé.

- ✓ Autres (précisez) :

3.8 Préconisez-vous des conseils pour le suivi de la grossesse en fonction des résultats ?

Oui/Non

3.9 Si oui, quels types de conseil(s) donnez-vous ?

- ✓ Sur le risque ou non du développement d'une anémie fœtale sévère en cas de grossesse incompatible
- ✓ Sur la nécessité ou non de suivi de la grossesse dans un centre obstétrical spécialisé (type CPDPN)
- ✓ Sur la fréquence des titrages à faire
- ✓ Pour les anti-D (RH1), anti-C (RH2), anti-E (RH3), anti-c (RH4), anti-e (RH5) et « anti-public » : sur la nécessité de réaliser un dosage pondéral
- ✓ Sur l'intérêt de phénotyper le procréateur et/ou de réaliser un génotypage fœtal
- ✓ Sur le risque ou non de maladie hémolytique néonatale sévère en cas de grossesse incompatible
- ✓ Sur la nécessité ou non d'un accouchement dans un environnement pédiatrique autorisant une réanimation transfusionnelle adaptée
- ✓ Sur le bilan d'incompatibilité à faire à la naissance
- ✓ Autres (précisez) :

3.10 Sur quels types de recommandations vous appuyez-vous pour donner ces conseils ?

- ✓ Sur les données de la littérature nationale
- ✓ Sur les données de la littérature internationale
- ✓ Sur des protocoles ou procédures établies en interne
- ✓ Sur votre expérience personnelle (étude interne)
- ✓ Autres (précisez) :

ITEM 4 : microtitrage anti-D

4.1 Quand vous identifiez un anti-D faible, réalisez-vous des techniques de microtitrage ?

Oui/Non

Si non : Envoi des prélèvements pour microtitrage

4.2 Dans quel type de laboratoire envoyez-vous vos prélèvements ?

- ✓ Autre laboratoire du groupement
- ✓ Laboratoire centralisateur
- ✓ EFS local
- ✓ EFS laboratoire central de région
- ✓ Autre laboratoire EFS spécialisé
- ✓ Centre de référence
- ✓ Je n'envoie pas de prélèvements pour microtitrage d'un anti-D de faible intensité
- ✓ Autres (précisez) :

4.3 Si vous envoyez des prélèvements pour microtitrage anti-D, dans quel(s) cas le faites-vous ?

- ✓ Systématiquement devant toute identification d'un anti-D faible chez une femme enceinte, qu'il y ait ou non notion d'injection de Rophylac
- ✓ En l'absence de notion d'injection de Rhophylac
- ✓ Si la réactivité de l'anti-D semble « forte » dans votre technique d'IAI par rapport à l'intensité attendue pour la date d'injection mentionnée
- ✓ En l'absence de RAI négative dans la semaine précédant l'injection de Rhophylac
- ✓ Autres (précisez) :

Si oui : Réalisation des microtitrages

4.4 Dans quel cas réalisez-vous des microtitrages anti-D ?

- ✓ Systématiquement devant toute identification d'un anti-D faible chez une femme enceinte, qu'il y ait ou non notion d'injection de Rophylac

- ✓ En l'absence de notion d'injection de Rhophylac
- ✓ Si la réactivité de l'anti-D semble « forte » dans votre technique d'IAI par rapport à l'intensité attendue pour la date d'injection mentionnée
- ✓ En l'absence de RAI négative dans la semaine précédant l'injection de Rhophylac
- ✓ Autres (précisez) :

4.5 Quelle conduite à tenir préconisez-vous en cas de microtitrage anti-D élevé (concentration en anticorps trouvée supérieure à la concentration attendue) ?

- ✓ De contrôler le microtitrage anti-D trois semaines plus tard
- ✓ D'effectuer ou de reprélever rapidement la patiente pour titrage
- ✓ D'effectuer ou de reprélever rapidement la patiente pour une autre technique de dosage
- ✓ Autres (précisez) :

ITEM 5 : Autre(s) technique(s) de dosage des anticorps

5.1 Quand vous identifiez un anticorps anti-D (RH1), anti-C (RH2), anti-E (RH3), anti-c (RH4), anti-e (RH5) ou un "anti-public", réalisez-vous une autre technique de dosage en plus du titrage ?

Oui/Non

Si Non, envoi des prélèvements pour autre technique de dosage

5.2 Dans quel type de laboratoire envoyez-vous vos prélèvements ?

- ✓ Autre laboratoire du groupement
- ✓ Laboratoire centralisateur
- ✓ EFS local
- ✓ EFS laboratoire central de région
- ✓ Autre laboratoire EFS spécialisé
- ✓ Centre de référence

- ✓ Je n'envoie pas de prélèvements pour effectuer un autre type de dosage
- ✓ Autres (précisez) :

5.3 Si vous envoyez des prélèvements pour une autre technique de dosage, de quel type de dosage s'agit-il ?

- ✓ Dosage pondéral par hémagglutination en flux continu méthode 2 temps (hématies bromélinées)
- ✓ Dosage pondéral par hémagglutination en flux continu méthode 1 temps (hématies natives / broméline introduite dans le circuit)
- ✓ Dosage par ELISA
- ✓ Dosage par cytométrie de flux
- ✓ Autres (précisez) :

5.4 Dans quel(s) cas envoyez-vous vos prélèvements pour réaliser cette autre technique de dosage ?

- ✓ Au 1^{er} prélèvement pour avoir un taux de base puis selon les recommandations du laboratoire réalisant les dosages
- ✓ Systématiquement à chaque prélèvement reçu
- ✓ En fonction de la spécificité de l'anticorps et du titrage, à la fréquence préconisée selon une procédure définie (document cadre EFS, protocole interne ...)
- ✓ Autres (précisez) :

Si oui : réalisation d'une autre technique de dosage

5.5 Quelle(s) techniques utilisez-vous pour le dosage des anticorps ?

- ✓ Dosage pondéral par hémagglutination en flux continu méthode 2 temps (hématies bromélinées)

- ✓ Dosage pondéral par hémagglutination en flux continu méthode 1 temps (hématies natives / broméline introduite dans le circuit)
- ✓ Dosage par ELISA
- ✓ Dosage par cytométrie de flux
- ✓ Autres (précisez) :

5.6 Quel(s) étalon(s) utilisez-vous ?

- ✓ Etalon international anti-D
- ✓ Etalon international anti-c
- ✓ Autre étalon
- ✓ Autres (précisez) :

5.7 Dans quel(s) cas réalisez-vous cette technique de dosage ?

- ✓ A chaque prélèvement reçu avec une demande d'un laboratoire extérieur
- ✓ Pour les prélèvements reçus avec une demande d'un laboratoire extérieur, uniquement si la demande respecte les critères de fréquence définis par une procédure de votre laboratoire
- ✓ Sur chaque prélèvement, dès que vous identifiez vous-même un anticorps anti-érythrocytaire à risque obstétrical
- ✓ Pour les prélèvements pour lesquels vous avez fait l'identification, à la fréquence préconisée dans une procédure définie de votre laboratoire (document cadre EFS, protocole interne)
- ✓ Autres (précisez) :

5.8 Préconisez-vous des conseils pour le suivi de la grossesse en fonction du résultat du dosage ?

Oui/Non

5.9 Si oui, quels types de conseil(s) donnez-vous ?

- ✓ Sur le risque ou non du développement d'une anémie fœtale sévère en cas de grossesse incompatible
- ✓ Sur la nécessité ou non de suivi de la grossesse dans un centre obstétrical spécialisé (type CPDPN)
- ✓ Sur la fréquence des dosages à faire
- ✓ Sur l'intérêt de phénotyper le procréateur et/ou de réaliser un génotypage fœtal
- ✓ Sur le risque ou non du développement d'une maladie hémolytique néonatale sévère en cas de grossesse incompatible
- ✓ Sur la nécessité ou non d'un accouchement dans un environnement pédiatrique autorisant une réanimation transfusionnelle adaptée
- ✓ Sur le bilan d'incompatibilité à faire à la naissance
- ✓ Autres (précisez) :

5.10 Sur quel(s) type(s) de recommandations vous appuyez-vous pour donner ces conseils ?

- ✓ Sur les données de la littérature nationale
- ✓ Sur les données de la littérature internationale
- ✓ Sur des protocoles ou des procédures établies en interne
- ✓ Sur votre expérience personnelle (étude interne)
- ✓ Autres (précisez) :

2. Enquête internationale

Un questionnaire en anglais sur le suivi immuno-hématologique pendant la grossesse a été rédigé et proposé aux participants au groupe de travail « *Immunohaematology* » de l'ISBT (International Society of Blood Transfusion) par le Dr Peyrard (directeur du Centre National des Groupes Sanguins, département de l'Institut National de la Transfusion Sanguine), président du groupe de travail. Les représentants de 16 pays ont reçu le document par messagerie 15 jours avant le 35^e congrès international de l'IBST qui s'est tenu du 02 au 06 juin 2018 à Toronto (Canada).

Immunohaematological follow-up in pregnancy

1. Are there any official recommendations in your country for immunohaematological follow-up in pregnancy? If so, please provide some details.
2. What is the precise definition of an antibody titer in your country?
3. In addition to the titer evaluation, do you also calculate the score value of the antibody? If so, do you include the results in the lab report?
4. Which technique(s) (tube, column-agglutination) do you primarily use for RBC antibody titration and why?
5. Do you use “heterozygous” or “homozygous” RBCs for antibody titration?
6. Do you use LISS for antibody titration?
7. In addition to titration, do you also measure the antibody concentration ($\mu\text{g/ml}$), by comparison to a standard with a known concentration? If so, with which technique?
8. Is there an antibody titer or concentration threshold for initiating a close clinical monitoring by measuring the fetal middle cerebral arterial peak systolic velocity (MCA-PSV)?

9. Do you use a specific approach for RBC antibody screening in pregnant women? (adding of specific reagent RBCs, systematic use of enzyme, etc.) or a standard procedure?
10. What are the antibodies considered the most toxic in obstetrics in your country? (please cite at least 3)
11. Is there an official monitoring schedule for RBC antibody screening?
12. Is this monitoring schedule different according to the existing alloantibody (ies)?
13. Do you systematically search for anti-G in case of an apparent anti-D + anti-C reactivity in the plasma/serum?
14. If not, why?

Chapitre 2 : Comparaison de différentes méthodes de titrage des anticorps anti-érythrocytaires

1. Echantillons et réactifs

Les échantillons de plasma/sérum ont été sélectionnés parmi les prélèvements de patientes allo-immunisées reçus au CNRHP ne contenant qu'un seul anticorps anti-érythrocytaire de préférence (\pm *anticorps supplémentaire intitrable*), de spécificité anti-D (-RH1), ou anti-c (-RH4), ou anti-K (-KEL1), ayant fait l'objet d'un titrage. Les anticorps avaient été identifiés au CNRHP ou par les laboratoires prescripteurs (EFS, BIOMNIS, CERBA etc.). Les titres trouvés au laboratoire en routine variaient de <2 à >256 . Les échantillons provenaient soit de la sérothèque du laboratoire (conservés environ 12 mois), soit d'un tri des prélèvements récemment validés conservés 1 mois (décantation et congélation à -20°C). En moyenne, 20 échantillons ont été testés pour chaque paramètre étudié.

Pour les anticorps du système RH (anti-D et anti-c), les hématies-tests utilisées étaient de phénotype D+C+E+c+e+ (RH:1,2,3,4,5); Pour l'anti-K, il s'agissait d'hématies-tests K+k+ (KEL:1,2) du panel CNRGS en cours de validité.

2. Technique de titrage en tube-cyto centrifugation (technique de référence)

❖ Principe

Le titrage en tube utilise la technique du TIA, et consiste en la mise en présence de dilutions géométriques croissantes de raison 2 d'un sérum/plasma contenant un anticorps, avec des suspensions d'hématies-tests complémentaires de cet anticorps en milieu salin.

❖ Etapes du titrage

Pour chaque série de titrages un témoin de titre connu (anti-D, titre 16-32) est inclus. Des dilutions de 100 µl de volume sont préparées dans des tubes en verre soit par un automate (TECAN) pour des titres allant de 2 à 256, soit en méthode manuelle (dilutions « en cascade » de raison 2) pour des titres allant de 2 à 2048. Après distribution de 50µl d'hématies-tests à 4% en NaCl 0.9%, les tubes sont mis à incuber dans une étuve à 37°C pendant 60 minutes. Ensuite, les tubes sont placés dans des laves-globules (Diamed®) pour une série de 3 lavages en eau physiologique, suivie d'une étape de décantation des tubes. On y ajoute 100 µl d'antiglobuline IgG (Diagast®) diluée au tiers en milieu salin. Les tubes sont mixés 15 secondes, puis centrifugés 20 secondes à 1200 tours/min (179 g). La lecture macroscopique des agglutinats se fait après re-homogénéisation douce du culot de centrifugation.

Le titre d'un anticorps est défini comme l'inverse de la dernière dilution où l'on note une hémagglutination macroscopiquement visible (Cf. figure 6). En technique tube, la lecture est en point final (dernière agglutination (+)).

Le score correspond à la somme des valeurs conventionnelles attribuées suivant l'aspect des agglutinats présents dans chaque tube. La cotation est initiée à la dilution au ½ au CNRHP, c'est-à-dire, pour un titre ≥ 2 .

Score 12 : 4+

Score 10 : 3+

Score 8 : 2+

Score 5 : 1+

Score 2 : (+)

Score 0 : Absence d'agglutinats

+1 : réactions « strong », « demi-croix » Ex : 2+^s score=9

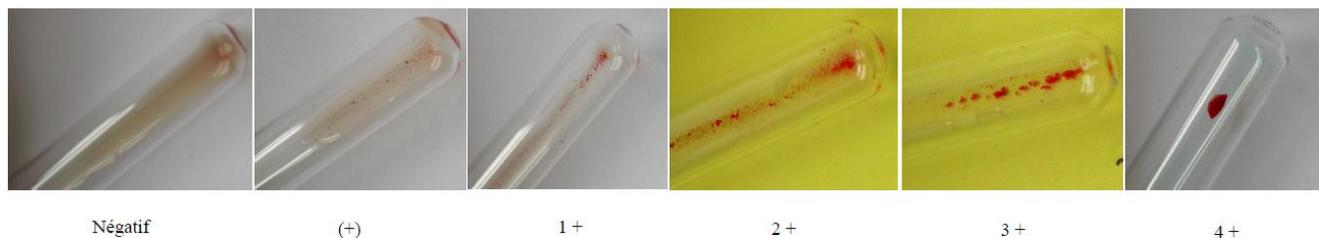


Figure 6. Gamme d'intensité d'agglutination en technique tube (D'après le CNRGS, INTS-Institut National de la Transfusion Sanguine Paris).

3. Technique de titrage en carte gel neutre (Biorad®)

Son protocole a été développé pour ce travail. Il est identique à celui de la technique en tube jusqu'à l'étape de lavage des hématies. Les culots obtenus après décantation sont remis en suspension dans un volume de 50 µl de NaCl, puis déposés dans les puits des cartes gel neutre. On y ajoute 25µl de solution d'antiglobuline IgG pure. Ensuite, les cartes gel sont directement mises à centrifuger pendant 10 minutes à 910 tours/min (ID Centrifuge, 24S DIAMED). La lecture des agglutinats et leur cotation se réfèrent à l'abaque correspondant aux supports en carte gel (Cf. figure 7). Le titre de l'anticorps pour ce type de support sera l'inverse de la dernière dilution pour laquelle l'hémagglutination est positive sans ambiguïté ($\geq 1+$). La définition du score reste inchangée.

Intensité	Lecture macroscopique							
	4+	3,5+	3+	2,5+	2+	1,5+	1+	(+)
Score	12	11	10	9	8	6	5	2
								

Figure 7. Gamme d'intensité d'agglutination en technique carte gel (D'après le CNRGS, INTS Paris).

4. Technique de titrage en carte gel IgG (Diamed®)

Hormis l'étape de dilution des échantillons, le procédé est celui du TIA en carte gel IgG ou LISS/Coombs (antiglobuline dans la phase gel). 50µl d'hématies-tests préparées à 0,8% en milieu Basse Force Ionique, équivalent du LISS (*Low Ionic Strength Solution*) (diluent 2) sont déposés dans chaque puits réactionnel du support carte gel, puis mis en contact avec 25 µl de dilution. Les cartes gel sont mises à incuber en étuve à 37°C pendant 15 minutes, puis à centrifuger 10 minutes à 910 tours/min avant lecture (spécifications indiquées au paragraphe précédent).

5. Etudes de répétabilité / reproductibilité des différentes techniques

Pour la validation des résultats, nous avons procédé à des essais de répétabilité pour les 3 techniques de titrage évaluées (tube, carte gel neutre, carte gel IgG) sur 2 séries d'environ 10 échantillons du témoin titrage anti-D (préparé, puis reparti en aliquotes pour une

utilisation sur plusieurs mois). Le titre attendu en technique tube est de 16 ou 32, soit 4 ou 5 dilutions pour une valeur en dosage pondéral d'environ 0.8 µg/ml. La reproductibilité du témoin titrage a été également calculée pour la technique tube.

Chapitre 3 : Etude de la robustesse de la technique de référence de titrage

Les modalités de sélection des échantillons et des hématies-test ont été mentionnées précédemment (paragraphe II.2). Pour caractériser la robustesse de la technique de titrage en tube, on a procédé à la modification unilatérale d'un facteur potentiellement impactant comparée à la technique utilisée au laboratoire, sur une série de 20 échantillons en moyenne de prélèvement contenant un anti-D.

Les facteurs évalués :

- ✓ Le phénotype des hématies-tests :
D+C+E+c+e+ (RH:1,2,3,4,5) vs D+C+E-c-e+ (RH:1,2,-3,-4,5)
D+C+E+c+e+ (RH : 1,2,3,4,5) vs D+C-E+c+e- (RH:1,-2,3,4,-5)
- ✓ Le nombre d'hématies-tests : 1 seule hématie-test vs un pool de 3 hématies-tests
- ✓ La concentration en hématies-tests : 4%² vs 2% et 6%
- ✓ Le mode de dilution : automatisée (TECAN) vs manuelle
- ✓ Le temps d'incubation : 60 min vs 45 min et 75min
- ✓ La concentration en antiglobuline IgG : diluée au 1/3 vs pure
- ✓ La durée de centrifugation des tubes avant lecture :
20 secondes vs 60 secondes
20 secondes vs 120 secondes
- ✓ La vitesse de centrifugation des tubes avant lecture :
179g/min (soit 1200 tours/min) vs 500g/min (soit 2000 tours/min),
179g/min (soit 1200 tours/min) vs 779g/min (soit 2500 tours/min)

² Au CNRHP, pour le titrage en tube, la concentration en hématies-tests est comprise entre 3 et 5% en milieu salin

- ✓ Le délai de lecture après la fin de la centrifugation : aucun vs après 5min et après 10 min

Nous analyserons également une étude de la variabilité inter-opérateur précédemment conduite au CNRHP. 20 échantillons ont été titrés le même jour par 5 techniciens différents en suivant le protocole de la technique en tube du laboratoire. L'ordre des échantillons était propre à chaque opérateur, et le titre des anticorps inconnu des opérateurs.

Chapitre 4 : Traitement des données

Les résultats obtenus ont été reportés sur fichiers Excel et traités à l'aide du logiciel GraphPad Prism®. Les titres <2 étaient remplacés par la valeur 1. Les titres supérieurs étaient remplacés par le nombre de dilutions positives +1 (titre $<2 \rightarrow 1$, titre 2 $\rightarrow 2$ etc.) pour ne considérer que les écarts réels de dilutions. Les données ont été analysées avec les tests appariés non paramétriques de Wilcoxon (2 groupes de valeurs) et de Friedman (3 groupes de valeurs). Le critère de significativité était $p < 0,05$. L'impact clinique était considéré comme étant significatif pour un écart de titres ≥ 2 dilutions (seuil utilisé en pratique courante pour définir une véritable augmentation de la concentration d'anticorps en technique tube).

