



HAL
open science

**Validation d'une méthode de recherche d'anticorps
érythrocytaires anti-RH1 en microtitrage à
l'Établissement Français du Sang Auvergne-Rhône-Alpes**
Edouard Bonneville

► **To cite this version:**

Edouard Bonneville. Validation d'une méthode de recherche d'anticorps érythrocytaires anti-RH1 en microtitrage à l'Établissement Français du Sang Auvergne-Rhône-Alpes. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03280608

HAL Id: dumas-03280608

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03280608>

Submitted on 7 Jul 2021

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

Année : 2021

VALIDATION D'UNE METHODE DE RECHERCHE D'ANTICORPS
ERYTHROCYTAIRES ANTI-RH1 EN MICROTITRAGE A
L'ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG AUVERGNE-RHÔNE-ALPES

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
SPECIALITÉ : BIOLOGIE MÉDICALE

Par M. Edouard BONNEVILLE

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE

Le : 24/06/2021

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président du jury :

M. le Professeur Pascal MOSSUZ (tuteur universitaire)

Membres :

Mme le Docteur Claudine GIROUX-LATHUILE (directrice de thèse)

Mme le Docteur Cécile HELMER

Mme le Docteur Catherine THONG-VANH

Mme le Docteur Laurence DELUGIN

L'UFR de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

ENSEIGNANTS - CHERCHEURS Année 2020 / 2021

Doyen de la Faculté - **Pr. Michel SEVE**
Vice-Doyen et Directrice des Etudes - **Mme Christine DEMEILLIERS**
Vice-Doyen Recherche – **Pr. Walid RACHIDI**

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE	TELEPHONE	HDR
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx	04 76 63 74 73	oui
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheMAS	04 76 76 54 96	oui
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	04 76 04 10 10 / 04 76 04 10 02	
CDD	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheMAS	04 56 52 00 92	
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055	04 76 63 58 20 / 06 75 55 35 01	
PU-PH	BEDOUCHE	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheMAS	04 76 76 54 97	oui
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042	04 76 63 71 08	
MAST	BELLET	BEATRICE	-		
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 12	
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 11 / 06 17 35 77 65	
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823		
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA	04 38 78 56 01 / 04 76 63 74 73 / 06 37 51 20 74	
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042	04 76 63 74 75	
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS	04 57 42 87 41	oui
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309	06 32 39 37 65	oui
Professeur Emérite	CALOP	JEAN			
MCF	CAVAILLES	PIERRE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	04 76 63 74 72 / 06 88 16 54 43	
MCU-PH	CHANOINE	SEBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309	04 76 76 54 97 (CHU) / 04 76 54 94 66 (IAB)	
AHU	CHEVALIER	SIMON	TIMC IMAG		
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 01	
MCU-PH	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 52 99	
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx	04 76 63 74 39	oui
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT	-	06 74 88 07 26	
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 17	
MCF Emérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON	06 80 23 45 34	
MCF	DEMEILLERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	04 76 63 71 38	oui
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408	04 76 76 72 01	oui
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	06 15 11 79 97	

Mise à jour le 12/10/2020 Sana HACHANI

MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	04 57 42 85 19	oui
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042		oui
MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042	04 76 76 71 66	oui
PRCE	FITE	ANDREE	-	06 33 79 01 95	
MCU-PH	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	04 76 76 54 90	
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-	04 76 63 53 19	
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	04 76 76 56 04	oui
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 01	oui
MCF Émérite	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 74 58 / 06 33 12 90 73	
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042	04 76 63 75 63 / 06 33 48 97 10	oui
Professeure Émérite	GRILLOT	RENEE	-	06 62 11 37 04	
MCF Émérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 05	
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 52 97	
CDD	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	04 76 76 78 86	
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055	06 30 36 62 56 / 04 76 63 57 36	oui
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	04 76 04 10 10	
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR S1042	04 76 63 75 18	
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 75 17	oui
AHU	LEENHARDT	JULIEN	INSERM – U1039		
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	04 76 63 74 39	oui
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	04 56 52 00 95	oui
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-		
MCF	MELO DI LIMA	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553		
AHU	MINOVES	MELANIE	HP2 – INSERM U1042		
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055	04 76 51 44 90	oui
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209	04 76 76 54 87	
MCF	MOUHAMEDOU	BELLO	LECA – UMR 5553 CNRS	04 76 63 54 41	oui
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 21	oui
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 52 97	
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS	07 86 11 77 53 /04 76 63 53 13	oui
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 52 95	oui
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 53 04	oui
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR 5525 CNRS, THEMAS	04 76 76 79 54	
PU	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA	04 38 78 50 11	oui
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS	06 85 92 00 79	oui
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042	06 71 11 49 20	oui

PAST	RIEU	ISABELLE	-	-	
Professeure Émérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	-	04 76 63 71 31	
PU-PH	SEVE	MICHEL	LBFA – INSERM U1055	04 76 63 71 72	oui
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 52.94	
MCF	SPANNO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	04 57 42 85 64	
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	04 57 42 86 60	
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR 5063 CNRS	04 76 63 52 94	
MCF	WARTHER	DAVID	DPM	04 76 63 53 00	
Professeur Émérite	WOUESSIDJEWÉ	DENIS	-	-	oui

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire
 ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
 BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
 CHU : Centre Hospitalier Universitaire
 CIB : Centre d'Innovation en Biologie
 CRI : Centre de Recherche INSERM
 CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
 DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
 DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
 HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
 IAB : Institute for Advanced Biosciences
 IBS : Institut de Biologie Structurale
 LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
 LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
 LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
 LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
 LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
 LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique
 LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
 MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel
 MCF : Maître de Conférences des Universités
 MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
 PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
 PRAG : Professeur Agrégé
 PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
 PU : Professeur des Universités
 PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
 SYMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé
 TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
 UMR: Unité Mixte de Recherche
 UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Remerciements

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements :

➤ **A Monsieur le Professeur Pascal Mossuz,**

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury et d'avoir bien voulu juger ce travail. Merci également pour le temps que vous m'avez consacré durant mon parcours d'internat.

➤ **A Madame le Docteur Claudine Giroux-Lathuile,**

Merci de votre accueil durant mon semestre à l'EFS, de m'avoir permis de travailler le sujet très enrichissant de cette thèse et de votre encadrement pendant ce travail.

➤ **A Madame le Docteur Laurence Delugin,**

En vous remerciant d'avoir pris le temps de participer au jury de cette thèse.

➤ **A Madame le Docteur Cécile Helmer,**

Merci pour ta bienveillance et ton soutien durant le semestre, et pour ton aide pour ce travail.

➤ **A Madame le Docteur Catherine Thong-Vanh,**

Merci d'avoir pris le temps de participer au jury de cette thèse.

➤ **A Madame le Docteur Sophie Anselme-Martin,**

Merci pour tes conseils avisés et ton don littéraire très apprécié pour ce travail.

➤ **A l'équipe du laboratoire d'immunohématologie de l'EFS de Grenoble,**

Nathalie & Nathalie, Audrey & Audrey, Flavien, Nicolas, Pascale, Christine, Florence et bien d'autres. Merci pour votre accueil chaleureux, votre bonne humeur et votre travail. Bonne continuation à tous !

➤ **A Madame le Docteur Marie-Christine Jacob,**

Merci pour le temps que vous m'avez laissé à travailler sur ce projet.

Et plus personnellement, je souhaite exprimer des remerciements :

➤ *A Audrey Mappa, ma partenaire dans ce projet,*

Merci pour ton investissement, ta bonne humeur et toutes tes qualités qui font que les journées de travail avec toi semblaient trop courtes. Je te souhaite le meilleur pour la suite !

➤ *A mes parents,*

Merci pour votre soutien moral et professionnel au fil des années. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir réorienté quand il fallait. En espérant vous rendre fier autant que vous me rendez fier !

➤ *A ma sœur, ma choose,*

Merci pour les 27 années de souvenirs en ta compagnie. Encore beaucoup d'albums photos et de puzzles à venir. Merci également à ton mari François, ton fils Raphaël, et ton bébé-chien Noupi, de rendre ta vie plus belle.

➤ *A Maxime, Clémentine, Juliette et Alexandre,*

Merci pour tous les moments partagés, anciens et futurs. Ces années à Grenoble sont formidables grâce à vous. Je vous souhaite le meilleur, à tous et à chacun(e) !