RESULTATS

Chapitre 1 : Surveillance immuno-hématologique de la femme enceinte allo-immunisée

1. Résultats de l'enquête nationale

Le questionnaire a été diffusé du 25/01 à la mi-février 2018. Au total 147/ 850 laboratoires en France (estimation du Cofrac) ont participé à l'enquête. Ils se répartissaient de la manière suivante : 71 laboratoires privés (48%), 47 laboratoires à la hospitaliers (32%), 29 laboratoires EFS (20%). La distribution recouvre la quasi-totalité du territoire mais, on soulignera qu'on ne compte aucun laboratoire privé des DOM-TOM, aucun laboratoire hospitalier des régions de Normandie et Centre Val de Loire, aucun laboratoire EFS de Bretagne et Pays de la Loire de représenté. Les résultats fournis par les participants à l'enquête sont les suivants :

➤ ITEM 1 : la RAI

- Pratique de la RAI. Sur les 147 laboratoires ayant répondu au questionnaire, 90 % traitent les RAI (Cf. figure 8).

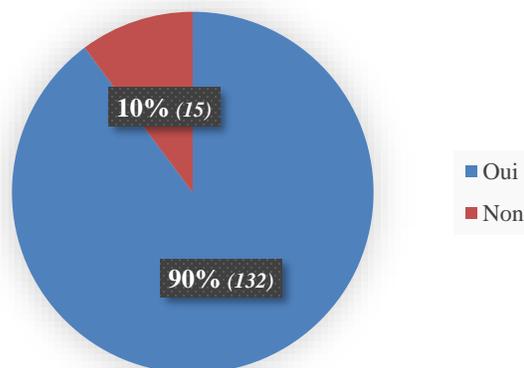


Figure 8. Répartition des laboratoires réalisant la RAI (147 réponses).

- Externalisation des RAI. Les 10% qui ne font pas de RAI adressent les prélèvements soit à un autre laboratoire du groupement pour 2/3 d'entre eux, soit à l'EFS (*Etablissement Français du Sang*) local pour 1/3 (Cf. figure 9).

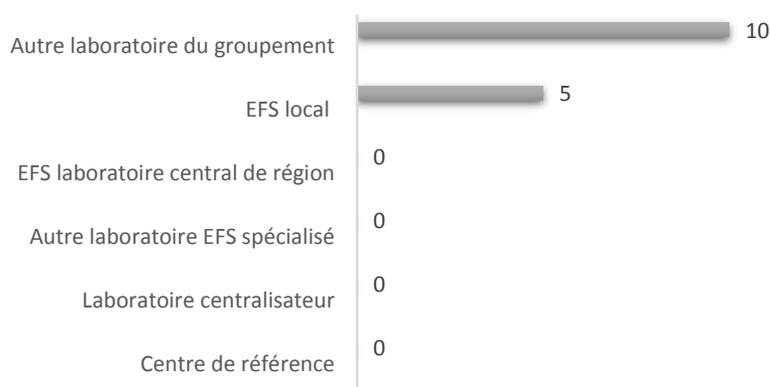


Figure 9. Destination des prélèvements pour les laboratoires ne réalisant pas de RAI (15 réponses).

- Technique de la RAI. La réalisation de la RAI est très largement automatisée : c'est le cas pour 99% des laboratoires ayant répondu. Dans ce groupe, 23% ont également recours à la technique manuelle. Parmi les différents supports d'hémagglutination disponibles, on retrouve en tête la carte gel/cassette utilisée par 89% des laboratoires, puis la plaque utilisée par 15% d'entre eux (Cf. figure 10).

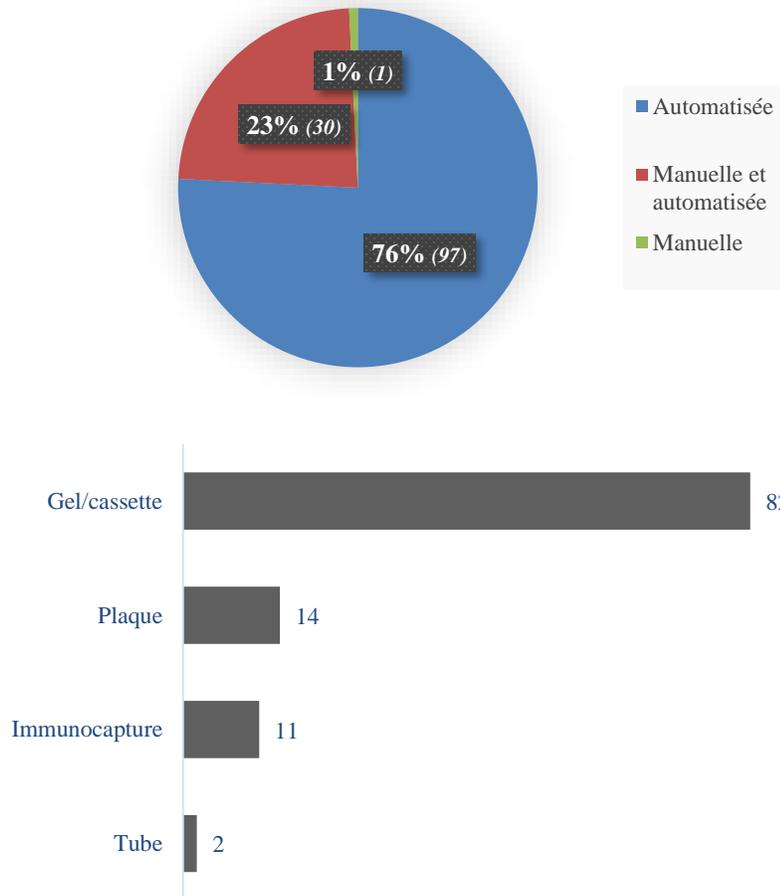


Figure 10. Les différentes techniques utilisées pour la RAI : mode de réalisation de la RAI (128 réponses/132), supports utilisés pour la RAI (92 réponses/132).

- RAI et grossesse. En contexte obstétrical, 9% des laboratoires qui font la RAI utilisent des hématis-tests traités par enzymes protéolytiques pour sensibiliser la technique (Cf. figure 11).

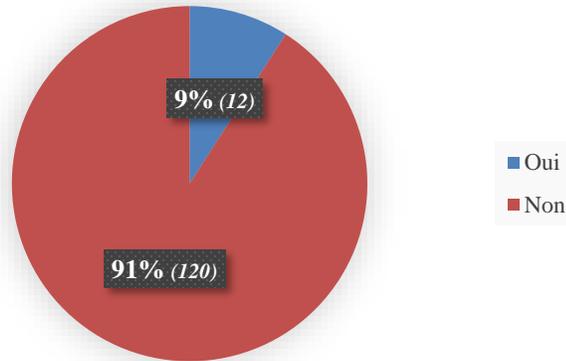


Figure 11. Sensibilisation de la RAI (enzymes) et contexte obstétrical (132 réponses).

➤ **ITEM 2 : l'IAI**

- Pratique de l'IAI. En cas de dépistage positif, l'identification de la spécificité de l'anticorps est effectuée par 43% des laboratoires qui réalisent les RAI (Cf. figure 12), soit 39% de l'ensemble des laboratoires participants.

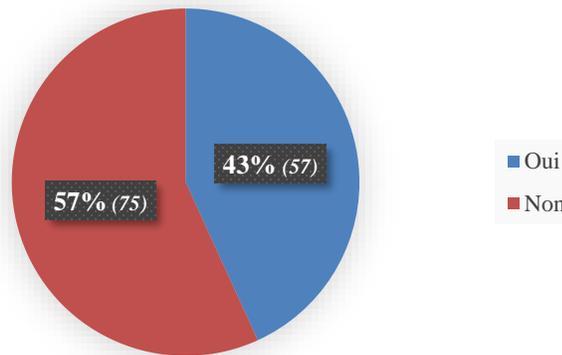


Figure 12. Répartition des laboratoires réalisant l'IAI (132 réponses).

- Externalisation des IAI. 57% des laboratoires qui font la RAI vont externaliser les RAI positives pour l'identification. De l'analyse des réponses recueillies, il ressort que 73% sont susceptibles d'adresser leurs prélèvements à un EFS : l'EFS local

est plébiscité par 62% des laboratoires ; 29% des laboratoires à un laboratoire centralisateur (Cf. figure 13).

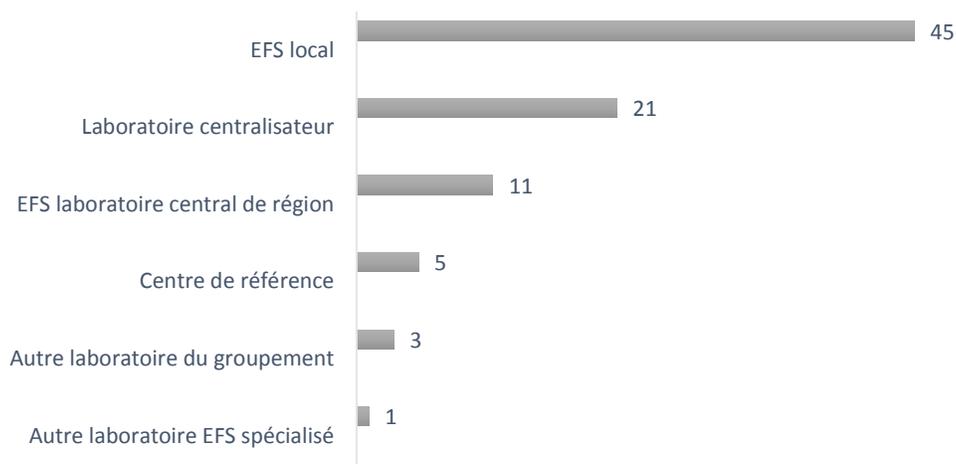


Figure 13. Destination des prélèvements pour les laboratoires ne réalisant pas d'IAI (73 réponses/75).

- Technique de l'IAI. 52% des laboratoires qui ont répondu allient les techniques manuelle et automatisée. On peut souligner que 27% ne travaillent qu'en technique manuelle. La carte gel/cassette est le principal support d'hémagglutination : elle est utilisée par 98% des laboratoires qui se sont prononcés (Cf. figure 14).

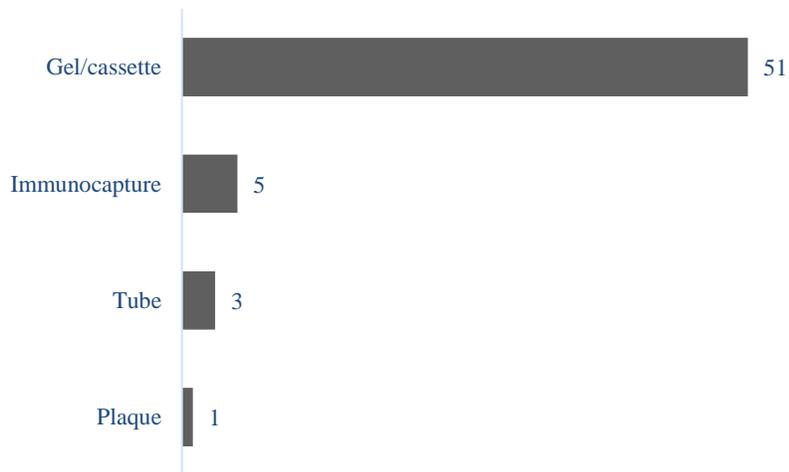
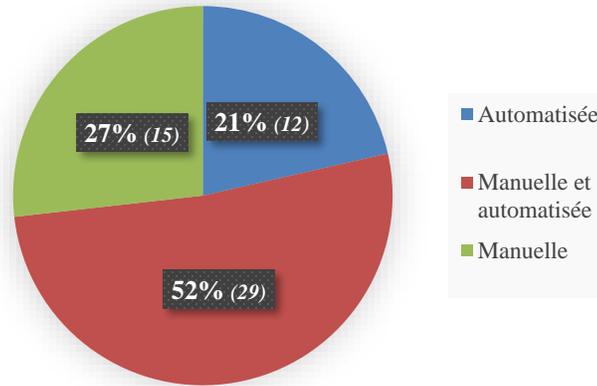


Figure 14. Les différentes techniques utilisées pour l'IAI : mode de réalisation de l'IAI (56 réponses/57), supports utilisés pour l'IAI (52 réponses/57).

- IAI et grossesse. En contexte obstétrical, 39% des laboratoires qui font l'IAI utilisent des hématies-tests traitées avec des enzymes protéolytiques (Cf. figure 15).

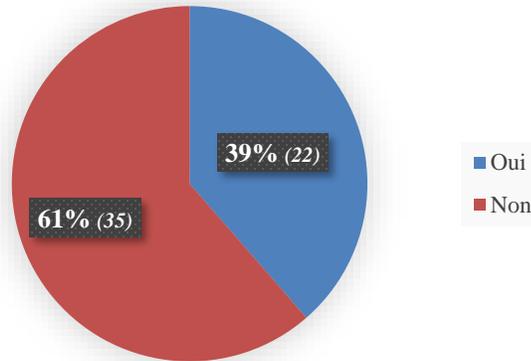


Figure 15. Sensibilisation de l'IAI (enzymes) et contexte obstétrical (57 réponses).

➤ **ITEM 3 : le titrage des anticorps anti-érythrocytaires chez la femme enceinte**

- Pratique du titrage. Parmi les laboratoires réalisant des IAI, 51% vont titrer les anticorps anti-érythrocytaires de la femme enceinte (Cf. figure 16), soit 20% de l'ensemble des laboratoires participants.

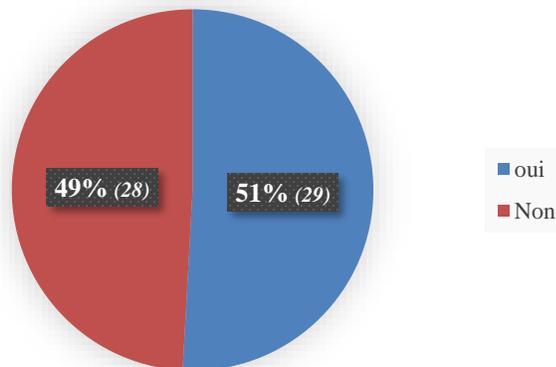


Figure 16. Répartition des laboratoires effectuant l'IAI pour le titrage des anticorps à risque obstétrical chez la femme enceinte (57 réponses).

-Externalisation du titrage. Les laboratoires qui font les IAI mais pas de titrages d'anticorps dirigent préférentiellement les prélèvements vers un centre de référence (68%). 69% des réponses indiquent que le rythme des titrages se calque sur celui conseillé par le laboratoire spécialisé (Cf. figure 17).

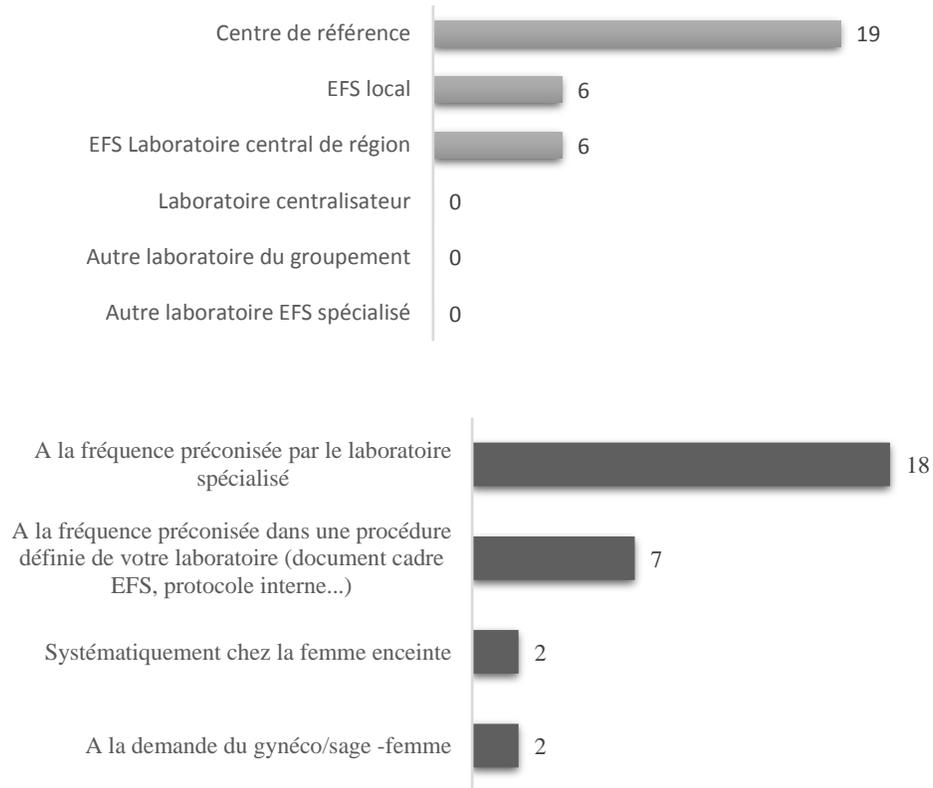


Figure 17. Destination et fréquence d'envoi des titrages pour les laboratoires effectuant les IAI sans titrage (*respectivement, 28 réponses et 26 réponses/28*).

- Technique de titrage. Le titrage des anticorps est manuel pour 100 % des laboratoires ayant répondu. La technique de référence en tube est majoritairement représentée, elle est employée par 90% des laboratoires. 10% utilisent la technique en carte gel (Cf. figure 18).

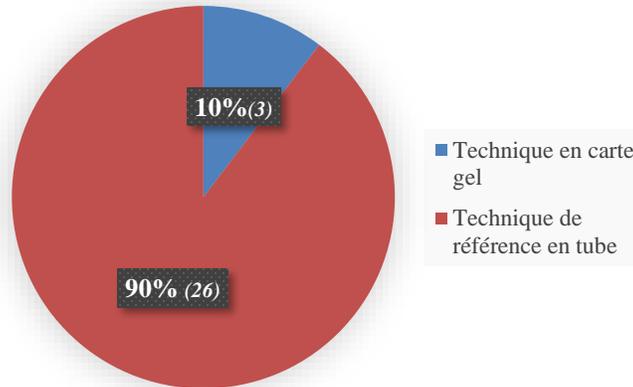


Figure 18. Les différentes techniques utilisées pour le titrage (29 réponses).

-Interprétation des titrages et commentaires. Suivant les résultats du titrage, différents conseils peuvent être précisés sur le compte-rendu d'analyse. Plus des trois-quarts des laboratoires concernés vont évoquer : la fréquence des titrages à réaliser, la nécessité d'effectuer un dosage pondéral, les risques d'anémie fœtale sévère ou de MHNN, ou encore l'intérêt de déterminer le phénotype paternel ou de réaliser un génotype fœtal. En revanche, à peine la moitié mentionne le bilan d'incompatibilité à faire la naissance, et le lieu conseillé de prise en charge de la patiente ou de son nouveau-né (Cf. figure 19).