➤ *A mes amis et co-internes, Tic & Tac, Laura, Joris, Capucine, Arthur, Laurie, Elodie*

➤ *A toute ma famille*

Table des matières

Remerciements	4
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	11
Liste des principales abréviations	13
Introduction	14
Partie 1 : Synthèse bibliographique	16
1. Physiopathologie de l'Incompatibilité foëto-maternelle érythrocytaire (IFME)	16
1.1. Étiologie de l'IFME	16
1.1.1. Le système Rhésus	16
1.1.2. L'IFME : définition et épidémiologie	17
1.1.3. L'hémorragie foëto-maternelle (HFM)	18
1.1.4. Quels facteurs de risques d'IFME ?	18
1.2. La Maladie Hémolytique Foëtale et Néonatale (MHFN)	20
1.2.1. Rappels sur l'hémolyse	20
1.2.2. De la MHN à la MHFN	21
1.2.3. Caractéristiques des anticorps pour un passage transplacentaire	22
1.2.4. Spécificité des anticorps	23
2. Prise en charge d'une IFME à risque de MHFN	26
2.1. Suivi de la grossesse en IHE	26
2.1.1. Aspects règlementaires	26
2.1.2. La Recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAE)	28
2.1.3. Le groupage sanguin foëtal	29
2.2. Prise en charge d'une allo-immunisation maternelle.....	31
2.2.1. Impact d'une allo-immunisation dans le suivi de la grossesse.....	31
2.2.3. Le titrage d'anticorps.....	33
2.2.4. Le dosage pondéral d'anticorps	35
2.2.5. Prise en charge foëtale.....	38
2.2.6. Prise en charge néonatale	40
3. Prévention d'une immunisation anti-RH1(D).....	42
3.1. Historique de la stratégie préventive en France	42
3.2. L'immunoglobuline anti-RH1(D) (Ig anti-RH1(D))	44

3.2.1. Présentation du médicament	44
3.2.2. Pharmacocinétique	45
3.2.3. Indications du Rhophylac® en France	47
3.3. Adapter la dose d'Ig anti-RH1(D)	48
3.3.2. Le Test de Kleihauer	48
3.3.3. Adaptation posologique de l'immunoglobuline anti-RH1.....	50
3.4. Anticorps immun ou anticorps passif ?.....	51
3.5. Quel seuil d'Ig anti-RH1(D) pour protéger d'une allo-immunisation ?.....	52
Partie 2 : Données expérimentales	54
1. Objectifs	54
2. Matériel et méthodes	55
2.1. Echantillons	55
2.2. Support microfiltration	57
2.3. Hématies tests utilisées dans le microtitrage	58
2.4. Etalon anti-RH1(D)	60
2.4.1. Description.....	60
2.4.2. Dosage pondéral par un AutoAnalyser	60
2.5. Recherche d'anticorps érythrocytaire (RAE)	61
2.6. Microtitrage d'anticorps anti-RH1(D)	62
2.6.1. Principe	62
2.6.2. Technique	63
2.6.3. Interprétation	63
2.7. Analyse statistique	64
3. Résultats.....	65
3.1. Choix du support microfiltration	65
3.2. Validation de la méthode sur carte gel IgG Biorad®	67
3.2.1. Répétabilité.....	67
3.2.2. Test de reproductibilité.....	68
3.2.3. Spécificité et interférences.....	69
3.2.4. Sensibilité et limite de détection	71
3.2.5. Robustesse.....	75
4. Discussion.....	78
5. Conclusion	84

Bibliographie	87
ANNEXE I : Circonstances pouvant induire des hémorragies foëto-maternelles au cours de la grossesse	92
ANNEXE II : Image des tests de comparaison des 3 types de support microfiltration	93
ANNEXE III : Protocole de validation de méthode du microtitrage	96
Serment de Galien	100
Résumé de la thèse	101

Liste des figures

Figure 1: Voie métabolique de la dégradation de l'hème et formation de la bilirubine d'après l'article de Phyllis et al (15)	20
Figure 2 : Répartition des anticorps à risque d'anémie foëtale sévère lors d'IFM (Poster SFTS présenté à l'ISBT en juin 2018 sur cohorte CRNHP du 01/07/2007 au 31/12/2016)	25
Figure 3: Résultats en technique tube (à gauche, positif du tube 01 au tube 06) / microplaque (au milieu, panel de dépistage Diagast® sur Qwalys®) / gel filtration (à droite, panel d'identification Grifols®, positifs dans les puits 04, 05 et 08)	28
Figure 4: Indications de génotypage RHD foëtale pour une femme enceinte selon qu'elle soit immunisée ou non contre l'antigène RH1(D) (Dr Mailloux, CNRHP, 2015)	30
Figure 5 : Conduite à tenir selon la spécificité de l'anticorps identifié en RAE lors d'une grossesse selon les recommandations du CNRHP en 2015	32