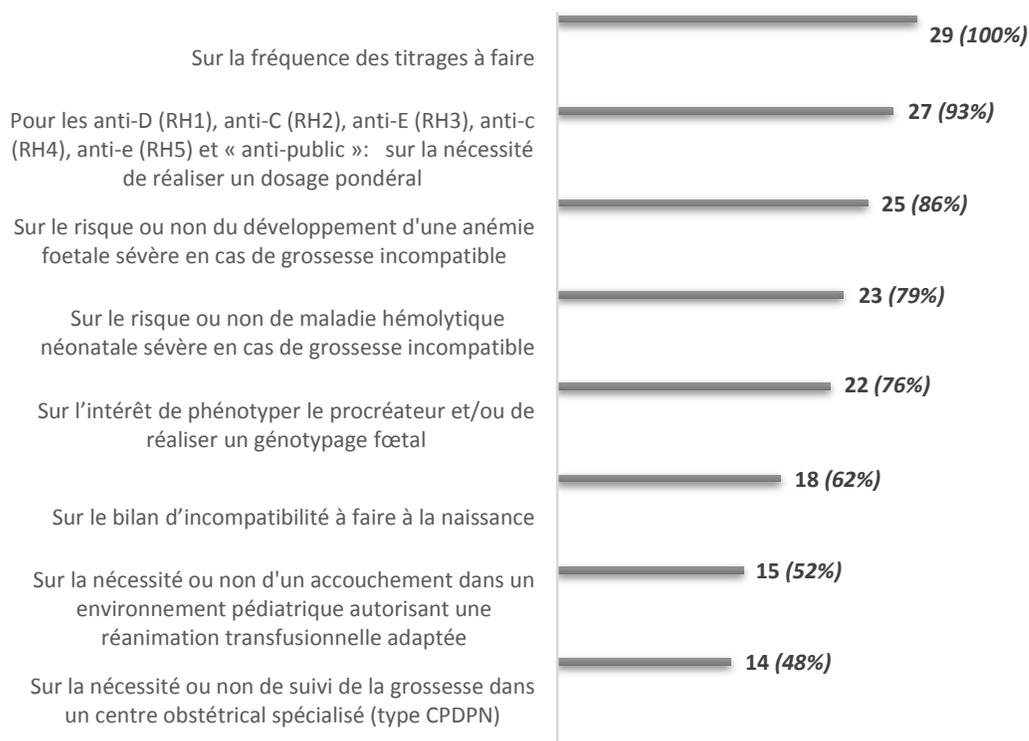


Figure 19. Les conseils mentionnés sur un compte-rendu de titrage (29 réponses).

➤ **ITEM 4 : le microtitrage des anti-D faibles**

- **Pratique du microtitrage.** Parmi les laboratoires effectuant le titrage, 41% font également le microtitrage d'un anti-D de faible intensité (Cf. figure 20), soit 8% de l'ensemble des laboratoires participants.

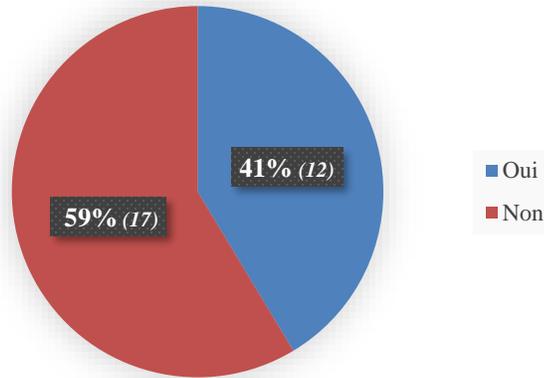


Figure 20. Répartition des laboratoires effectuant le microtitrage en plus du titrage des anticorps (29 réponses).

-Externalisation des microtitrages. D'après les réponses obtenues, 45% des laboratoires pourront les destiner à un centre de référence. Mais, on remarque que 27% des laboratoires n'adressent jamais les prélèvements pour microtitrage (Cf. figure 21). Les 2 motifs qui se détachent pour justifier l'envoi d'un prélèvement pour microtitrage d'anti-D sont l'absence de notion d'injection de Rhophylac® et « une forte réactivité » de l'anti-D par rapport à l'intensité attendue sur la base de la date d'injection de Rhophylac® : 60% des laboratoires concernés ayant répondu les ont mentionnés. 10% des laboratoires l'enverront systématiquement (Cf. figure 21).

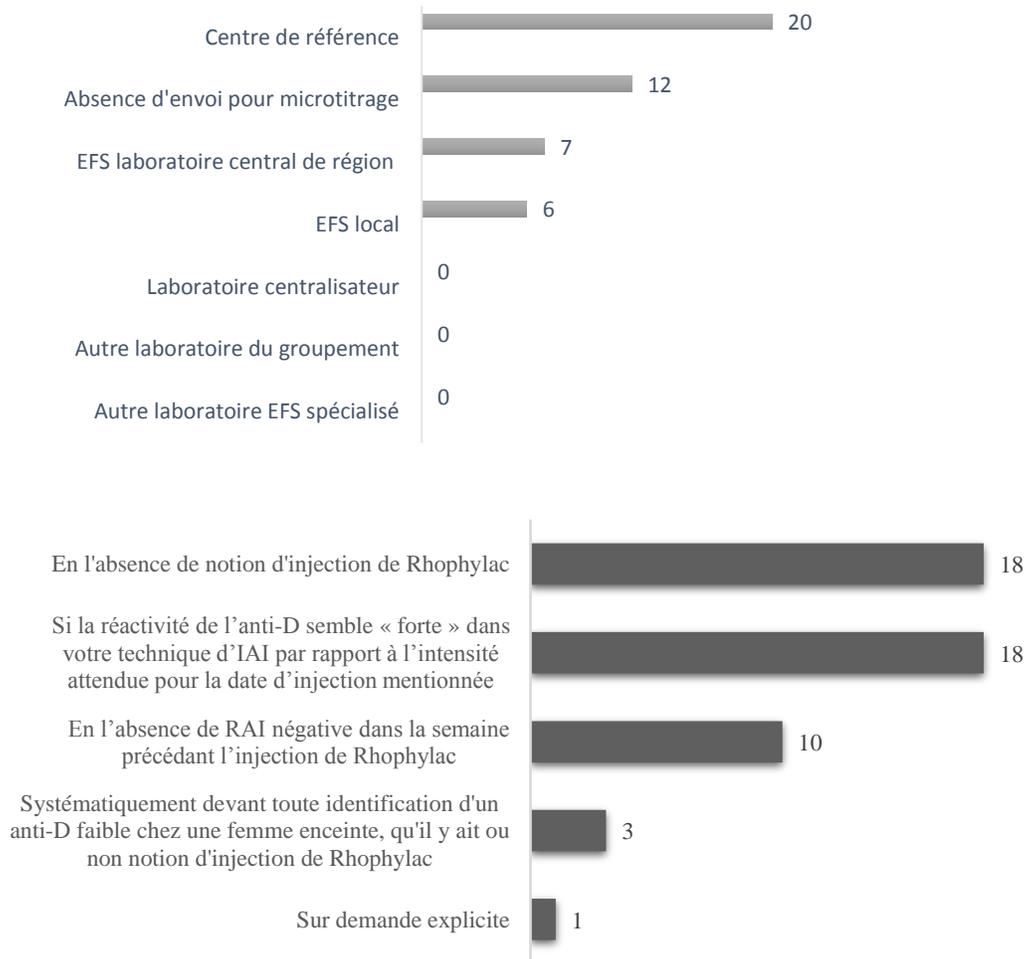


Figure 21. Destination et motifs d'envoi des prélèvements pour microtitrage (*respectivement, 44 réponses et 30 réponses /32*).

➤ **ITEM 5 : le dosage pondéral**

- **Externalisation du dosage pondéral.** Près de 75% des laboratoires ayant répondu envoient leur prélèvement à un centre de référence dont fait partie le CNRHP. Près de 33% les adressent également ou uniquement à un EFS A préciser que les deux centres de dosage pondéral en France sont le CNRHP situé à Paris et l'EFS de Lille (EFS laboratoire central de la région Nord de France). Le rythme d'envoi des prélèvements pour dosage pondéral est celui défini par une procédure interne dans 51% des cas. Pour 32% des laboratoires, le 1^{er} prélèvement

est envoyé pour avoir un taux de base, puis c'est la fréquence préconisée par le laboratoire spécialisé qui est appliquée (Cf. figure 22).

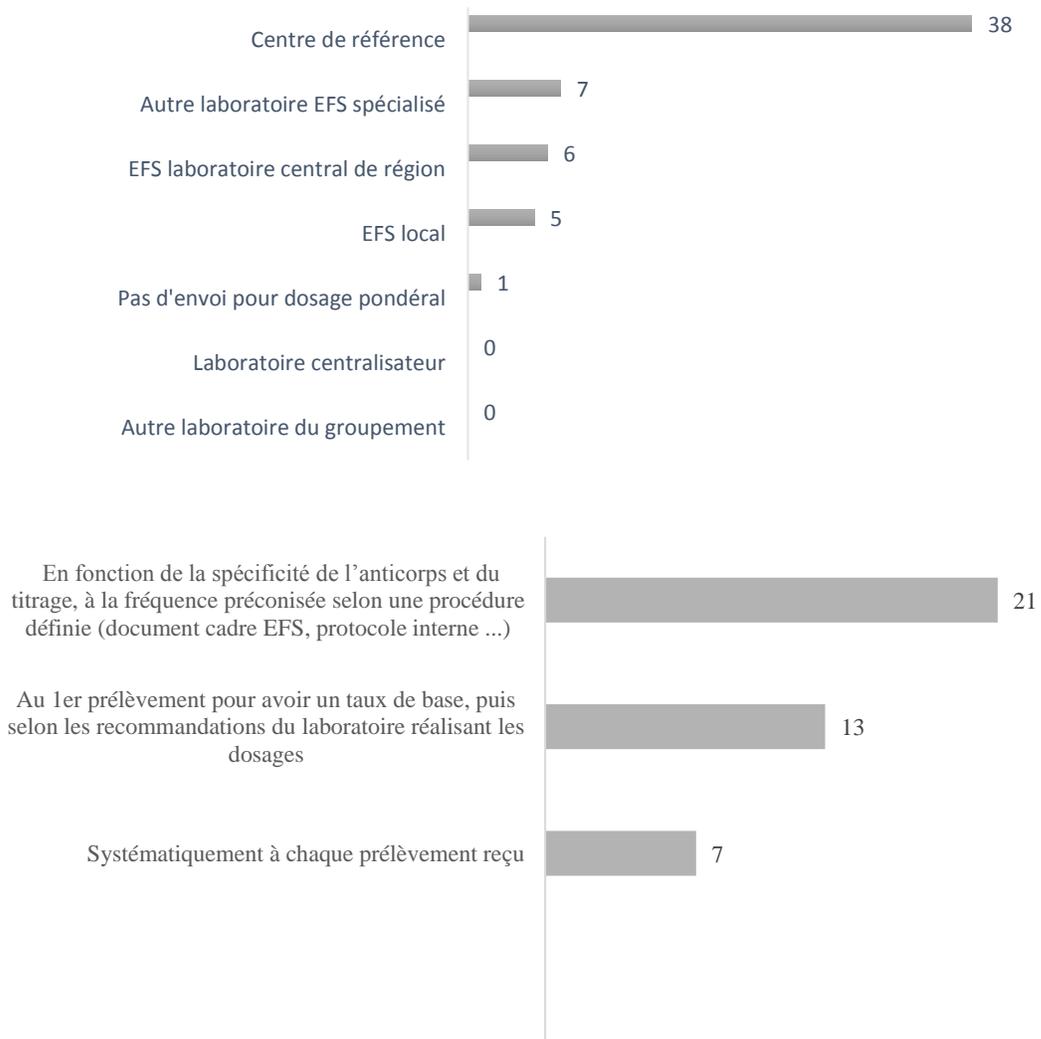


Figure 22. Destination et rythme d'envoi des prélèvements pour dosage pondéral (respectivement, 51 réponses et 41 réponses).

2. Résultats de l'enquête internationale

Le questionnaire sur le suivi immuno-hématologique de la femme enceinte fourni au groupe de travail « *Immunohaematology* » de l'ISBT qui s'est réuni à Toronto au Canada le 2 juin 2018 a été rempli par les représentants de 13 pays et assimilés comme tels³: France, Royaume-Uni, Espagne, Italie, Allemagne, Etats-Unis, Nouvelle-Zélande, Finlande, Iran, Inde, Taïwan, Hong-Kong et Chine. Quelques données ont été reportées dans les tableaux 4 à 8.

❖ Considérations générales

Taïwan est le seul pays ne disposant pas de recommandations pour le suivi immuno-hématologique de femme enceinte (1/13). Parmi les anticorps exposant au risque d'anémie fœtale, on retrouve principalement : l'anti-c (13/13), l'anti-D (12/13), et l'anti-K (8/13). Taïwan est le seul pays pour lequel l'immunisation anti-D n'est pas citée. L'anti-K n'est pas évoqué par les pays d'Asie du groupe (Iran, Taïwan, Chine, Hong-Kong), excepté l'Inde. Le titrage des anticorps anti-érythrocytaires est le premier examen de quantification, il est pratiqué par tous (13/13). Quelques-uns y adjoignent d'autres méthodes telles que : le dosage pondéral réalisé en France et au Royaume-Uni (2/13), et la cytométrie en flux pour la Finlande et la Chine (2/13). Des valeurs seuils pour déclencher le suivi par vélocimétrie-doppler de l'ACM fœtale sont définies pour la majorité des pays (11 /13), excepté l'Allemagne et Taïwan (Cf. tableau 4).

³ Hong-Kong et Taiwan font en réalité partie de la république populaire de Chine, Hong-Kong en tant que région administrative spéciale ; le statut de Taïwan est plus soumis à controverse.

Pays	Recommandations pour le suivi immuno-hématologique des femmes enceintes	Anticorps toxiques pendant la grossesse	Examens de quantification	Seuils pour PSV-ACM
France	Oui (HAS, JORF, CNOG)	Anti-D /anti-K/anti-c/anti-E	Titration + dosage pondéral (anti-D, -c, -E)	Oui
Royaume-Uni	Oui (BSH et RCOG)	Anti-D/anti-K/anti-c	Titration + dosage pondéral (anti-D, -c)	Oui
Espagne	Oui (consensus : SETS et SEGO)	Anti-D/anti-c/anti-K	Titration	Oui
Italie	Oui (SIMTI et SIGO)	Anti-D/anti-K/anti-c/Anti-E	Titration	Oui
Allemagne	Oui	Anti-D/anti-c/anti-K/anti-E	Titration	Non
Etats-Unis	Oui (AABB et ACOG)	Anti-D/ anti-c/anti-PP1P ^k (rare)	Titration	Oui
Nouvelle-Zélande	Oui (ANZSBT)	Anti-D/anti-K/anti-c	Titration	Oui
Finlande	Oui	Anti-D/anti-c/anti-K	Titration + cytométrie de flux (anti-D)	Oui
Iran	Oui	Anti-D/ anti-c /anti-p/anti-RH17	Titration	Oui
Inde	Oui	Anti-D/anti-K/anti-E/anti-c	Titration	Oui
Taiwan	Non	anti-E/anti-c/ anti-Mi ^a	Titration	Non
Hong-Kong	Oui (BSH, ANZSBT et AABB)	Anti-D/anti-c/anti-E	Titration	Oui
Chine	Oui (consensus d'experts l'année précédente)	Anti-D/anti-E/anti-c	Titration + cytométrie de flux (anti-D)	Oui

AABB: American Association of Blood Banks
Gynecologists
Blood Transfusion

BSH: British Society of Haematology

SETS: Spanish society of blood transfusion

SIMTI : Società Italiana di Medicina Transfusionale e Immunoematologia

ACOG: American College of Obstetricians and

ANZSBT: Australian and New Zealand Society of

SEGO: Spanish society of blood gynecology

SIGO: Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia

Tableau 4. Quelques données générales sur le suivi immuno-hématologique de la femme enceinte dans 13 pays.

❖ Le titrage des anticorps

Au sujet du titrage des anticorps, la technique en tube (*référence*) est majoritaire (11/13). La technique avec support de type colonne-filtration (carte gel ou microbilles) est conjointement retrouvée dans 5 pays, et 2 pays l'ont adopté comme principale méthode (Allemagne et Royaume-Uni). La lecture du titre se fait essentiellement en point final (+) (8/9, 4 *données manquantes*). Le calcul du score est peu répandu (2/13) : seuls la France et les Etats-Unis en font mention dans les comptes rendus. En Chine le score est calculé, mais n'est pas associé au résultat final. Dans la plupart des cas, les hématies-test utilisées sont hétérozygotes pour l'antigène-cible (9/12, *une donnée manquante*), en suspension dans un milieu non LISS (10/13) (Cf. tableau 5).

Pays	Titre		Score	Hématies-test	Milieu LISS
	Tube vs gel	Positivité 1+ vs (+)	Oui vs Non	Homozygotes vs hétérozygotes	Oui vs Non
France	Tube	(+)	Oui	Hétérozygotes sauf anti-D	Non
Royaume-Uni	Gel	1+	Non	Hétérozygotes	Oui
Espagne	Tube et gel	(+)	Non	Hétérozygotes sauf anti-D	Non (1)
Italie	Tube	NR	Non	Hétérozygotes	Non
Allemagne	Gel	NR	Non	Homozygotes	Non
Etats-Unis	Tube et gel	(+)	Oui	Hétérozygotes	Non
Nouvelle-Zélande	Tube	(+)	Non	Hétérozygotes	Oui
Finlande	Tube	(+)	Non	Hétérozygotes	Non
Iran	Tube et gel	(+)	Non	Homozygotes	Non
Inde	Tube et gel	1+ et (+)	Non	Homozygotes	Oui (<i>gel uniquement</i>)
Taiwan	Tube	NR	Non	NR	Non
Hong-Kong	Tube	(+)	Non	Hétérozygotes	Non
Chine	Tube et gel	NR	Non (2)	Hétérozygotes	Non

Tableau 5. Techniques de titrage utilisées dans 13 pays.

NR : Non renseigné

(1) : Hématies-test conservées dans leur milieu de conservation

(2) : Scores déterminés dans certains cas, mais non reportés sur le compte-rendu

❖ Les valeurs critiques établies pour instaurer la surveillance clinique

Les valeurs seuils de déclenchement d'un suivi échographique par vélocimétrie Doppler de l'ACM sont définies suivant la méthode de quantification et la spécificité de l'anticorps. On notera qu'en Allemagne, il n'existe pas de seuil critique défini pour les anticorps à risque d'anémie fœtale, l'appréciation est laissée au centre médical de soins. En Espagne, le titre seuil valable pour l'ensemble des anticorps est de 128 (1/12).

Pour l'anti-D (12/13), les titres seuils prédominants rapportés sont 16 (6/11, *1 donnée manquante*) et 32 (4/11), avec utilisation des 2 aux Etats-Unis et en Iran. En France et au Royaume-Uni, le dosage pondéral est l'examen décisif pour déclencher une surveillance clinique en cas d'anti-D : les seuils sont respectivement de 5 UI/ml (1µg/ml), et de 4 UI/ml (0.8µg/ml).

Pour l'anti-K (8 /13), les titres seuils les plus mentionnés sont : 8 (3 /8), 16 (2 /8) et 32 (2 pays/8). A Hong-Kong les titres 8 (*AABB*) et 32 (*BSCCH*) sont appliqués, suivant le référentiel des laboratoires. Cependant, pour 3 pays (Royaume-Uni, Espagne et Nouvelle-Zélande), le suivi clinique est mis en place d'emblée, aucun titre n'ayant été jugé suffisamment fiable pour prédire la survenue d'une anémie fœtale.

Pour l'anti-c (13/13), les titres seuils les plus fréquents, appliqués pour les anticorps autres qu'anti-D et anti-K (excepté pour la France) sont : 32 (4/10, *3 données manquantes*) et 16 (3/10). En Iran, dans les faits, deux seuils sont disponibles pour les immunisations érythrocytaires en général, 16 et 32. En France et au Royaume-Uni, le dosage pondéral est l'examen décisif pour mettre en place une surveillance clinique en cas d'anti-c : le seuil est à 500 UCHP/ml en France, soit un équivalent à partir d'un étalon anti-c de 7.5 UI/ml, comme au Royaume-Uni (Cf. tableaux 6 & 7).

Pays	Titres critiques (PSV-ACM)		
	Anti-D	Anti-K	Anti-c
France	32 (1)	32	4 (1)
Royaume-Uni	Aucun <i>(dosage pondéral)</i>	Aucun <i>(suivi systématique)</i>	Aucun <i>(dosage pondéral)</i>
Espagne	128	Aucun <i>(suivi systématique)</i>	128
Italie	32	8	32
Allemagne	Aucun <i>(suivi dépendant du centre de soins)</i>		
Etats-Unis	16-32	8	NR
Nouvelle-Zélande	16	Aucun <i>(suivi systématique)</i>	32
Finlande	16 <i>(dans la plupart des cas)</i>		
Iran	16-32		16-32
Inde	16		
Taiwan			NR
Hong-Kong	16	8/32	32
Chine	NR		NR

Pays	Seuils critiques de dosage pondéral (PSV-ACM)	
	Anti-D	Anti-c
France	5 UI/ml	500 UCHP/ml (1)
Royaume-Uni	4 UI/ml	7,5 UI/ml

1 µg/ml=5 UI/ml=250 UCHP/ml

(1) Au CNRHP : seuil de 500 UCHP/ml avec solution anti-D étalon, mais avec solution étalon anti-c correspond à 7.5 UI/ml

(1) En l'absence de résultat de dosage pondéral disponible

Tableau 6 (Gauche). Tableau 7 (Droit). Seuils critiques (titrage et dosage pondéral) pour la mise en œuvre d'une surveillance clinique par vélocimétries doppler de l'ACM dans 13 pays.

Chapitre 2 : Comparaison des méthodes de titrage tube-cyto-centrifugation vs carte gel neutre (Biorad®) vs carte gel IgG (Diamed®)

1. Comparaison de méthodes de titrage : anti-D (RH1)

La comparaison de différentes méthodes de titrage sur une série de 20 échantillons de plasma/sérum contenant un anti-D a donné les résultats suivants. Les titres étaient significativement différents entre les 3 techniques ($p < 0.0001$). Les titres obtenus en carte gel neutre étaient très modérément supérieurs aux titres en tube, en moyenne + 0.3 dilutions ($p = 0.02$), donc sans impact clinique significatif. Les titres obtenus en carte gel IgG étaient constamment supérieurs aux titres en technique tube, avec en moyenne +2.8 dilutions ($p < 0.0001$), ce qui est cliniquement significatif (Cf. tableau 8, figure 23). Les scores de titrage étaient différents entre les 3 techniques ($p < 0.0001$). Les scores du titrage en tube étaient inférieurs à ceux des autres techniques de titrages (tube vs carte gel neutre $p = 0.0089$, tube vs carte gel IgG $p < 0.0001$) (Cf. tableau 9).

Titres d'anti-D	Test statistique n=20	Significativité	Impact clinique
3 techniques	<i>Friedman</i>	$p < 0,0001$	-
Carte gel neutre vs tube	<i>Wilcoxon</i>	$p = 0,02$	+0,3 d (*)
Carte gel IgG vs tube	<i>Wilcoxon</i>	$p < 0,0001$	+2,8 d

Tableau 8. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-D : titres.

(*) d : dilution.

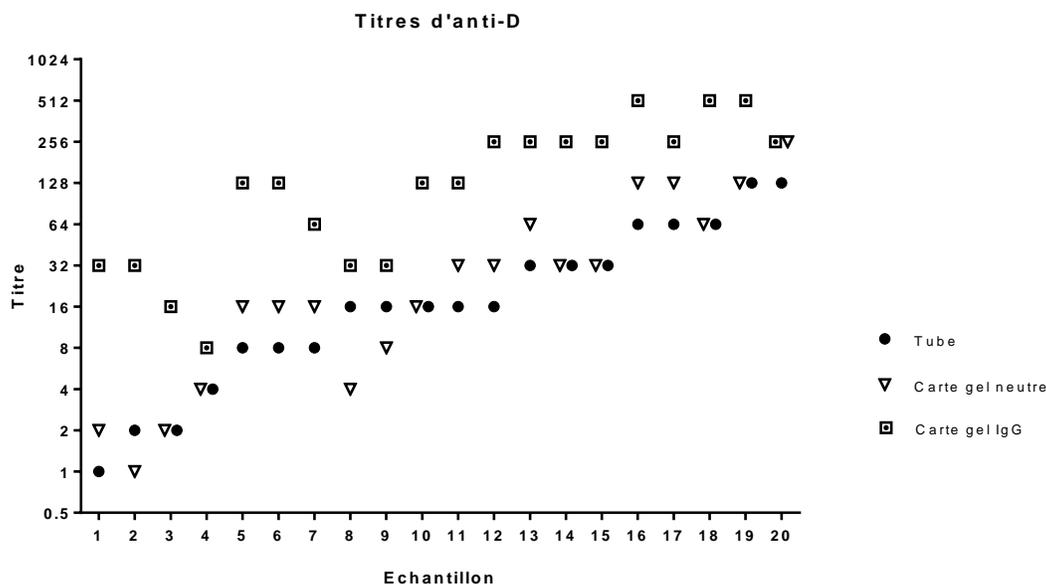


Figure 23. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-D : titres.

Scores d'anti-D	Test statistique n=20	Significativité	Moyenne des différences	Intervalle des différences
3 techniques	<i>Friedman</i>	p<0,0001		
Carte gel neutre vs tube	<i>Wilcoxon</i>	p=0,0089	16,95	[-2 ; 29]
Carte gel IgG vs tube	<i>Wilcoxon</i>	p<0,0001	40,2	[20 ; 59]

Tableau 9. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-D : scores.

2. Comparaison de méthodes de titrage : anti-K (KEL1)

La comparaison de différentes méthodes de titrage sur une série de 20 échantillons de plasma/sérum contenant un anti-K a donné les résultats suivants. Les titres étaient significativement différents entre les 3 techniques ($p < 0.0001$). On ne retrouve pas de différence statistique significative ($p < 0.99$) entre les titres obtenus en technique tube-cyocentrifugation (*référence*), et ceux obtenus en carte gel neutre. En revanche, les titres

obtenus en carte gel IgG étaient significativement différents ($p < 0.0001$) des titres en technique tube. On trouve en moyenne +1.7 dilutions en technique carte gel IgG, ce qui n'est pas cliniquement significatif (Cf. tableau 10, figure 24).

Les scores de titrage étaient différents entre les 3 techniques ($p < 0.0001$). Les scores du titrage en tube étaient globalement inférieurs à ceux des autres techniques de titrages (Tube vs carte gel neutre $p < 0.0001$, tube vs carte gel IgG $p < 0.0001$) (Cf. tableau 11).

Titres d'anti-K	Test statistique n=20	Significativité	Impact clinique
3 techniques	<i>Friedman</i>	$p < 0,0001$	
Carte gel neutre vs tube	<i>Wilcoxon</i>	$p > 0,99$	-
Carte gel IgG vs tube	<i>Wilcoxon</i>	$p < 0,0001$	+1,7 d

Tableau 10. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-K : titres.

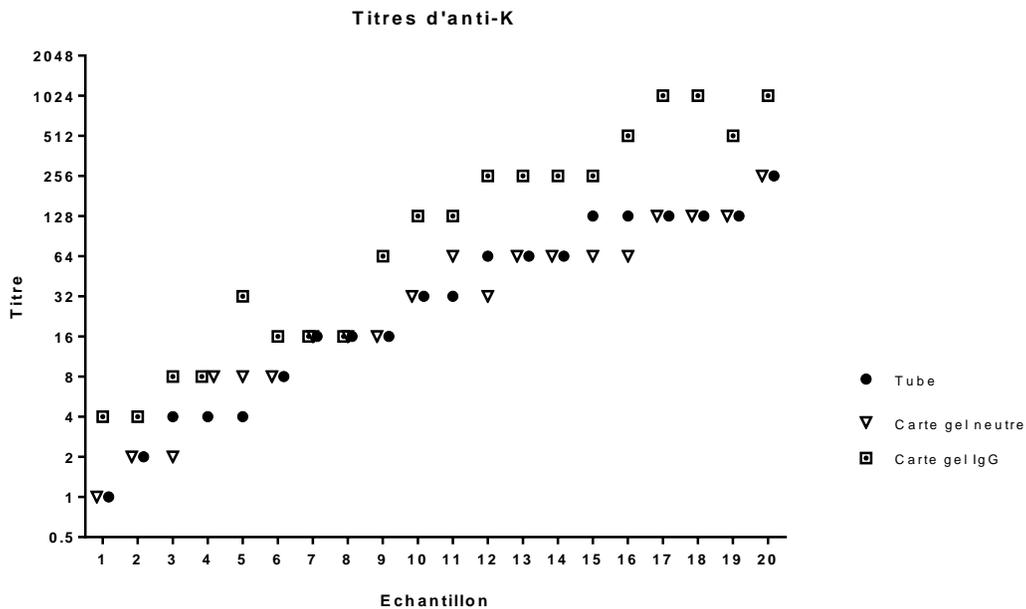


Figure 24. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-K : titres.

Scores d'anti-K	Test statistique n=20	Significativité	Moyenne des différences	Intervalle des différences
3 techniques	<i>Friedman</i>	p<0,0001		
Carte gel neutre vs tube	<i>Wilcoxon</i>	p<0,0001	18,05	[0 ; 35]
Carte gel IgG vs tube	<i>Wilcoxon</i>	p<0,0001	26,7	[9 ; 43]

Tableau 11. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-K : scores.

3. Comparaison de méthodes de titrage : anti-c (RH4)

La comparaison de différentes méthodes de titrage sur une série de 20 échantillons de plasma/sérum contenant un anti-c a donné les résultats suivants. Les titres étaient significativement différents entre les 3 techniques (p<0.0001). On ne trouve pas de différence statistique significative (p=0.06) entre les titres obtenus en technique tube et ceux obtenus en carte gel neutre. Les titres en carte gel IgG étaient supérieurs (p<0.0001) aux titres en tube, avec en moyenne +2.8 dilutions, ce qui est cliniquement significatif (Cf. tableau 12, figure 25).

Les scores de titrage étaient significativement différents entre les 3 techniques (p<0.0001). Les scores du titrage en tube étaient globalement inférieurs à ceux des autres techniques de titrages (Tube vs carte gel neutre p=0,015, tube vs carte gel IgG p<0.0001) (Cf. tableau 13).

Titres d'anti-c	Test statistique n=20	Significativité	Impact clinique
3 techniques	<i>Friedman</i>	p<0,0001	
Carte gel neutre vs tube	<i>Wilcoxon</i>	p=0,063	-
Carte gel IgG vs tube	<i>Wilcoxon</i>	p<0,0001	+2,8 d

Tableau 12. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-c : titres.

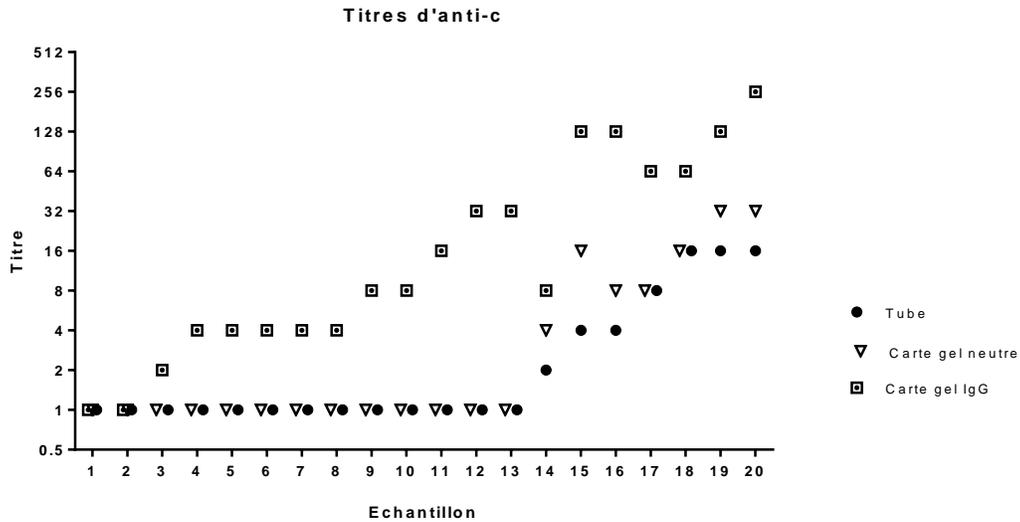


Figure 25. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-c : titres.

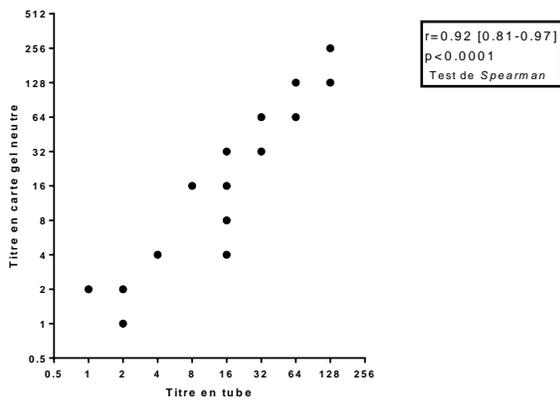
Scores d'anti-c	Test statistique n=20	Significativité	Moyenne des différences	Intervalle des différences
3 techniques	<i>Friedman</i>	p<0,0001		
Carte gel neutre vs tube	<i>Wilcoxon</i>	p=0,016	7,35	[0 ; 28]
Carte gel IgG vs tube	<i>Wilcoxon</i>	p<0,0001	26,95	[0 ; 55]

Tableau 13. Comparaison de méthodes de titrage pour l'anti-c : scores.

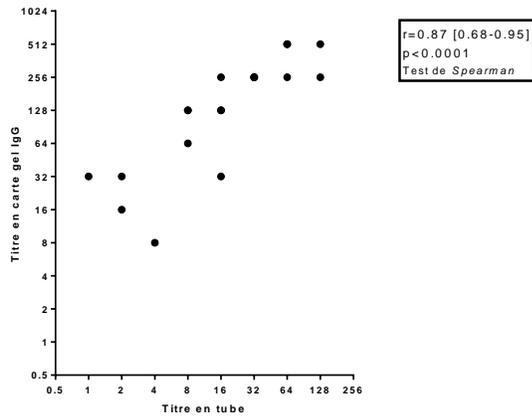
4. Etude de corrélation entre les techniques/ répartition des différences de titres

Des tests de corrélation de Spearman ont été effectués et montrent des corrélations significatives pour les 3 types d'anticorps entre les techniques tube et gel neutre, et entre les techniques tube et gel IgG ($p < 0.05$). Les coefficients r sont élevés entre les techniques tube et carte gel neutre pour les 3 types d'anticorps, et entre les techniques tube et carte gel IgG pour l'anti-K ($r > 0.9$). En revanche, le coefficient r est plus bas pour la technique tube vs carte gel IgG pour l'anti-D et l'anti-c. Il reste cependant > 0.7 (Cf. figure 26).

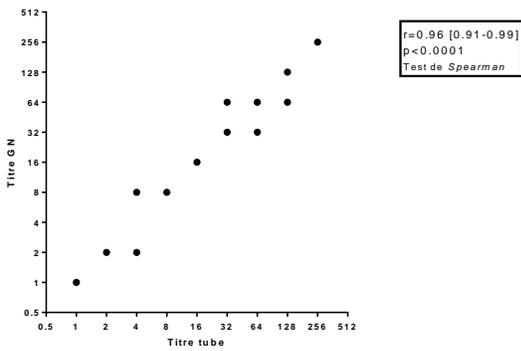
Titres anti-D: corrélation tube vs carte gel neutre



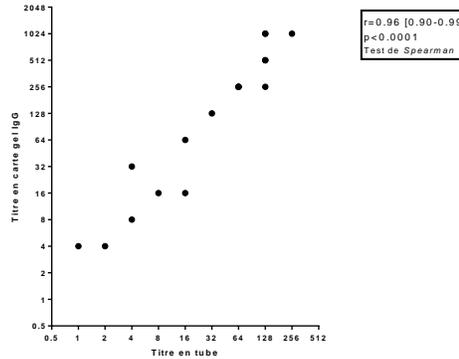
Titres anti-D: corrélation tube vs carte gel IgG



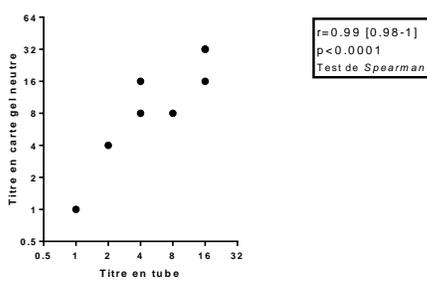
Titres anti-K: corrélation tube vs carte gel neutre



Titres anti-K: corrélation tube vs carte gel IgG



Titres anti-c: corrélation tube vs carte gel neutre



Titres anti-c: corrélation tube vs carte gel IgG

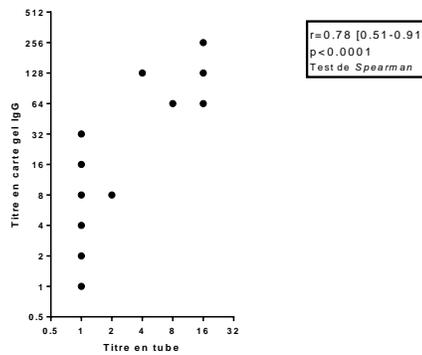


Figure 26. Etude de corrélation entre la technique tube et les techniques en carte gel neutre et carte gel IgG pour l'anti-D, l'anti-K et l'anti-c.

Pour chaque échantillon, les valeurs des titres obtenus dans les différentes techniques ont été comparées entre elles, afin de déterminer si la différence des titres constatés était systématique (auquel cas une « équivalence » pouvait être déterminée entre les techniques) ou si au contraire les différences étaient variables selon les patients.

Pour l'anti-D : les différences de dilutions entre techniques carte gel neutre et tube variaient de -2 à +1 dilution. Avec la technique en carte gel IgG, on avait de +1 à +5 dilutions.

Pour l'anti-K : les différences de dilutions entre les techniques en carte gel neutre et tube variaient de -1 à +1 dilution. Avec la technique en carte gel IgG, on était autour de 0 à + 3 dilutions.

Pour l'anti-c : En technique carte gel neutre les titres étaient de 0 à +2 dilutions supérieurs aux titres en technique en tube. Avec la technique en carte gel IgG, on avait de 0 à +5 dilutions (Cf. tableau 14).

Différence de titres : carte gel neutre (Biorad®) - tube	Anti-D n=20	Anti-K n=20	Anti-c n=20
-2 dilutions	1	0	0
-1 dilution	2	4	0
0 dilution	7	13	15
1 dilution	10	3	4
2 dilutions	0	0	1

Différence de titres : carte gel IgG (Diamed®)- tube	Anti-D n=20	Anti-K n=20	Anti-c n=20
0 dilution	0	2	2
1 dilution	4	5	1
2 dilutions	2	10	7
3 dilutions	9	3	4
4 dilutions	4	0	2
5 dilutions	1	0	4

Tableau 14. Différence de titres carte gel neutre vs tube et carte gel IgG vs tube pour les anti-D, -K, -c.

5. Etudes de répétabilité et reproductibilité

Pour les 3 techniques de titrage, les données de répétabilité et de reproductibilité du témoin titrage anti-D ont été calculées sur des séries d'environ 10 aliquotes. Le titre attendu était de 16 ou 32, soit en nombre de dilutions de raison 2, 4 et 5 dilutions positives. Toutes les techniques étaient répétables à une dilution près. Les titres en carte gel IgG étaient d'environ 3 dilutions supérieurs aux titres en technique tube. Le titrage en tube semble présenter des coefficients de variation sensiblement plus élevés que les méthodes en carte gel, aussi bien pour les titres que pour les scores du témoin anti-D (Cf. tableaux 15 & 16).

Technique	Nombre de tests	Moyenne des dilutions	Ecart-type des dilutions	Coefficient de variation (%)
Répétabilité du témoin anti-D : titres				
Titrage en tube N°1	10	4,2	0,4	10%
Titrage en tube N°2	9	5,2(*)	0,4	8,50%
Titrage en carte gel neutre N°1	11	5,1	0,3	6%
Titrage en carte gel neutre N°2	9	5	0	0%
Titrage en carte gel IgG N°1	10	7,3	0,5	6,60%
Titrage en carte gel IgG N°2	9	7,2	0,4	6,10%
Reproductibilité du témoin anti-D : titres				
Titrage en tube	29	4,2	0,4	10,30%
Titrage en carte gel neutre	8	5,1	0,4	6,90%
Titrage en carte gel IgG	8	7,5	0,8	10,10%

Tableau 15. Etudes de la répétabilité et de la reproductibilité des titres du témoin titrage anti-D dans les 3 techniques.