Figure 6: Résultat d'un titrage en technique tube (à gauche). Le titre retenu est l'inverse de la dilution du premier tube cotant « + » selon les critères de cotation d'intensité à droite.....	33
Figure 7 : Titres d'anti-D déterminés par technique tube conventionnelle (CTT), testés en gel où une variation du titre semble s'observer, repris de l'article de Novaretti et al (35)	34
Figure 8: Arbre décisionnel des grossesse avec allo-immunisation anti-RH1(D) d'après le Dr Mailloux (33)	35
Figure 9: Schéma d'un AutoAnalyseur d'hémagglutination en flux continu (Moore et al (37))	36
Figure 10 : Arbre décisionnel en cas de RAE positive lors d'une grossesse (SFTS 2017)	40
Figure 11: Facteurs influençant l'efficacité de la photothérapie pour corriger l'hyperbilirubinémie néonatal, selon l'article d'Academy et al (46)	41
Figure 12 : Fréquence des anticorps lors d'allo-immunisation fœto-maternelles pour 1000 échantillons selon les articles de la littérature repris dans l'article de Pal et al (53)	43
Figure 13: Moyenne (et écart-type) des concentrations sériques en IgG anti-D après injection de 300µg d'immunoglobulines anti-D à 28 SA de grossesse montrant des concentrations devenant comparables à partir de 2 semaines après administration de Rhophylac®, d'après l'article de Bichler et al (59)	46
Figure 14 : Image d'hématies adultes (roses pâles) et fœtales (magenta) au microscope optique après la coloration du Test de Kleihauer	49
Figure 15 : Concentration en anti-RH1 attendue à la suite d'une injection d'Ig anti-RH1(D) 300 µg faite à 28 SA en IV. La concentration en anti-RH1 diminue de moitié toutes les 3 semaines.	53
Figure 16 : Répartition des différents échantillons pour les tests de sensibilité, spécificité et interférences de la validation de méthode du microtitrage	56

Figure 17: Illustration du potentiel Zêta (source : site internet ToutSurLaTransfusion
<https://www.toutsurlatransfusion.com/immuno-hematologie/anticorps/potentiel-zeta.php>)
.....59

Figure 18: Principe d'interprétation d'un résultat de microtitrage anti-RH1(D). Exemple visuel
sur des cartes-gels IgG Biorad®. La concentration du patient en anticorps anti-RH1(D) est de
12 ng/mL selon cette méthode de microtitrage.62

Figure 19 : Photographies de support Biorad® testés avec 50µL d'hématies test et 25µL de
plasma par puit. La dilution du plasma, dans du plasma AB, est renseignée sur le puits. Les
puits du support de gauche contiennent un plasma identifiant un anticorps anti-RH4(c) en RAE
et sont d'intensité 4+. Les puits du support de droite contiennent le plasma d'un patient traité
activement par Daratumumab et sont d'intensité 2+ sans décroissance.....71

Figure 20 : Comparaison des concentrations mesurées en microtitrage avec les concentrations
théoriques d'après la date d'injection de Rhophylac® et la dose reçue : concentrations
visuellement similaires sans grande disparité. Concentration théorique souvent supérieure
visuellement à la concentration mesurée mais les HFM silencieuses ne peuvent être
renseignées73

Figure 21 : Coefficient de corrélation entre la concentration mesurée en microtitrage et la
concentration théorique attendue en anticorps anti-RH1(D) d'après les données
pharmacocinétiques des Ig anti-RH1(D). Le coefficient de corrélation "r" est de 0,97.74