(*) : Préparation d'anti-D différente (13/07/2018 vs 05/12/2017).

Technique	Nombre de tests	Moyenne des scores	Ecart-type des scores	Coefficient de variation (%)
Répétabilité du témoin anti-D : scores				
Titrage en tube N°1	10	26,3	3,3	12,50%
Titrage en tube N°2	9	34 (*)	3,5	10,30%
Titrage en carte gel neutre N°1	11	54,1	3,7	6,80%
Titrage en carte gel neutre N°2	9	53,6	1,3	2,50%
Titrage en carte gel IgG N°1	10	65,6	5,4	8,30%
Titrage en carte gel IgG N°2	9	61,7	2,8	4,60%
Reproductibilité du témoin anti-D : scores				
Titrage en tube	29	22,8	4,8	20,9%
Titrage en carte gel neutre	8	52,5	3,2	6,0%
Titrage en carte gel IgG	8	70,3	5,6	7,9%

Tableau 16. Etude de la répétabilité du témoin titrage anti-D dans les 3 techniques et de la reproductibilité en technique tube.

(*) : Préparation d'anti-D différente (13/07/2018 vs 05/12/2017).

Chapitre 3 : Etude de la robustesse de la technique de référence de titrage

Des séries de 20-22 échantillons de plasma/sérum de patientes contenant un anti-D immun ont été testés pour chacun des paramètres du titrage en tube (*d'après la technique adaptée au CNRHP*) supposément critique à évaluer, afin de définir leur impact potentiel sur les résultats obtenus, et par la même occasion le cadre de la technique au laboratoire. L'ensemble des résultats sont consignés ci-dessous :

Titres d'anti-D	Test statistique N=20	Significativité	Impact clinique
Hématie-test : D+C+E-c-e+ vs D+C+E+c+e+	<i>Wilcoxon</i>	p=0,07	-
Hématie-test : D+C-E+c+e- vs D+C+E+c+e+	<i>Wilcoxon</i>	p= 0,03	+0.5 dilution
Hématie-test : pool de 3 vs 1	<i>Wilcoxon</i>	p=0,7	-
Hématie-test : 2% vs 4% vs 6%	<i>Friedman</i>	p= 0,0056	-
Hématie-test : 2% vs 4%	<i>Wilcoxon</i>	p=0,75	-
Hématie-test : 6% vs 4%	<i>Wilcoxon</i>	p= 0,016	-0.6 dilution
Dilution : manuelle vs automatisée	<i>Wilcoxon</i>	p=0,43	-
Incubation : 45 min vs 60 min vs 75 min	<i>Friedman</i>	p=0,12	-
Antiglobuline : pure vs diluée au 1/3	<i>Wilcoxon</i> ⁽¹⁾	p= 0,0056	-0.6 dilution
Durée de centri : 60 sec vs 20 sec	<i>Wilcoxon</i> ⁽²⁾	p= 0,002	+0.4 dilution
Durée de centri : 120 sec vs 20 sec	<i>Wilcoxon</i>	p= 0,001	+0.6 dilution
Vitesse de centri : 500 g vs 179 g	<i>Wilcoxon</i>	p=0,11	-
Vitesse de centri: 779 g vs 179 g	<i>Wilcoxon</i>	p= 0,027	+0.5 dilution
Lecture : immédiate vs 5 min vs 10 min	<i>Friedman</i>	p=0,88	-

Tableau 17. Etude de la robustesse de la technique de titrage en tube pour l'anti-D : titres.

(1) N=22 ; (2) N=21. *En gras, paramètres de la technique utilisée au laboratoire, p < 0.05.*

Scores d'anti-D	Test statistique N=20	Significativité	Moyenne/intervalle des différences
Hématie-test : D+C+E-c-e+ vs D+C+E+c+e+	<i>Wilcoxon</i>	p= 0,043	-3,7 [-19 ; 8]
Hématie-test : D+C-E+c+e- vs D+C+E+c+e+	<i>Wilcoxon</i>	p= 0,0002	+5,6 [-5 ; 15]
Hématie-test : pool de 3 vs 1	<i>Wilcoxon</i>	p=0,63	-
Hématie-test : 2% vs 4% vs 6%	<i>Friedman</i>	p= 0,0035	
Hématie-test: 2% vs 4%	<i>Wilcoxon</i>	p= 0,009	-4,5 [-22 ; 5]
Hématie-test : 6% vs 4%	<i>Wilcoxon</i>	p= 0,046	-2,6 [-20 ; 6]
Dilution : manuelle vs automatisée	<i>Wilcoxon</i>	p= 0,045	+3,3 [-8 ; 23]
Incubation : 45 min vs 60 min vs 75 min	<i>Friedman</i>	p= 0,045	
Incubation : 45 min vs 60 min	<i>Wilcoxon</i>	p=0,65	-
Incubation : 75 min vs 60 min	<i>Wilcoxon</i>	p= 0,01	+2,5 [-3 ; 9]
Antiglobuline : pure vs diluée au 1/3	<i>Wilcoxon</i> ⁽¹⁾	p= 0,0094	-4,7 [-20 ; 8]
Durée de centri : 60 sec vs 20 sec	<i>Wilcoxon</i> ⁽²⁾	p= 0,023	+3,3 [-8 ; 18]
Durée de centri : 120 sec vs 20 sec	<i>Wilcoxon</i>	p= 0,004	+2,5 [-12 ; 8]
Vitesse de centri : 500 g vs 179 g	<i>Wilcoxon</i>	p= 0,014	+3 [-5 ; 12]
Vitesse de centri : 779 g vs 179 g	<i>Wilcoxon</i>	p= 0,003	+4,1 [-5 ; 15]
Lecture : immédiate vs 5 min vs 10 min	<i>Friedman</i>	p=0,64	-

Tableau 18. Etude de la robustesse de la technique de titrage en tube pour l'anti-D : scores.

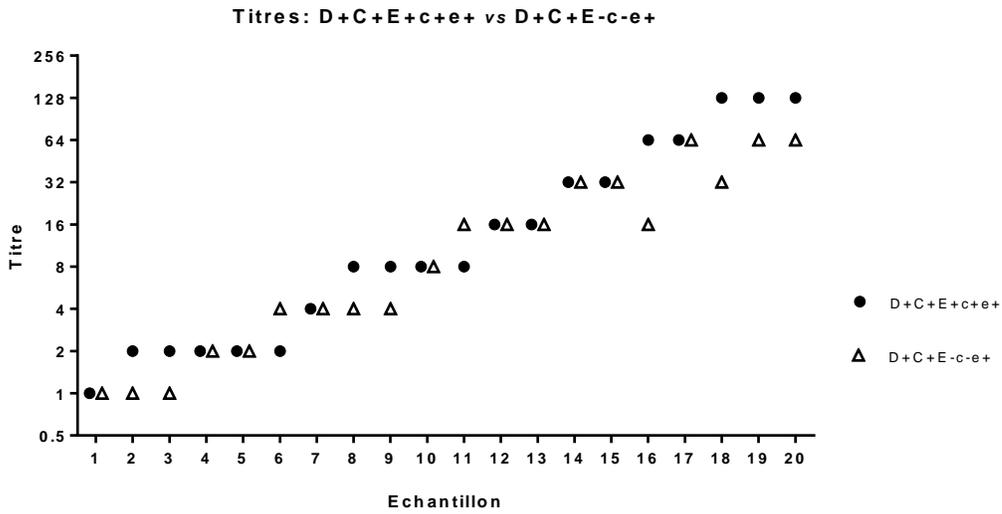
(1) N=22 ; (2) N=21. *En gras, paramètres de la technique utilisée au laboratoire, p<0.05.*

1. Le phénotype de l'hématie-test : D+C+E+c+e+ vs D+C+E-c-e+, et D+C+E+c+e+ vs D+C-E+c+e-

Les hématies-tests de phénotype D+C+E-c-e+ ne montraient pas de différence significative de titre avec les hématies D+C+E+c+e+ utilisées en routine (p=0.07), bien que l'on observe une tendance à la diminution des titres avec les hématies-tests D+C+E-c-e+ (Cf. figure 27a). En revanche, les titres d'anti-D étaient modérément plus élevés (+0.5 dilution) avec les hématies-tests de phénotype D+C-E+c+e- comparativement aux

hématies-tests D+C+E+c+e+ ($p=0.03$) (Cf. figure 27b). Les scores d'anti-D étaient significativement plus bas avec les hématies-tests D+C+E-c-e+ ($p=0.043$), et plus hauts avec les hématies-tests D+C-E+c+e- ($p=0.0002$).

a)



b)

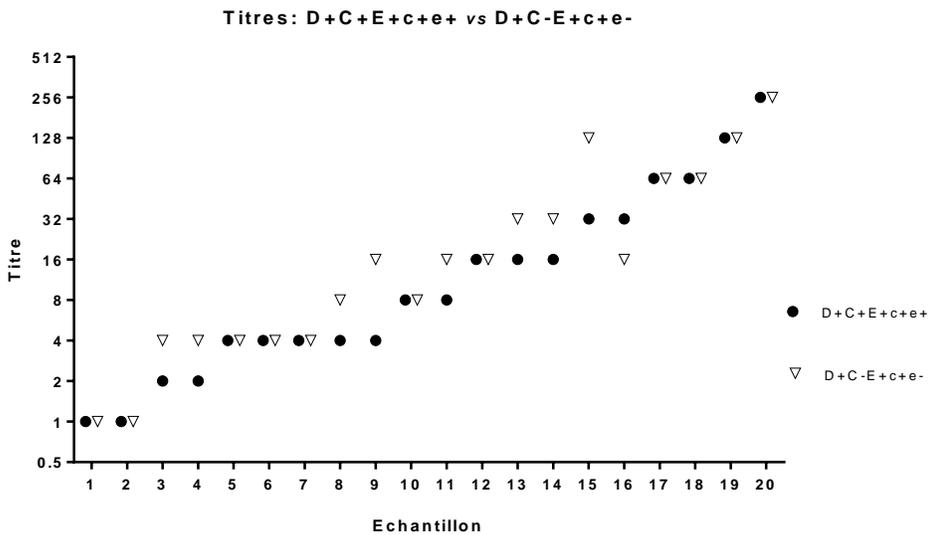


Figure 27. Influence du phénotype de l'hématie-test sur les titres d'anti-D : D+C+E-c-e+ vs D+C+E+c+e+ (a) ; D+C-E+c+e- vs D+C+E+c+e+ (b).

1. Le nombre d'hématies-tests : 1 hématie-test vs pool de 3 hématies-tests

Aucune différence statistique significative n'a été mise en évidence lorsqu'on remplaçait une hématie-test par un pool de 3 hématies-tests, aussi bien pour les titres ($p=0.7$), que les scores d'anti-D ($p=0.63$) (Cf. figure 28).

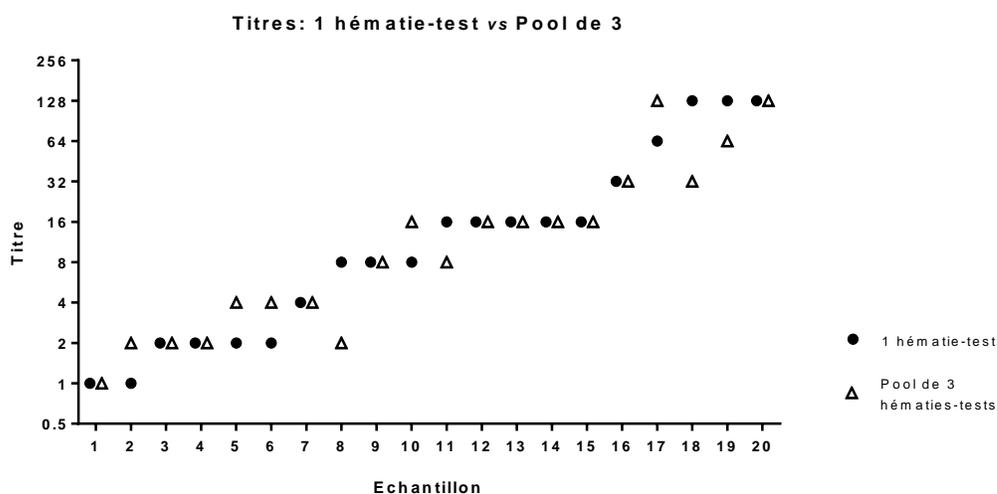


Figure 28. Influence du nombre d'hématies-test (1 hématie-test vs pool de 3 hématies-tests) sur les titres d'anti-D.

2. La concentration en hématie-test : 4% vs 2% et 6%

La comparaison des concentrations d'hématie-test 2% vs 4% vs 6% révèle une différence significative aussi bien de titres ($p=0.0056$), que de scores ($p=0.0035$). On ne retrouve pas de différence significative de titres entre les concentrations de 2% et 4% ($p=0.75$).

Les scores étaient quant à eux plus faibles avec une concentration de 2% par rapport à 4% ($p=0.009$). Avec une concentration de 6%, les titres et les scores étaient modérément plus faibles qu'à 4% (respectivement, $p=0.016$, $p=0.046$) (Cf. figure 29).

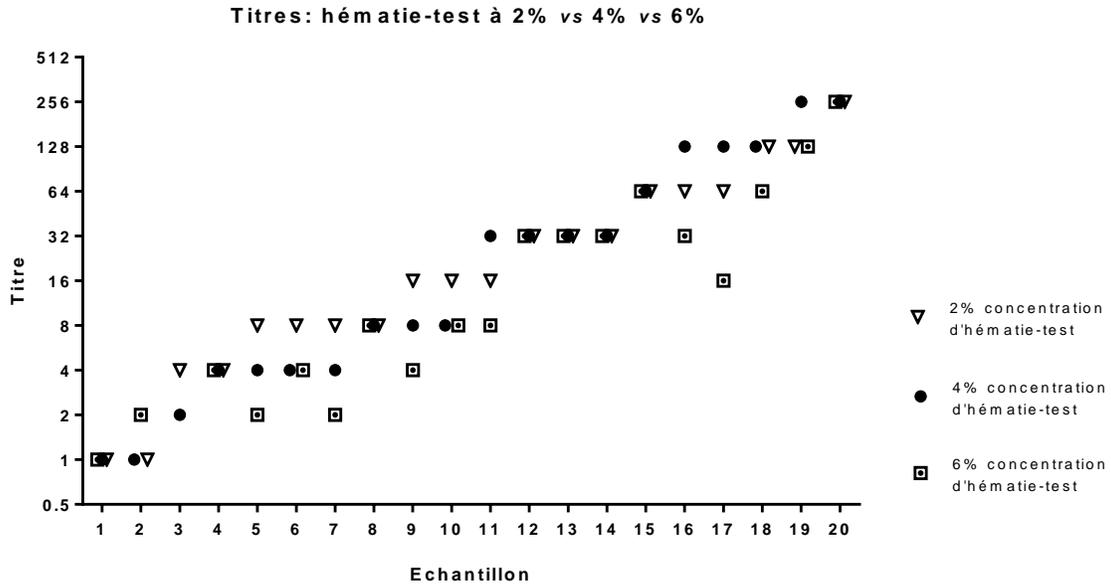


Figure 29. Influence de la concentration en hématies-tests (2% vs 4% vs 6%) sur les titres d'anti-D.

3. Le mode de dilution : dilution automatisée (TECAN) vs dilution manuelle

Aucune différence statistique significative n'a été mise en évidence entre titres d'anti-D obtenus après dilution automatisée et ceux obtenus après dilution manuelle ($p=0.43$) (Cf. figure 30). En revanche, les scores étaient légèrement plus élevés avec la dilution manuelle ($p=0.045$).

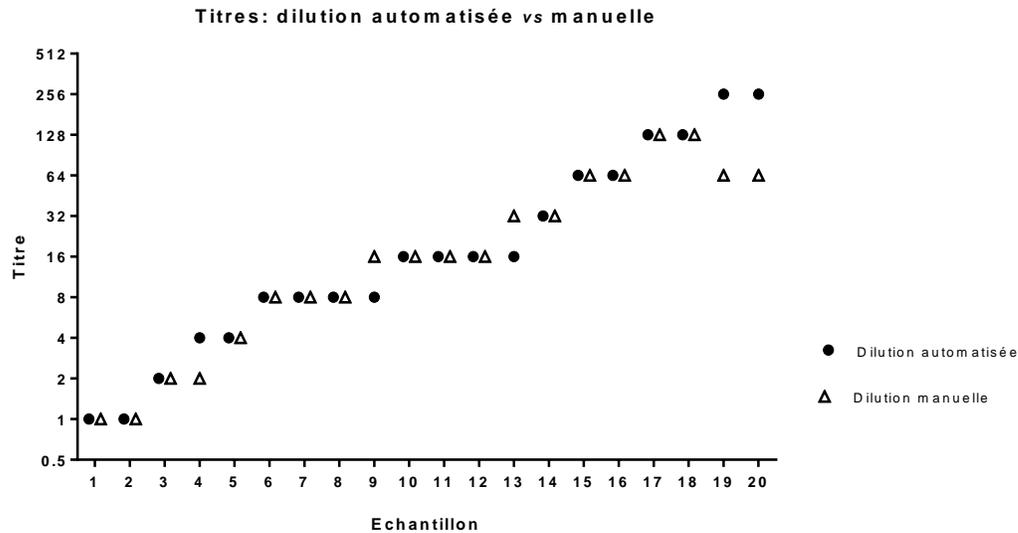


Figure 30. Influence du mode de dilution des échantillons (dilution automatisée vs manuelle) sur les titres d'anti-D.

4. La durée d'incubation : 60 min vs 45 min et 75 min

Aucune différence statistique significative de titres n'a été mise en évidence entre les temps d'incubation de 45 min, 60 min et 75 min ($p=0.12$) (Cf. figure 31). Quant aux scores, ils étaient significativement différents entre les 3 temps d'incubation ($p=0.045$). Aucune différence statistique significative de scores ($p=0.65$) n'était objectivable entre les temps de 45 min et de 60 min. Avec un temps d'incubation de 75 min, les scores étaient légèrement plus élevés qu'après 60 min d'incubation ($p=0.01$).

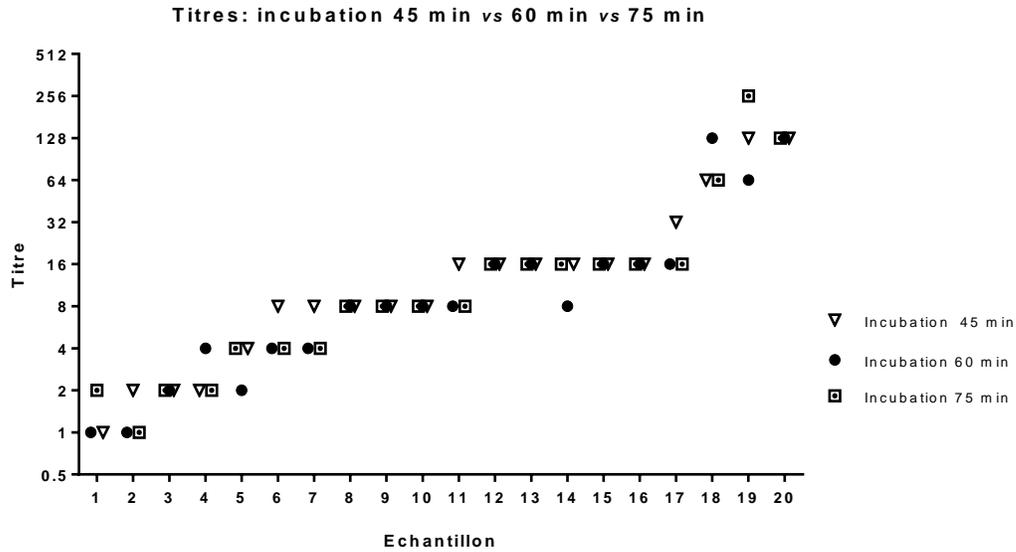


Figure 31. Influence du temps d'incubation (45 min vs 60 min vs 75min) sur les titres d'anti-D.

5. La concentration en antiglobuline : AGH diluée au 1/3 vs AGH pure

Les titres et les scores d'anti-D étaient modérément plus faibles lorsqu'on utilisait de antiglobuline pure (IgG, Diagast®), plutôt que diluée au tiers (respectivement, $p=0.0056$, -0.6 dilution ; $p=0.0094$) (Cf. figure 32).

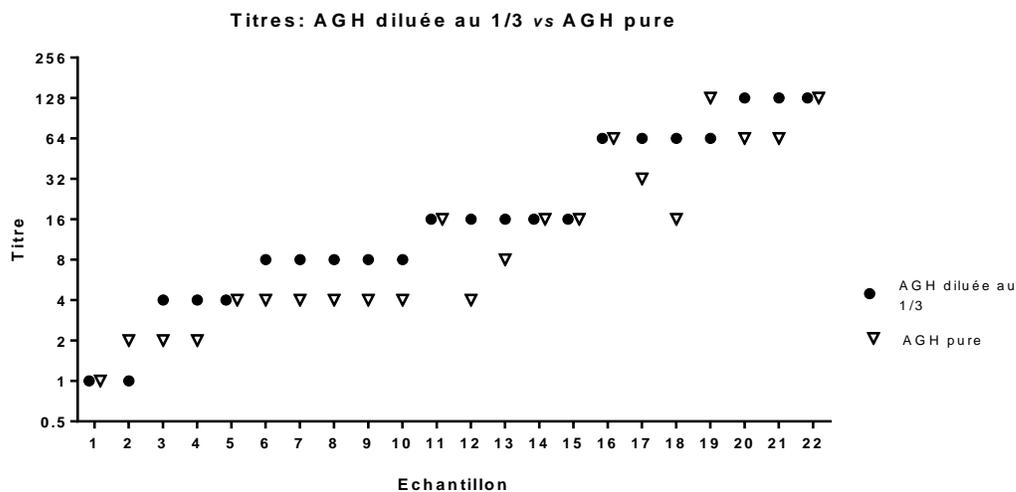
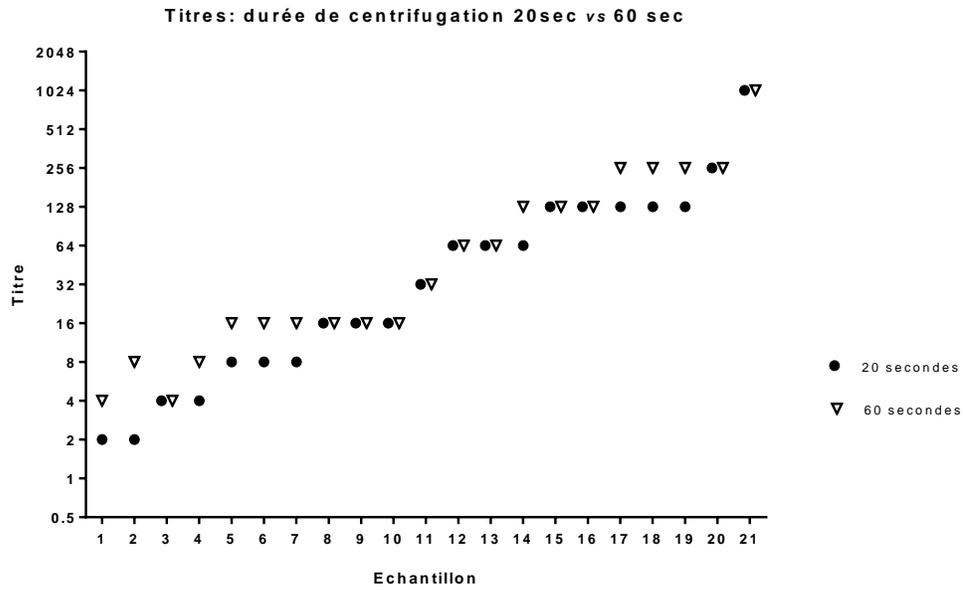


Figure 32. Influence de la concentration en antiglobuline (AGH diluée au 1/3 vs AGH pure) sur les titres d'anti-D.

6. La durée de la dernière centrifugation avant lecture : 20 secondes vs 60 secondes, et 20 secondes vs 120 secondes

Les titres d'anti-D étaient modestement supérieurs pour une durée de centrifugation de 60 secondes ($p=0.002$, +0.4 dilution) ou 120 secondes ($p=0.001$, +0.6 dilution), chacune comparées à une durée de 20 secondes (Cf. figures 33a & 33b). Il en était de même pour les scores d'anti-D (respectivement $p=0.023$, $p=0.004$).

a)



b)

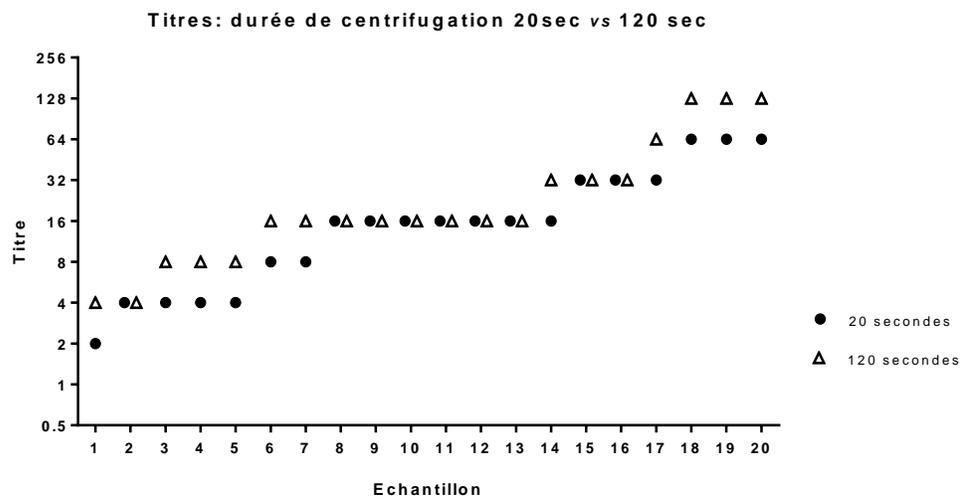
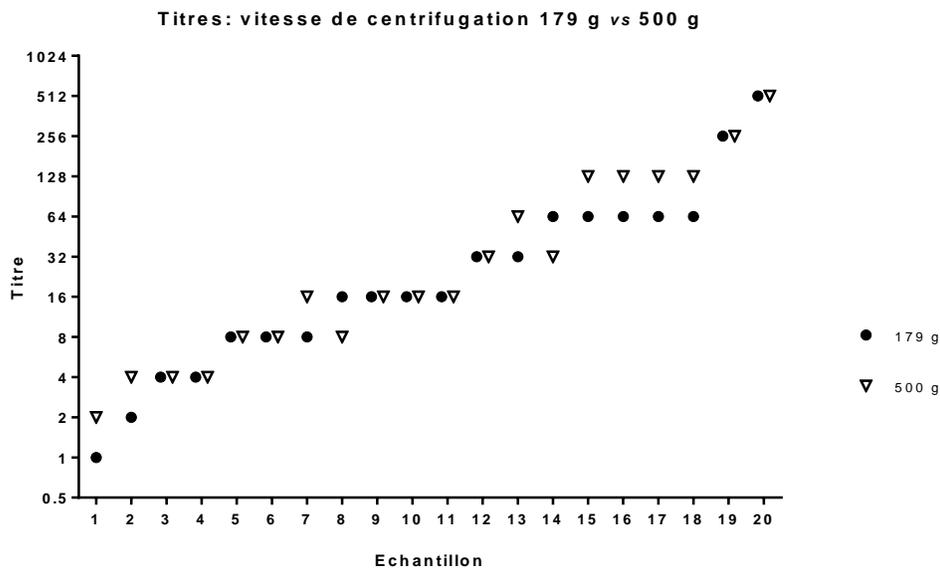


Figure 33. Influence de la durée de centrifugation sur les titres d'anti-D :20 sec vs 60 sec (a) ; 20 sec vs 120 sec (b).

7. La vitesse de la dernière centrifugation avant lecture : 179g vs 500 g et 179 g vs 779 g

On ne retrouvait pas de différence statistique significative entre les titres obtenus après une centrifugation à 500 g (2000 tours/min) et ceux obtenus après centrifugation à 179 g (1200 tours/min) ($p=0.11$) (Cf. figure 34a). En revanche, lorsque vitesse de centrifugation passait à 779 g (2500 tours/min) les titres d'anti-D étaient modérément supérieurs ($p=0.027$, +0.6 dilution) (Cf. figure 34b). Les scores étaient faiblement plus élevés pour les 2 vitesses de centrifugation comparativement à la vitesse de 179 g (500 g vs 179 g, $p=0.014$; 779 g vs 179 g, $p=0.003$).

a)



b)

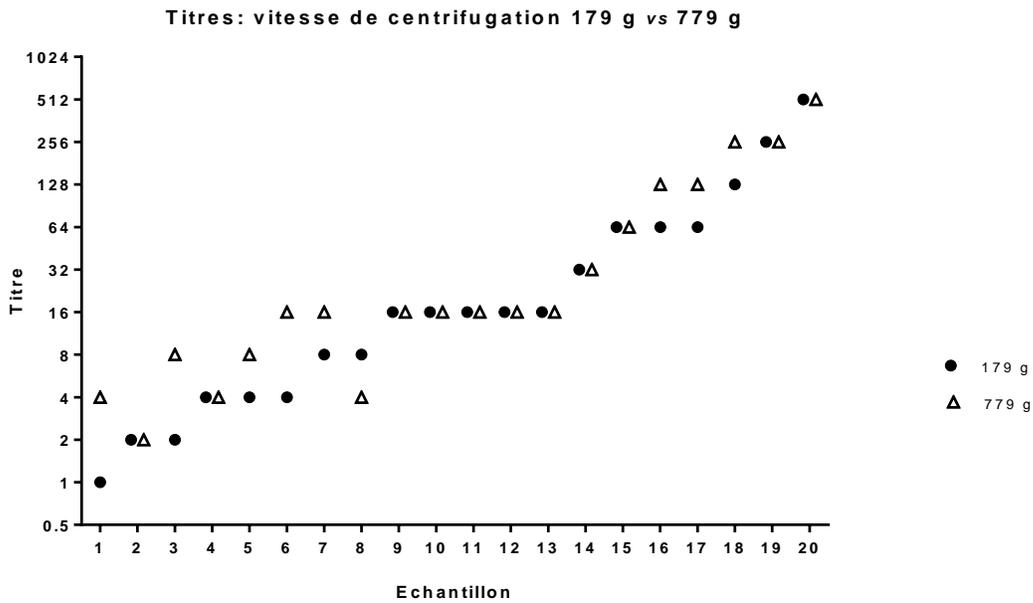


Figure 34. Influence de la vitesse de centrifugation sur les titres d'anti-D : 179 g vs 779 g (a) ; 179 g vs 779 g (b).

8. Le délai de lecture des agglutinats : immédiat vs 5 min et 10 min

On ne retrouvait pas de différence statistique significative ni de titres ni de scores entre les lectures immédiate, différée de 5 et de 10 min après la fin de la centrifugation (respectivement, $p=0.88$, $p=0.64$) (Cf. figure 35).

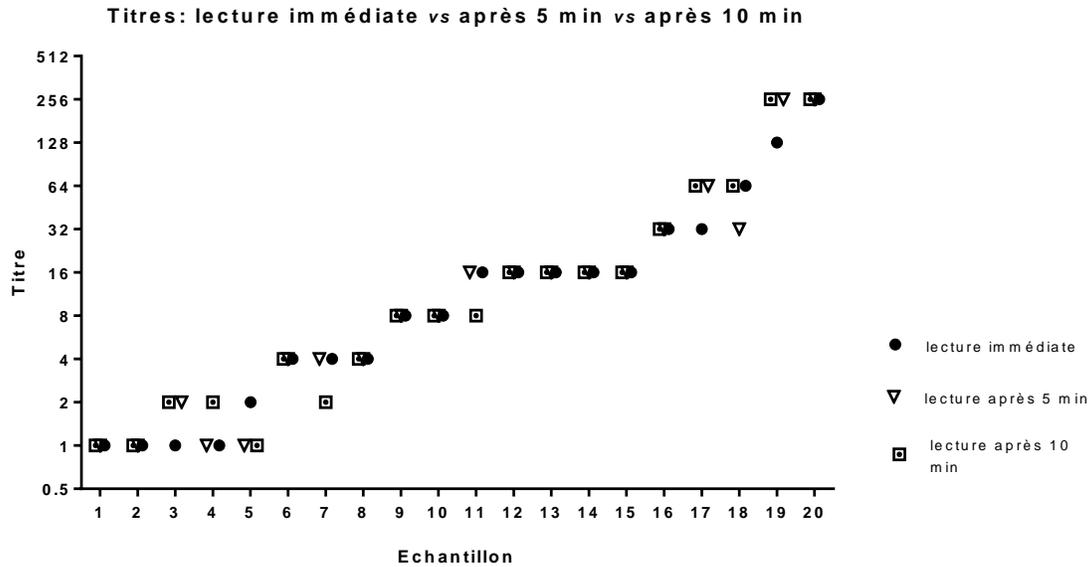


Figure 35. Influence du délai de lecture des agglutinats (lecture immédiate vs après 5 min vs après 10 min) sur les titres d'anti-D.

9. La variabilité inter-opérateur

Ces données sont antérieures aux études précédentes. Il y avait une différence significative des titres entre les 5 opérateurs ($p=0.0006$) (Cf. figure 36) ; on retrouvait un écart moyen de 2.1 dilutions, ce qui est cliniquement significatif. Il en était de même pour les scores ($p_1=0.0341$; $p_2=0.0096$). A noter que les scores ont été calculés pour chaque série de 10 échantillons, car le technicien n°4 avait omis de reporter les scores pour la 1^{ère} série.

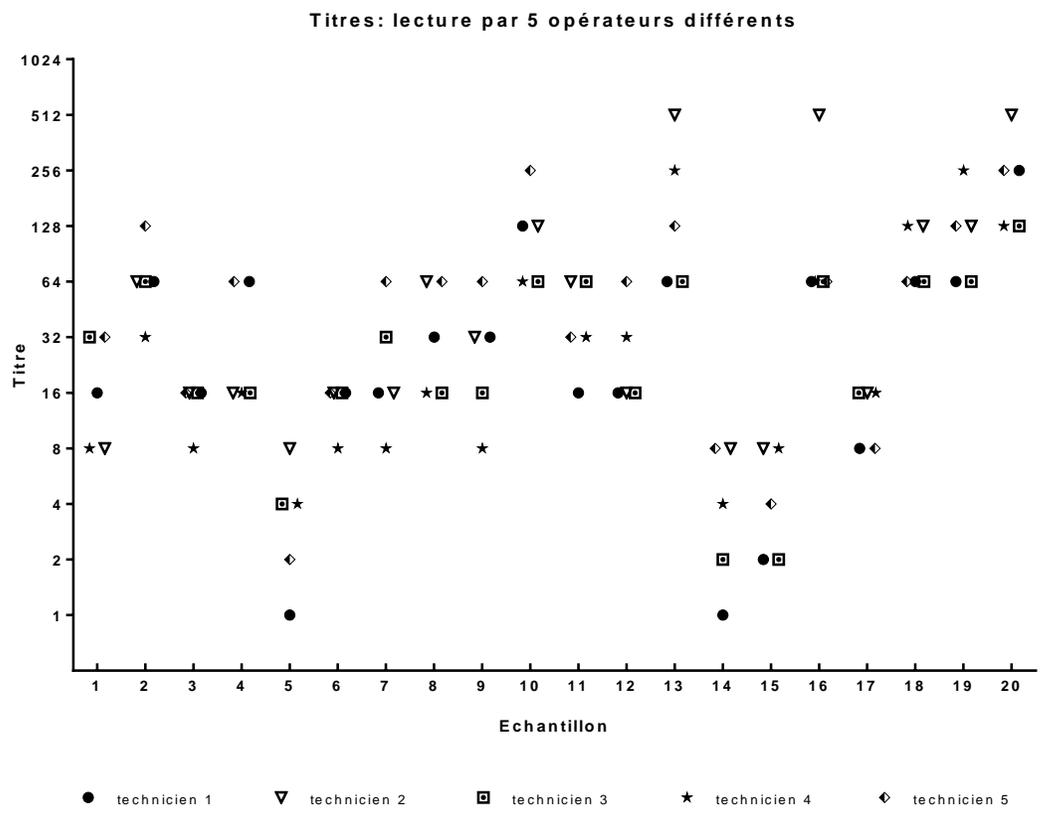


Figure 36. Influence du changement d'opérateur sur les titres d'anti-D.

DISCUSSION

La MHFN secondaire aux IFME demeure une cause de mortalité, et surtout de morbidité périnatale à travers le monde. C'est la 1^{ère} cause d'anémie fœtale [48]. Pour les anticorps à risque d'atteinte fœtale sévère anténatale (anti-D, -K, -c), sa probabilité d'installation est déterminée essentiellement par le taux maternel et l'âge gestationnel. Les grossesses incompatibles font l'objet d'une surveillance adaptée au niveau de risque encouru régulièrement réévalué.

Chapitre 1 : Les résultats de l'enquête nationale

Environ 17% des structures juridiques considérées comme laboratoires ont répondu à l'enquête. Le test de dépistage de la RAI est un examen de routine pratiqué par la grande majorité des laboratoires. Ce succès est sans doute à attribuer à l'ampleur de l'automatisation de cet examen (99% des participants concernés), facilitée par la réponse binaire attendue (positif vs négatif), sachant que la probabilité d'une positivité est faible même dans une population de patients hospitalisés (5%) [49]. On remarque qu'une petite fraction d'entre eux (9%) ont fait le choix de travailler également avec des hématies-tests traitées par enzymes pour sensibiliser la technique en cas de grossesse ; seulement, cela ne fait pas partie des recommandations officielles. Il est vrai d'après les données de la littérature [1, 31] que pour certains anti-D et anti-c, la RAI sur hématies natives pourrait être faussement négative bien que les anticorps soient présents à faible taux suite à immunisation générée lors d'une grossesse antérieure. L'utilisation d'hématies-tests traitées par enzymes permettrait de les révéler dans ce même temps. Brossard et al en 2002, recommandaient de toujours utiliser des hématies-tests traitées par protéases (papaine, broméline, ficine) de ce fait pour le dépistage du 1^{er} trimestre. Clarks et al [50], n'y trouvaient pas de valeur supplémentaire. Les dépistages du 6^e et 8^e mois sont dévolus à rattraper ces situations rares, ainsi que les situations d'immunisation tardive (2nd trimestre), du moins pour l'anti-D. Pour l'anti-c, étant donné les cas régulièrement

rapportés de défaut de prise en charge lié à un retard de dépistage de l'immunisation, il pourrait être intéressant de généraliser également la RAI au 6^{ème} mois de grossesse chez les femmes enceintes c négatif (environ 53 % des personnes d'origine asiatique, 20% des caucasiens, 2% des africains).

L'étape d'identification de la RAI, l'IAI concerne un nombre plus restreint de laboratoires. Son interprétation est plus complexe, et requiert de ce fait des compétences en immuno-hématologie suffisantes. Il en est de même de sa réalisation, pour laquelle il est encore aujourd'hui difficile d'éviter la technique manuelle. On peut également penser au rôle joué par les regroupements de laboratoires faisant suite aux exigences d'accréditation croissantes, et la polarisation des activités en vue d'une plus grande efficacité. L'utilisation d'hématies-tests traitées par enzymes lors d'une IAI, peut faciliter l'identification d'un anticorps en faible concentration suivant son profil, lorsque les réactivités attendues manquent, ou dévoiler une immunisation associée plus faible. Son emploi systématique en contexte obstétrical n'est pas spécifié dans les recommandations.