Liste des tableaux

Tableau I : Spécificité des anticorps et le risque d'anémie sévère associé	24
Tableau II : Valeurs seuils critiques d'alerte des principaux anticorps à risque fœtal (40)	37
Tableau III : Recommandations pour la prise en charge des femmes enceintes RH:-1 et la prévention de l'allo-immunisation anti-RH1 (CNGOF, 2006)	43
Tableau IV : Adaptation de la dose d'immunoglobulines anti-D en fonction du volume d'HFM estimé par le test de Kleihauer (CNGOF, 2012)	50
Tableau V : Dénomination et image des 3 supports microfiltration testés, ainsi que la possibilité d'automatiser la technique sur un automate disponible à l'EFS AURA site de Grenoble.	57
Tableau VI : Concentrations sériques théoriques attendues en anti-RH1 passifs après administration d'IgRH1 (33)	64
Tableau VII : Intensités d'hémagglutination dans les puits de 3 supports microfiltrations testés (Biorad®, OCD®, Grifols®). Pour Grifols® et OCD® les réactions d'hémagglutination ne se négativent pas et la DDP n'est pas fixe. Pour le support Biorad®, la DDP est claire à la dilution 32 et l'intensité d'hémagglutination décroît au fil des puits jusqu'à se négativer.....	65
Tableau VIII : Résultats du test de répétabilité sur un étalon anti-RH1(D) dilué à 24 ng/mL : la dernière dilution positive est 32, l'intensité d'hémagglutination décroît au fil des dilutions et les puits à garder pour rester sur 1 carte à 6 puits sont les puits 2 à 64 (intensités 4+ à 0,5+/0)	67
Tableau IX : Résultats du test de reproductibilité sur étalon anti-RH1(D) dilué à 24 ng/mL : la dernière dilution positive est 32. Les variations de jour ou d'opérateur n'affectent pas le résultat	

du microtitrage. Le cadre de lecture de la dilution 2 à 64 utilisé 5 fois montre des intensités d'hémagglutination de 4+ à 0. (NR = Non Réalisé)68

Tableau X : Résultat des tests de spécificité et interférences du microtitrage. La présence d'un témoin auto positif en RAE, la fibrine, l'hémolyse, la lactescence, la congélation, un ATCD de traitement par Daratumumab arrêté depuis plus d'un an et la présence d'un anticorps anti-RH3(E) n'interfèrent pas avec le microtitrage. La présence d'un anticorps anti-RH4(c) et le traitement par Daratumumab interfèrent avec le microtitrage. (NR = Non-Rendu).....70

Tableau XI : Résultats de sensibilité du microtitrage. Les analyses sont positives malgré une RAE parfois négative, d'où l'importance des renseignements sur la date et la dose injectée.71

Tableau XII : Résultats du microtitrage pour les 8 patients connus avec un allo-anticorps anti-RH1(D) et présentant une RAE positive identifiant au anticorps anti-RH1(D). Tous les échantillons sont positifs en microtitrage.75

Tableau XIII : Résultats de stabilité d'un flacon d'hématies-tests à 2-8°C. Les intensités restent similaires jusqu'à J11 inclus. A J14, les intensités augmentent par puits, même si la dernière dilution positive reste 32.76

Tableau XIV : Stabilité d'échantillons à 2-8°C avec des microtitrages réalisés à J0, J4, J7 et J11. L'écart d'intensité par puits d'excède pas 1 et la dernière dilution positive reste identique..77

Liste des principales abréviations

AURA : Auvergne-Rhône-Alpes

CGR : Concentré de Globules Rouges

CNGOF : Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français

CNRHP : Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale

CSP : Code de la Santé Publique

DP : Dosage pondéral

EFS : Etablissement Français du Sang

HAS : Haute Autorité de Santé

IFM : Incompatibilité fœto-maternelle

Ig anti-RH1(D) : Immunoglobulines anti-RH1(D)