En France, le titrage des anticorps anti-érythrocytaires de la femme enceinte est uniquement manuel et essentiellement effectué en tube qui est la technique de référence. Cependant, on assistera peut-être à un changement des pratiques car dans le dernier arrêté [33], contrairement au précédent [51], aucune mention particulière ne précise la méthode à employer, ce qui ouvre le champ aux autres procédés notamment aux techniques en carte gel. Les informations recueillies relatives à la prestation de conseil fournie aux prescripteurs sur le titrage nous montrent que si globalement les laboratoires précisent bien les risques de MHFN, ils auront moins tendance à le faire pour les informations concernant le lieu de prise en charge du couple mère/enfant. Nous pensons que cela pourra évoluer favorablement avec le nouvel arrêté d'immuno-hématologie qui met l'accent sur cette prestation de conseils associée au résultat [33].

L'usage du microtitrage est réservé en pratique courante à la quantification des anti-D de faible intensité très largement liés à l'administration de la prophylaxie anti-D (anticorps passifs). Il sert à ajuster la prescription le plus souvent, mais aussi à ne pas méconnaître une immunisation active masquée le cas échéant. Son intérêt ne semble pas bien appréhendé par un certain nombre de laboratoires ne le pratiquant pas : 1/3 ne l'adressent

jamais. L'information transmise à l'obstétricien est dès lors incomplète. De plus, on constate pour le reste une absence de consensus ; la tendance est de s'inquiéter de la quantification lorsqu'on n'a pas de notion d'injection de Rophylac®, et/ou lorsque la réactivité de l'anti-D paraît « forte ». Ces 2 dernières notions sont de bon sens mais ne permettent pas de se prémunir de rares situations où une immunisation active est concomitante de l'administration d'Ig anti-D. Ainsi, la littérature rapporte des cas de vrais anti-D immuns considérés à tort comme étant d'origine passive [1].

Globalement les examens de RAI, d'IAI et de titrage sont bien pris en charge : ils sont soit réalisés, soit transmis par l'ensemble des laboratoires ayant répondu à l'enquête. Les différences constatées entre les laboratoires concernent d'une part la prestation de conseil et d'autre part les situations au cours desquelles ils sont amenés à transmettre ou réaliser une technique de quantification des anticorps autre que le titrage.

Le groupe de travail de la SFTS qui a proposé le questionnaire a pour objectif principal l'émission de recommandations détaillées au niveau national pour la prise en charge de la femme enceinte allo-immunisée ; celles de l'arrêté de mai 2018 restent plutôt succinctes.

Chapitre 2 : Les résultats de l'enquête internationale

L'enquête internationale menée auprès du groupe de travail « *Immunohaematology* » de l'ISBT nous apporte des informations sur le suivi immuno-hématologique de la femme enceinte dans 13 pays ou assimilés comme tels. Pour la majorité des pays, ce suivi s'appuie sur des recommandations émises par des organismes nationaux (ex : Etats-Unis), ou des consensus d'experts (ex : Espagne). L'île de Taïwan est le seul « pays » qui en est exempt. En 2003, Wu et al [52] stipulaient qu'il n'était pas rationnel d'instituer une politique de dépistage prénatale à Taïwan compte tenu de la très faible fréquence de cas de MHFN secondaires à des allo-anticorps anti-érythrocytaires (0.01%). A ce propos, il faut rajouter que l'existence de recommandations ne signifie pas que toutes les politiques se rejoignent. Dans la plupart des pays développés, à population essentiellement originaire de l'Europe de l'Ouest tels que la France, le Royaume-Uni et les Etats-Unis, le dépistage des anticorps anti-érythrocytaires concerne toutes les femmes enceintes quel

que soit leur statut pour l'antigène D [33, 53, 54]. La Hollande va d'ailleurs plus loin en matière de prévention de la MHFN ; la proposition dès 2008 d'une surveillance renforcée chez les femmes c négatif [55] a été entérinée, et son intérêt réaffirmé en 2016 [56]. En revanche, pour l'Inde, pays « émergent », Pahuja et al [57] rapportent que le dépistage concernerait davantage les femmes D négative ou avec des antécédents de problèmes obstétricaux. Le raisonnement est le même pour la Chine; Lee et al [58] ralliaient en 2003 une précédente recommandation selon laquelle le dépistage de routine de toutes les femmes enceintes chinoises ne serait pas digne d'intérêt excepté pour celles D négatif ou avec des antécédents de MHFN, au motif que la prévalence de l'immunisation cliniquement significative soit de 0.27% avec peu de cas de MHNN dans ce groupe, et le profil d'anticorps différent (anti-Mi^a prédominant) de celui des pays à population d'ascendance européenne. Le consensus d'experts aurait été émis l'année dernière. Quant aux spécificités reconnues comme étant toxiques pendant la grossesse, de nouveau, Taïwan se distingue par l'absence d'anti-D. En effet, le phénotype D négatif est peu courant dans cette population : 99.4% des individus sont D positif [59], comme dans toute l'Asie de l'Est. Pour rappel, le phénotype D positif est retrouvé chez 82-88% des sujets caucasiens, 95% des africains (Afrique subsaharienne), et atteint 100% dans certaines populations d'Asie [60]. Comment dès lors expliquer que l'anti-D soit cité par la Chine et Hong-Kong ? Pour ce qui est de la Chine on pourrait évoquer la démographie exceptionnelle, conduisant à dénombrer un nombre de cas conséquent. Hong-Kong se base sur les recommandations des sociétés anglo-saxonnes (BCSH, AABB), bien que cela ne soit pas conforme à la réalité locale. Le parallèle peut être appliqué à l'immunisation anti-K non citée par certains pays. En effet, la fréquence de l'antigène K est très faible en Asie [61] [59]. Pour autant, l'absence d'anti-K en Iran paraît surprenante. En 2011, Kermati et al [62] retrouvaient une fréquence de 8% de l'antigène K dans le Nord-Est du pays. En 2017, l'article de Shahverdi et al [63], répertorie quelques cas d'anti-K chez des femmes enceintes iraniennes.

Le titrage est utilisé dans les 13 pays pour le monitoring de la concentration maternelle en anticorps anti-érythrocytaires pendant la grossesse. Cependant, les pratiques sont hétérogènes du point de vue de la technique pure et de l'interprétation des résultats. Pour

la méthode de titrage, bien que celle en tube-cyto-centrifugation soit la plus retrouvée, on observe une émergence de l'emploi de la méthode en carte gel. L'essor du titrage en carte gel IgG tient au gain de temps (absence de lavages), et à la moindre variabilité des résultats inter-laboratoires (lecture en phase solide). Cependant, sa limitation actuelle, réside dans l'absence de preuves scientifiques disponibles établissant une corrélation entre les titres en carte gel IgG et l'issue clinique (anémie fœtale sévère, MHNN). Ainsi, ce pose le problème de l'absence de valeurs critiques définies pour décider de la mise en place d'un suivi échographique. Les deux pays effectuant le titrage en carte gel en méthode principale n'ont d'ailleurs pas renseigné de titres seuils. En technique tube, certains pays travaillent sur hématies-tests homozygotes pour l'antigène cible, au lieu d'hématies hétérozygotes supposées refléter davantage la situation obstétricale. Pour l'évaluation du risque fœtal à partir des données biologiques, les titres seuils (tube) les plus fréquents sont de l'ordre de 16 à 32, et appliqués pour la majorité des anticorps. Certains pays donnent ces 2 valeurs, ce qui rend compte de la reproductibilité du titrage qui se situe à une dilution près. Pour la prise en charge des IFME avec anti-K, 2 camps s'opposent : ceux qui considèrent qu'aucun titre n'est suffisamment fiable pour prédire la survenue d'une anémie fœtale sévère, et ceux qui disposent de titres seuils pour s'aider. Certains articles de la littérature étayent le 1^{er} postulat, on peut citer l'étude de Rimon et al [64], pour lesquels les allo-immunisations anti-K devraient être directement surveillées par mesures rapprochées du PSV-ACM. En 2001, dans ses recommandations sur le suivi prénatal et périnatal immunohématologique revisités pour l'AABB, Judd énonce que la surveillance des IFME avec anti-K doit être clinique [54].

Les biologistes du Royaume-Uni ayant répondu à l'enquête partagent cet avis. Néanmoins, il est différent des recommandations nationales qui reprennent l'idée d'utiliser un titre seuil de 32 [53]. Dans un article très récent, une équipe néerlandaise détermine qu'un titre seuil d'anti-K de 4 permettrait de détecter 100% des fœtus à risque [65].

Le score est peu utilisé, Bruce et al ont pourtant démontré qu'il était possible de prédire la sévérité de la MHFN en se référant à des valeurs de scores seuils (70 pour l'anti-D, 40 pour l'anti-c) après une comparaison basée sur les seuils critiques du dosage pondéral [66].

D'autres méthodes de dosage existent, et certaines ont montré une meilleure valeur prédictive positive de la sévérité de l'atteinte fœtale que le titrage : comme le dosage pondéral, la cytométrie en flux, ou l'ELISA [34, 36, 67]. D'ailleurs, la réalisation d'un dosage pondéral fait partie des recommandations officielles en France [33] pour les anticorps du système Rh. C'est également le cas au Royaume-Uni où c'est l'unique outil biologique pour décider de la mise en place de la surveillance échographique pour l'anti-D et l'anti-c. La plupart de ces méthodes de quantification des anticorps posent le problème de la lourdeur technique, du coût des installations et par conséquent de leur accessibilité restreinte même pour les pays développés. On peut ainsi constater comme c'est le cas pour les tests fonctionnels, que leur maillage a considérablement baissé avec l'avènement du suivi échographique par vélocimétrie doppler début des années 2000. Dans un article paru en 1995 dans la revue *Vox Sanguinis* [68], les procédures des laboratoires pour la prédiction de la MHFN présentées par les biologistes de plusieurs pays ont été décrites. Le titrage en tube était réalisé au Canada, aux Etats-Unis, en Finlande, Pologne ; les tests fonctionnels étaient effectués, en Hollande (ADCC), Royaume-Uni (CLT), en Pologne (MMA) ; le dosage pondéral au Royaume-Uni, en Finlande, en Pologne. En France, en 1991, on comptait 5 centres de dosage pondéral. L'exploration relativement simple, et surtout non-invasive de l'anémie fœtale a autorisé les obstétriciens à travailler avec des données moins précises, là où avant l'atteinte d'un seuil critique faisait discuter une amniocentèse ou une ponction de sang fœtal avec les risques qu'on leur connaît.

Chapitre 3 : La comparaison des méthodes de titrage

La comparaison de 3 méthodes de titrage, tube, carte gel neutre (Biorad®) et carte gel IgG (Diamed®) a été effectuée pour les 3 anticorps les plus dangereux pendant la grossesse en France (anti-D, anti-K, anti-c). Les titres obtenus en titrage carte gel IgG étaient supérieurs de plus de 2 dilutions en moyenne aux titres en tube pour les anti-D et anti-c, ce qui est cliniquement significatif. Les tests de Spearman montrent qu'il existe des corrélations entre les techniques tube, gel neutre et gel IgG, pour les 3 types d'anticorps avec des coefficients de corrélation allant de 0.7 à 0.99. Mais pour un titre donné en tube, les titres trouvés en technique carte gel IgG peuvent varier d'un écart s'étalant sur 5 voire 6 dilutions, ce qui rend difficile l'établissement d'un facteur de correspondance entre les techniques. Nos constatations abondent dans le sens de quelques données de la littérature sur les cartes gel IgG Diamed® [69, 70]. Finck et al [71], rapportaient à l'inverse des résultats proches entre les 2 techniques en se servant de cartes gel IgG Ortho-Clinical Diagnosis™. C'est un fait connu que le milieu basse force ionique augmente la sensibilité du test indirect à l'antiglobuline [72]. On peut s'attendre à une diminution des écarts avec des hématies-tests préparées en milieu salin, mais cela implique un allongement du temps d'incubation (de 15 min à 60 min). Pour l'anti-K, les titres en carte gel IgG étaient supérieurs de 1.7 dilutions aux titres en tube, ce qui est à la limite de la significativité, avec une variabilité des écarts moindre. Le comportement de cet anticorps en carte gel IgG serait singulier, différent des précédents. Ainsi, un précédent travail conduit au CNRHP retrouvait des titres parfois plus faibles en carte gel IgG qu'en tube, ce que nous n'avons pas objectivé dans notre série d'échantillons. Les différences de titres entre carte gel neutre et tube étaient inexistantes ou sans impact clinique. Notre technique de titrage en carte gel neutre s'apparentait à la technique en tube à l'exception de la phase de révélation qui se faisait en carte gel neutre. Elle présentait néanmoins comme inconvénients de nécessiter un nombre plus important d'étapes manuelles (risque d'erreurs, perte en précision) et d'obtenir les culots de fin de lavages les plus « secs » possible (programme de décantation) pour éviter toute dilution supplémentaire. Cependant, ce mode de lecture pour lequel la présentation des agglutinats se fait en phase solide, pourrait expliquer la dilution supplémentaire retrouvée pour un

certain nombre d'échantillons d'anti-D ; la lecture en tube est plus délicate, car l'agglutination est labile. Pour l'anti-c, la comparaison carte gel neutre et tube ne montrait pas de différence de titres significative, mais un biais à évoquer serait le nombre d'échantillons de titre <2 dans la série. Il faut tout de même préciser que la sélection tenait compte des résultats du dosage pondéral, certains sérums/plasmas contenaient des taux critiques d'anti-c bien que le titre en tube soit <2 . C'est une particularité des anti-c qui sont le plus souvent de moyenne voire faible affinité, ce qui conduit à des titres très faibles, car les anticorps se décrochent lors des étapes de lavages. Ce problème inhérent à la technique de titrage en tube, et par conséquent retrouvé avec notre technique adaptée de titrage en carte gel neutre, la technique de titrage en carte gel IgG en est exempte. Cela nous laisse à penser qu'elle pourrait davantage indiquer la concentration en anticorps que la technique tube dans ce cas distinct. Il serait intéressant de faire une étude de corrélation entre le titrage en carte gel IgG, le dosage pondéral, et l'issue clinique pour des IFME avec anti-c.

Les scores en techniques carte gel (neutre et IgG) étaient clairement supérieurs aux scores en tube. Un écart d'au moins 10 points serait la limite pour en tenir compte : il était atteint pour les 3 spécificités testées. En général, on observe avec ces techniques une décroissance moins régulière des intensités d'agglutination qui se maintiennent sur un nombre plus important de dilutions.

Les données de répétabilité et de reproductibilité des 3 techniques suggèrent que les coefficients de variation seraient meilleurs en techniques utilisant les cartes gel comparées à la technique tube. Cependant, il aurait été préférable de tester un nombre plus important d'échantillons par série pour l'affirmer.

Nous n'avons pas étudié le titrage automatisé sur microplaque par immunocapture. D'après une étude précédemment menée au CNRHP (2012) avec l'automate NEO® Immucor, on retrouvait des écarts de titres d'environ 2 dilutions avec la technique en tube pour l'anti-D.

Chapitre 4 : La robustesse du titrage

La modification de certains paramètres faisait varier les titres d'anti-D. Les titres d'anti-D étaient modérément rehaussés (<1 dilution supplémentaire en moyenne) lorsque l'hématie-test était de phénotype D+C-E+c+e- (vs D+C+E+c+e+), pour une durée de centrifugation augmentée à 60 secondes ou 120 secondes (vs 20 secondes), et une vitesse de centrifugation relevée à 779 g (vs 179 g). Le phénotype de l'hématie-test joue sur le nombre de copies d'antigène disponibles pour l'anticorps. Cela prévaut notamment pour l'antigène D : parmi les phénotypes communs, il est plus exprimé sur les hématies portant les haplotypes *DcE*, que *DCe* [73], d'où les résultats observés. La durée et la vitesse de centrifugation influent sur le rapprochement physique des hématies-tests et pourraient favoriser une meilleure fixation de l'antiglobuline et/ou tenue des agglutinats au moment de la lecture.

Les titres d'anti-D étaient modérément diminués (<1 dilution d'écart en moyenne) lorsque la concentration de l'hématie-test était de 6% (vs 4%), et l'antiglobuline utilisée pure (vs diluée au 1/3). Dans ces deux cas nous suspectons une sortie plus rapide de la zone d'équivalence Ag/Ac, par excès antigénique pour la concentration en hématie-test à 6%, et par excès d'anticorps IgG avec l'antiglobuline pure pour certains échantillons d'anti-D. Pour ce qui est de l'antiglobuline, cela devrait être testé pour chaque nouveau lot. Les écarts de résultats inter-laboratoires pourraient être en partie liés à des différences de concentrations ou de clones suivant le fournisseur.

Il n'y a pas eu de différence de titres d'anti-D mise en évidence pour l'utilisation : d'une hématie-test de phénotype D+C+E-c-e+ vs D+C+E+c+e+, d'un pool de 3 hématies-tests vs une seule hématie-test, une concentration de l'hématie-test de 2% vs 4%, la dilution manuelle vs automatisée, un temps d'incubation de 45 min vs 60 min vs 75 min, une vitesse de centrifugation de 500 g vs 179 g, des temps de lecture immédiat vs après 5 min vs après 10 min. L'intérêt d'avoir recours à un pool d'hématies-tests est en cours d'étude au CNRHP pour d'autres spécificités antigéniques qui pourraient se comporter différemment (Antigènes à fort « effet-dose » comme dans les systèmes MNS FY ou JK). L'automatisation des dilutions permet de standardiser au maximum cette étape, et de s'affranchir des erreurs de pipetage liées à l'opérateur. Les résultats obtenus pour les

temps d'incubation testés suggèrent que la très grande majorité des anticorps anti-D contenus dans le sérum des patientes est fixée au bout de 45 min d'incubation à 37°C. Le paramètre qui finalement semble avoir le plus d'impact est la variabilité inter-opérateur. Au CNRHP, le 1^{er} titrage est systématiquement doublé par 2 opérateurs différents, et un 3^{ème} titrage requis en cas de différence supérieure ou égale à 2 dilutions pour éviter les sur- ou sous-estimations du titre initial de l'anticorps. Le titrage en parallèle de la sérothèque pour les échantillons suivants est un autre moyen de garantir un résultat fiable : c'est le mode de fonctionnement préconisé dans les recommandations françaises. Simultanément à ces mesures, il semble important de bien définir des abaques de lecture et d'homogénéiser la formation des techniciens en intra-laboratoire. Généraliser la lecture des échantillons de l'évaluation externe de la qualité à l'ensemble du personnel permet aussi d'appréhender au sein d'un laboratoire les éventuelles différences de lecture inter-opérateurs. Les scores étaient variables, mais ils ne sont renseignés qu'à titre indicatif. Aucun seuil n'est défini.

Aucun des paramètres « techniques » étudiés pris isolément n'avait d'impact clinique propre sur le résultat du titrage. Il sera tout de même aisé d'admettre que la combinaison de plusieurs particularités dans ces facteurs pourrait mener à des différences de titre ≥ 2 dilutions. Ce qui pourrait justifier l'intérêt de s'en tenir dans la mesure du possible à la méthode de référence ayant servi à l'élaboration des valeurs seuils, ou de définir de nouvelles valeurs seuils suivant les adaptations de cette technique dans les laboratoires. Concernant la problématique de la variabilité inter-laboratoire, il semble légitime de l'attribuer à l'absence de standardisation de la technique de titrage en tube qui se décline plus ou moins bien en conformité avec la technique telle qu'elle fut initialement décrite. Cependant, si Aubuchon et al [74] peinaient à mettre en évidence une moindre variabilité avec la standardisation de la méthode, l'étude menée par Lohith et al [75] auprès d'un nombre plus important de laboratoires montre que l'harmonisation de la procédure ne permet pas de réduire comme on pourrait s'y attendre la variabilité des titres inter-laboratoires. Les hypothèses évoquées sont : le biais induit par l'opérateur, la lecture du titre étant subjective que ce soit en 1+ ou en point final (+), les équipements et la diversité des réglages possibles.