IHE : Immunohématologie érythrocytaire

LBM : Laboratoire de biologie médicale

MHFN : Maladie hémolytique fœtale et néonatale

OCD® : *Ortho Clinical Diagnostics®*

RAE : Recherche d'anticorps anti-érythrocytaires

RCP : Résumé des caractéristiques du produit

SA : Semaine d'aménorrhée

TIA : Test indirect à l'antiglobuline

Introduction

Le système Rhésus représente la première source d'incompatibilité transfusionnelle en France. Bien que présent uniquement au niveau érythroïde, certains antigènes de ce système sont fortement immunogènes, en particulier l'antigène RH1(D). En transfusion on estime qu'un patient dépourvu de cet antigène a 20% de risque de s'allo-immuniser par production d'anticorps anti-RH1 si on lui administre un concentré de globules rouges (CGR) RH:1(D+) (1). Si cette synthèse d'anticorps est bénigne pour l'hôte dans la plupart des cas, la grossesse reste une situation particulière. En effet, les allo-anticorps sont surtout des immunoglobulines de classe IgG pouvant passer la barrière fœto-placentaire (BFP). Si une femme enceinte RH:-1(D-) (environ 15% de la population caucasienne) possède des allo-anticorps anti-RH1(D), via une sensibilisation par transfusion antérieure ou grossesse précédente, ces derniers peuvent avoir des conséquences graves pour le fœtus s'il possède l'antigène RH1(D). On parle alors d'incompatibilité fœto-maternelle érythrocytaire (IFME), et, dans le cas de l'antigène RH1(D), il en découle un risque de maladie hémolytique fœtale et néonatale (MHFN) grave. La stratégie de suivi de grossesse actuellement préconisée en France est formalisée dans les Recommandations de Pratique Clinique (RPC) du Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF) et comprend, entre autres, des bilans d'immunohématologie érythrocytaire (IHE) réguliers. Des analyses IHE sont d'abord effectuées pour déterminer s'il existe un risque d'incompatibilité, et puis d'autres analyses sont à prévoir durant la grossesse selon si une IFME est avérée.

En France, une stratégie préventive ciblée est disponible en cas d'IFME impliquant l'antigène RH1(D) : l'utilisation d'immunoglobuline anti-RH1 (Ig anti-RH1(D)) si une femme RH:-1(D) attend un/des enfant(s) RH:1(D+). Ce médicament prévient la rencontre entre les

hématies fœtales et le système immunitaire (SI) maternel, en augmentant la vitesse d'élimination des hématies D+ complexées avec l'Ig anti-RH1(D). Cependant, son statut d'anticorps anti-RH1(D) de nature IgG ne le rend pas différenciable des anticorps produits lors d'une allo-immunisation. Et son utilisation proposée de manière systématique lors de situations à risque peut sembler paradoxale en raison de sa nature de médicament dérivé du sang (MDS).

Le travail présenté ici a pour objectif de mettre en place au LBM de l'Établissement Français du Sang Auvergne-Rhône-Alpes (EFS AURA) une technique permettant d'aider à répondre à ces problématiques : un microtitrage ou microdosage des anticorps anti-RH1(D). Cette analyse est conçue pour pouvoir rendre une valeur numérique de concentration en anticorps RH1(D) dans l'organisme qu'il est possible de comparer à des abaques basés sur la pharmacocinétique des Ig anti-RH1(D). Ainsi, ce test est en mesure de différencier un allo-anticorps d'un anticorps passif provenant de l'injection d'Ig anti-RH1(D), et peut permettre également de s'assurer qu'une femme enceinte non immunisée ayant reçu des Ig anti-RH1(D) est bien protégée. Dans ce dernier cas, lors d'une situation à risque d'hémorragie fœto-maternelle (HFM), le microtitrage pourra aider à déterminer si une nouvelle injection d'Ig anti-RH1(D) est nécessaire ou non.

Après un rappel des particularités IHE du suivi d'une femme enceinte RH:-1(D-), ce travail a pour objectifs la conception analytique de la méthode de microtitrage et la comparaison de différents supports microfiltration pour peut-être automatiser la technique. Des pistes d'indications du microtitrage sont aussi proposées d'après l'état actuel des connaissances sur cette analyse, les recommandations d'organismes nationaux et internationaux, et les autres techniques disponibles.

Partie 1 : Synthèse bibliographique

1. Physiopathologie de l'Incompatibilité fœto-maternelle érythrocytaire (IFME)

1.1. Étiologie de l'IFME

1.1.1. Le système Rhésus

Le système Rhésus (Rh) doit son nom au singe *Macacus rhesus* ayant permis la mise en évidence du premier antigène de ce système : l'antigène RH1 ou « D ». En 1939, Levine et Stetson mettent en évidence un anticorps après la réaction transfusionnelle sévère d'une femme de groupe sanguin O venant d'être transfusée par le sang de son mari (également de groupe O) juste après son accouchement. Le nouveau-né souffre d'anémie hémolytique. L'anticorps sérique présent chez la mère reconnaît les hématies de son mari et de son enfant, et agglutine 85% des sujets européens compatibles en ABO, d'où l'hypothèse que la mère se soit allo-immunisée contre l'antigène érythrocytaire de son fils, hérité de son mari. L'année suivante, grâce à des hématies de *Macacus rhesus*, Landsteiner et Wiener produisent un anticorps agglutinant 85% des hématies des donneurs de sang de New York, qu'ils nomment « anti-Rhésus ». Bien que finalement les deux anticorps étudiés soient différents, le nom « d'anticorps anti-Rhésus » est resté pour l'anticorps humain. De nombreux antigènes sont ensuite ajoutés à ce système (plus de 60 antigènes répertoriés aujourd'hui). En 1962, Rosenfield propose une nomenclature numérique attribuant un chiffre à chaque antigène (« RH1 » pour l'antigène D par exemple), et les études en biologie moléculaire des années 1980 ont permis de déterminer les bases génétiques des antigènes Rh : le gène *RHD* et le gène *RHCE* portés par le chromosome 1, codant respectivement pour les antigènes RH1(D) et RH2(C)/ RH3(E)/ RH4(c)/ RH5(e).