La faible précision du titrage en tube est embarrassante pour le monitoring des anti-D, anti-c et des anti-E de concentration intermédiaire, car dans ces configurations où les réactivations surviennent dans près de 50% des cas, on peut craindre un retard au diagnostic d'une ascension du taux d'anticorps, et donc à la mise en place de la surveillance clinique. C'est tout l'intérêt comme préconisé en France, d'y associer une technique plus précise de mesure de la concentration en anticorps à l'instar du dosage pondéral. Les anti-K sont moins sujets aux réactivations, mais de l'expérience du CNRHP, la variabilité des titres inter-laboratoires avec les anti-K est relativement importante. Elle serait en partie liée à la finesse des agglutinats formés avec cet anticorps, plus difficiles à percevoir par l'opérateur (risque de sous-estimation au moment de la lecture).

CONCLUSION

Le titrage des anticorps anti-érythrocytaires est l'examen le plus répandu (quasi-universel) pour la surveillance biologique des taux d'anticorps chez les femmes enceintes allo-immunisées exposées au risque de MHFN. Le titrage donne une information importante sur l'affinité des anticorps, donc sur la dangerosité et le risque fœtal associé. Le titrage en tube est la technique de référence, mais parmi ses inconvénients on compte une mauvaise reproductibilité intra et surtout inter-laboratoire, et la difficulté de l'automatiser. Les alternatives à la technique de titrage en tube plus « récentes », automatisables, devraient prendre leur essor dans les prochaines années en France, et à l'international. Cependant, que ce soit le titrage en carte gel IgG dont nous avons montré qu'il donnait souvent des résultats supérieurs par rapport à la technique de référence, ou le titrage en plaque par immunocapture, ces nouvelles techniques nécessitent encore la définition de seuils adaptés pour la mise en place d'une surveillance clinique fœtale.

BIBLIOGRAPHIE

1. LARSEN, Y.B.F.P.-M.M., *Diagnostics et suivi prénatals des allo-immunisations érythrocytaires*. Feuillet de Biologie, 2002. **XXXIII**(n°245).
2. Ghesquière, L., et al., *Management of red blood cell alloimmunization in pregnancy*. Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction, 2018. **47**(5): p. 197-204.
3. A. Cortey, A.M., S. Huguet-Jacquot, V Castaigne-Meary, G. Macé, A. N'Guyen et al, *Incompatibilités foetomaternelles érythrocytaires*. EMC-Pédiatrie, 2012. **7**.
4. BOWMAN, J.M., *The Management of Rh-Isoimmunization*. Obstetrics & Gynecology, 1978. **52**(1): p. 1-16.
5. *Arrêté du 19 avril 1985 modifiant l'arrêté du 27 août 1971 relatif aux examens médicaux pré et postnatals*
Version consolidée au 03 juin 2017
6. W., S. and S. S., *Prevalence of Irregular Red Cell Antibodies and Their Significance in Blood Transfusion and Antenatal Care*. Vox Sanguinis, 1974. **26**(6): p. 551-559.
7. Henk, S., et al., *HLA-DRB1 associations in individuals with single and multiple clinically relevant red blood cell antibodies*. Transfusion, 2014. **54**(8): p. 1971-1980.
8. Jacques, C., et al., *HLA - DRB1 polymorphism is associated with Kell immunisation*. British Journal of Haematology, 2006. **132**(3): p. 374-378.
9. Hadley, A.G., *Laboratory assays for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn*. Transplant Immunology, 2002. **10**(2): p. 191-198.
10. JENSEN TS, M.R., *Fc gamma-receptor activity in the developing human placenta*.
. Acta pathologica , microbiologica, et immunologica scandinavica, 1995.
11. Kapur, R., et al., *Prophylactic anti-D preparations display variable decreases in Fc-fucosylation of anti-D*. Transfusion, 2015. **55**(3): p. 553-562.
12. A., L., et al., *Transplacental IgG Subclass Concentrations in Pregnancies at Risk of Haemolytic Disease of the Newborn*. Vox Sanguinis, 1994. **67**(3): p. 291-298.
13. Williams, P.J., et al., *Selective placental transport of maternal IgG to the fetus*. Placenta, 1995. **16**(8): p. 749-756.
14. Garner, S.F., et al., *Mononuclear phagocyte assays, AutoAnalyzer quantitation and IgG subclasses of maternal anti-RhD in the prediction of the severity of haemolytic disease in the fetus before 32 weeks gestation*. British Journal of Haematology, 1992. **80**(1): p. 97-101.
15. Nance, S.J., et al., *Correlation of IgG subclass with the severity of hemolytic disease of the newborn*. Transfusion, 1990. **30**(4): p. 381-382.
16. Župańska, B., et al., *Serological and Immunological Characteristics of Maternal Anti-Rh(D) Antibodies in Predicting the Severity of Haemolytic Disease of the Newborn*. Vox Sanguinis, 1989. **56**(4): p. 247-253.

17. Shepard, S.L., et al., *Inhibition of the Monocyte Chemiluminescent Response to Anti-D-Sensitized Red Cells by FcγRI-Blocking Antibodies Which Ameliorate the Severity of Haemolytic Disease of the Newborn*. Vox Sanguinis, 1996. **70**(3): p. 157-163.
18. Dooren, M.C., et al., *Protection against immune haemolytic disease of newborn infants by maternal monocyte-reactive IgG alloantibodies (anti-HLA-DR)*. The Lancet, 1992. **339**(8801): p. 1067-1070.
19. Hadley, A.G., *A Comparison of in Vitro Tests for predicting the Severity of Haemolytic Disease of the Fetus and Newborn* Vox Sanguinis, 1998. **74**: p. 375-383.
20. M., H., et al., *Haemolytic disease of the fetus and newborn*. Vox Sanguinis, 2015. **109**(2): p. 99-113.
21. Marion Reid, C.L.-F., Martin Olsson, *The Blood Group Antigen Factsbook 3rd Edition*, A. Press, Editor. 2012.
22. Vaughan, J.I., et al., *Inhibition of Erythroid Progenitor Cells by Anti-Kell Antibodies in Fetal Alloimmune Anemia*. New England Journal of Medicine, 1998. **338**(12): p. 798-803.
23. Vaughan, J.I., et al., *Erythropoietic suppression in fetal anemia because of Kell alloimmunization*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1994. **171**(1): p. 247-252.
24. Li, L., et al., *Prenatal treatment of severe fetal hemolytic disease due to anti-M alloimmunization by serial intrauterine transfusions*. Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2017. **56**(3): p. 379-381.
25. Wikman, A., et al., *Fetal hemolytic anemia and intrauterine death caused by anti-M immunization*. Transfusion, 2007. **47**(5): p. 911-917.
26. T., I.Y.M.S.C.Y.K., *Successful Treatment of Extremely Severe Fetal Anemia due to Anti-Jra Alloimmunization*. Fetal Diagnosis and Therapy, 2006. **21**: p. 269-271.
27. Adam, S. and H. Lombaard, *Autologous intrauterine transfusion in a case of anti-U*. Transfusion, 2016. **56**(12): p. 3029-3032.
28. Taylor, A.M. and G.J. Knighton, *A case of severe hemolytic disease of the newborn due to anti-Verweyst (Vw)*. Transfusion, 1982. **22**(2): p. 165-166.
29. BROSSARD, Y., *Transfusion sanguine : une approche sécuritaire*.
30. Markham, K.B., et al., *Hemolytic disease of the fetus and newborn due to multiple maternal antibodies*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2015. **213**(1): p. 68.e1-68.e5.
31. Huguët-Jacquot, S., et al., *Diagnostic et suivi biologiques des allo-immunisations anti-érythrocytaires chez la femme enceinte*. Revue Francophone des Laboratoires, 2015. **2015**(470): p. 73-80.
32. Mannessier, L., *Suivi immunohématologique des femmes enceintes : nouvelles recommandations*. Transfusion Clinique et Biologique, 2009. **16**(2): p. 195-200.
33. *Arrêté du 15 mai 2018 fixant les conditions de réalisation des examens de biologie médicale d'immuno-hématologie érythrocytaire*. 2018, Journal Officiel de la République Française
34. Bowell, P., et al., *Maternal anti-D concentrations and outcome in rhesus haemolytic disease of the newborn*. British Medical Journal (Clinical research ed.), 1982. **285**(6338): p. 327-329.

35. Toly-Ndour, C., et al., *Clinical input of anti-D quantitation by continuous-flow analysis on autoanalyzer in the management of high-titer anti-D maternal alloimmunization*. Transfusion, 2018. **58**(2): p. 294-305.
36. Garratty, G. and S.J. Nance, *Correlation between in vivo hemolysis and the amount of red cell-bound IgG measured by flow cytometry*. Transfusion, 1990. **30**(7): p. 617-621.
37. G., H.A., et al., *Correlation of serological, quantitative and cell - mediated functional assays of maternal alloantibodies with the severity of haemolytic disease of the newborn*. British Journal of Haematology, 1991. **77**(2): p. 221-228.
38. S.F., G., et al., *Prediction of the Severity of Haemolytic Disease of the Newborn: Quantitative IgG Anti - D Subclass Determinations Explain the Correlation with Functional Assay Results*. Vox Sanguinis, 1995. **68**(3): p. 169-176.
39. Derek, F., et al., *Quantitative and functional assessment of anti - RhD: a comparative study of non - invasive methods in antenatal prediction of Rh hemolytic disease*. Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica, 1996. **75**(2): p. 102-107.
40. Lo, Y.M.D., et al., *Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum*. The Lancet, 1997. **350**(9076): p. 485-487.
41. Mari, G., et al., *Noninvasive Diagnosis by Doppler Ultrasonography of Fetal Anemia Due to Maternal Red-Cell Alloimmunization*. New England Journal of Medicine, 2000. **342**(1): p. 9-14.
42. Mari, G., et al., *Flow velocity waveforms of the vascular system in the anemic fetus before and after intravascular transfusion for severe red blood cell alloimmunization*. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 1990. **162**(4): p. 1060-1064.
43. Mari, G., *Middle Cerebral Artery Peak Systolic Velocity*. Journal of Ultrasound in Medicine, 2005. **24**(5): p. 697-702.
44. Rigal, D., et al., *Les allo-immunisations fœto-maternelles anti-érythrocytaires : état de l'art en 2008*. Revue Francophone des Laboratoires, 2008. **2008**(402): p. 51-62.
45. Canlorbe, G., et al., *Management of Very Early Fetal Anemia Resulting From Red-Cell Alloimmunization Before 20 Weeks of Gestation*. Obstetrics & Gynecology, 2011. **118**(6): p. 1323-1329.
46. Joseph, S., et al., *Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice -Evidence - Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Seventh Special Issue*. Journal of Clinical Apheresis, 2016. **31**(3): p. 149-338.
47. Diamond, L.K., F.H. Allen, and W.O. Thomas, *Erythroblastosis Fetalis*. New England Journal of Medicine, 1951. **244**(2): p. 39-49.
48. C. Toly-Ndour, S.H.-J., H. Delaby, E. Maisonneuve, JM. Jouannic, A. Cortey, A. Mailloux, *Usual and unusual specificities of red blood cells antibodies causing fetal anemia: a ten years retrospective study by the French National Reference Center of Perinatal Hemobiology 2018: ISBT congress*
49. Françoise Flourié, S.D., Murielle Fay, Olivier Garraud, *Recherche d'anticorps irréguliers: le suivi du taux de résultats faussés positifs est un indicateur qualité*. Annales de biologie clinique, 2011. **69**(n°4).

50. Clark, D., M.A. Greiss, and S.J. Urbaniak, *A prospective study of routine antenatal enzyme antibody screening demonstrates lack of clinical value in predicting haemolytic disease of the newborn*. British Journal of Haematology, 1999. **106**(3): p. 824-826.
51. *Arrêté du 26 avril 2002 (JO du 4 mai 2002) modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale*.
52. Wu, K.H., et al., *Haemolytic disease of the newborn due to maternal irregular antibodies in the Chinese population in Taiwan*. Transfusion Medicine, 2003. **13**(5): p. 311-314.
53. J, W., et al., *Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy*. Transfusion Medicine, 2016. **26**(4): p. 246-263.
54. John, J.W., *Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology, revisited*. Transfusion, 2001. **41**(11): p. 1445-1452.
55. Koelewijn, J.M., et al., *Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands*. Transfusion, 2008. **48**(5): p. 941-952.
56. Slootweg, Y., et al., *Third trimester screening for alloimmunisation in Rhc-negative pregnant women: evaluation of the Dutch national screening programme*. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 2016. **123**(6): p. 955-963.
57. Pahuja, S., et al., *The prevalence of irregular erythrocyte antibodies among antenatal women in Delhi*. Blood Transfus, 2011. **9**(4): p. 388-93.
58. Lee, C.K., et al., *Prevalence and specificity of clinically significant red cell alloantibodies in Chinese women during pregnancy – a review of cases from 1997 to 2001*. Transfusion Medicine, 2003. **13**(4): p. 227-231.
59. Lin-Chu, M., R.E. Broadberry, and F.J. Chang, *The distribution of blood group antigens and alloantibodies among Chinese in Taiwan*. Transfusion, 1988. **28**(4): p. 350-352.
60. Daniels, G., *Human Blood Group, 3rd edition*, in *Human Blood Group, 3rd edition*, Wiley-Blackwell, Editor. 2013. p. 194.
61. Daniels, G., *Human blood groups, 3rd edition*, in *Human blood groups, 3rd edition*, Wiley-Blackwell, Editor. 2013. p. 283.
62. Keramati, M.R., et al., *Blood group antigens frequencies in the northeast of Iran*. Transfusion and Apheresis Science, 2011. **45**(2): p. 133-136.
63. Shahverdi, E., M. Moghaddam, and F. Gorzin, *Maternal red blood cell alloantibodies identified in blood samples obtained from Iranian pregnant women: the first population study in Iran*. Transfusion, 2017. **57**(1): p. 97-101.
64. Rimon, E., et al., *Management of Kell isoimmunization — evaluation of a Doppler-guided approach*. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 2006. **28**(6): p. 814-820.
65. Slootweg, Y.M., et al., *Predicting anti-Kell-mediated hemolytic disease of the fetus and newborn: diagnostic accuracy of laboratory management*. American Journal of Obstetrics & Gynecology.
66. G., B.D., et al., *Antenatal monitoring of anti - D and anti - c: could titre scores determined by column agglutination technology replace continuous flow analyser quantification?* Transfusion Medicine, 2013. **23**(1): p. 36-41.

67. Cécile, T.N., et al., *Clinical input of anti - D quantitation by continuous - flow analysis on autoanalyzer in the management of high - titer anti - D maternal alloimmunization*. *Transfusion*, 2018. **58**(2): p. 294-305.
68. *Laboratory Procedures for the Prediction of the Severity of Haemolytic Disease of the Newborn*. *Vox Sanguinis*, 1995. **69**(1): p. 61-69.
69. Z., N.M.C., et al., *Comparison of conventional tube test with diamed gel microcolumn assay for anti - D titration*. *Clinical & Laboratory Haematology*, 2003. **25**(5): p. 311-315.
70. A. Mailloux, M.D., V. Zorayan, S. Huguët-Jacquot, M. Larsen, B. Carbonne, A. Cortey, *Tentative de corrélation de deux techniques de titrage des anticorps anti-érythrocytaires chez la femme enceinte immunisée*. 2011: Congrès de la SFTS
71. Rachel, F., et al., *Comparison of a gel microcolumn assay with the conventional tube test for red blood cell alloantibody titration*. *Transfusion*, 2013. **53**(4): p. 811-815.
72. Jørgensen, J., et al., *The Influence of Ionic Strength, Albumin and Incubation Time on the Sensitivity of the Indirect Coombs' Test*. *Vox Sanguinis*, 1979. **36**(3): p. 186-191.
73. Daniels, G., *Human Blood Groups, 3rd edition*, Wiley-Blackwell, Editor. 2013. p. 205.
74. AuBuchon, J.P., J.d. Wildt-Eggen, and L.J. Dumont, *Reducing the Variation in Performance of Antibody Titrations*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2008. **132**(7): p. 1194-1201.
75. Bachegowda, L.S., et al., *Impact of Uniform Methods on Interlaboratory Antibody Titration Variability: Antibody Titration and Uniform Methods*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2017. **141**(1): p. 131-138.

LE SERMENT D'HIPPOCRATE

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans discrimination. J'interviendrai pour les protéger si elles sont vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance.

Je donnerai mes soins à l'indigent et je n'exigerai pas un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement la vie ni ne provoquerai délibérément la mort.

Je préserverai l'indépendance nécessaire et je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je perfectionnerai mes connaissances pour assurer au mieux ma mission. Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé si j'y manque.

TITRE

Titration des anticorps anti-érythrocytaires : place dans le suivi des allo-immunisations fœto-maternelles, comparaison de méthodes, et étude de robustesse de la technique de référence.

RESUME

INTRODUCTION : L'incompatibilité fœto-maternelle érythrocytaire hors système ABO touche environ 1/1000 naissances. L'anti-D (RH1), l'anti -K (KEL1) et l'anti-c (RH4) sont responsables de l'essentiel des formes sévères d'expression anténatale. La mise en place d'une surveillance échographique fœtale dépend du taux maternel d'anticorps, et le titrage est la méthode de quantification la plus accessible.

MATERIEL ET METHODE : D'une part, nous avons réalisé deux enquêtes, une auprès des laboratoires français, et une auprès des membres d'un groupe de travail international sur le suivi immuno-hématologique de la femme enceinte. D'autre part, nous avons procédé à une comparaison de différentes méthodes de titrage pour les 3 anticorps cités précédemment, et réévalué la robustesse de la technique de référence en tube pour l'anti-D, souvent décriée pour son manque de reproductibilité.

CONCLUSION : Les résultats des enquêtes confirment la 1^{ère} place du titrage. En France, le dosage pondéral plus précis lui est néanmoins associé pour les anticorps du système Rh. A l'échelle internationale, la technique de titrage en carte gel IgG prend de l'ampleur. La comparaison des techniques de titrage en tube, carte gel neutre et carte gel IgG révèle des titres plus élevés en technique carte gel IgG, mais l'amplitude des écarts et leur variabilité rendent difficile l'extrapolation simple des résultats d'une technique à l'autre. Quant à la robustesse de la technique en tube, nos résultats corroborent la précision à une dilution près de la technique ; le facteur critique est la variabilité inter-opérateur qu'il est toutefois possible de minimiser.

MOTS-CLES

Titration des anticorps anti-érythrocytaires ; quantification des anticorps anti-érythrocytaires ; maladie hémolytique du fœtus et/ou du nouveau-né ; incompatibilité fœto-maternelle érythrocytaire ; anti-D ; suivi immuno-hématologique de la femme enceinte.

TITLE

Red cell antibody titration: place in the follow-up of alloimmunization in pregnancy, comparison of methods, and study of robustness of the reference tube test.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Out of the ABO system, alloimmunization in pregnancy affects approximately 1/1000 births. Anti-D (RH1), anti K (KEL1), and anti-c (RH4) are responsible for the majority of severe forms that develop before birth. The implementation of a fetal ultrasound monitoring depends on the antibody maternal rate, and titration is the most accessible quantitation assay.

MATERIAL AND METHOD: On haematological follow-up in pregnancy, we conducted two surveys, one was sent to French laboratories, and one to the members of an international task force. In addition, we proceeded to a comparison of various methods of titration for the 3 previously quoted antibodies, and revalued the robustness of the reference method (tube technique) for anti-D, often criticized for its lack of reproducibility.

CONCLUSION: The results of investigations confirm antibody titration as the first-line test. In France, quantitation by continuous flow analysis is more precise but associated with titration for Rh system antibodies. Titration by IgG column agglutination methods expands worldwide. The comparison of titration between different available methods (tube, neutral column agglutination cards, and IgG column agglutination cards) reveals higher titers with IgG column agglutination test, but the simple projection of the results from a technique to another is difficult because of the amplitude of disparities and their variability. Concerning the robustness of the conventional tube test, our results confirm that the precision is about one dilution; the critical factor is the inter-operator variability that, however, appears possible to minimize.

KEYWORDS

Antibody titration ; red cell antibody quantitation ; fetal-maternal incompatibility ; maternal red-cell alloimmunization ; haemolytic disease of the fetus and newborn ; anti-D ; immunohaematological follow-up in pregnancy.