En France, on compte environ 1 à 1,1 millions de grossesses par an, incluant les grossesses vivantes, les fausses couches spontanées (FCS), les grossesses extra-utérines (GEU) et les interruptions médicales volontaires de grossesse (IMVG) entre autres (2). Environ 15% de la population caucasienne, 5% de la population africaine, 2% de la population indo-eurasienne et < 1% de la population chinoise est RH:-1 (2,3). Cela permet d'estimer environ 150 000 – 165 000 femmes RH:-1 enceintes chaque année en France dont 90 000 (environ 60%) porteuses d'un fœtus RH:1 (75 000 après 28SA) et donc en situation d'IFME et à risque d'allo-immunisation anti-RH1(D) en l'absence de prophylaxie.

1.1.2. L'IFME : définition et épidémiologie

L'incompatibilité foëto-maternelle érythrocytaire (IFME) est une situation où un conflit immunologique existe entre les antigènes érythroïdes du fœtus et le système immunitaire (SI) de la mère. Des hématies foëtales portant un antigène étranger d'origine paternelle passent dans la circulation maternelle lors de situations à risque (voir Annexe I) et le SI maternel est susceptible de produire en réponse un allo-anticorps contre cet antigène, immunisant ainsi la mère contre les globules rouges de son enfant. Ce dernier est alors à risque de développer une maladie hémolytique foëtale ou néonatale (MHFN). Le passage d'hématies foëtales dans le sang maternel se produit généralement lors d'HFM durant la grossesse. Si plus d'une centaine d'antigènes ont été impliqués dans les IFME, les plus fréquents sont ceux des systèmes Rhésus, Kell, Duffy, Kidd et MNS. Ils sont exclusivement érythrocytaires et bien développés chez le fœtus avant 6 semaines d'aménorrhée (SA) (4).

1.1.3. L'hémorragie fœto-maternelle (HFM)

L'hémorragie fœto-maternelle correspond au passage d'hématies fœtales dans la circulation maternelle durant la grossesse ou lors de l'accouchement (5). Si ce phénomène est connu depuis plus d'un siècle, ce n'est qu'en 1954 que Chown and al le démontrèrent avec des tests sérologiques (6), et, en 1957, l'équipe d'Enno Kleihauer énonce le principe du test éponyme, encore utilisé de nos jours en routine, pour quantifier ces globules rouges fœtaux (7). L'HFM peut survenir dès le premier trimestre (8), de manière spontanée ou induite par des gestes obstétricaux ou traumatiques (amniocentèse, version par manœuvre externe, ponction de sang fœtal).

1.1.4. Quels facteurs de risques d'IFME ?

Dans la population caucasienne, en dehors du système ABO, les antigènes les plus immunogènes sont, dans l'ordre : l'antigène RH1(D), KEL1(K), RH4(c) et RH3(E). Ainsi 3 de ces 4 antigènes proviennent du système Rh, et 1 du système Kell. Plusieurs études relèvent l'importance de la compatibilité ABO entre la mère et le fœtus (8–10). Selon Bowman, le risque d'allo-immunisation anti-Rh est d'environ 16% si le fœtus est compatible en ABO avec sa mère, contre 1,5-2% s'il ne l'est pas. L'hypothèse d'une prise en charge et élimination plus rapide des hématies fœtales dans le second cas est souvent retenue, permettant ainsi de limiter le risque d'immunisation (11).

L'immunogénicité des antigènes n'est pas le seul facteur de variabilité dans la survenue d'une allo-immunisation : la dose d'antigènes administrée, la densité antigénique sur les hématies et la génétique du patient sont aussi à prendre en compte. Ainsi, parce que le volume de sang fœtal lors d'une hémorragie fœto-maternelle (HFM) est plus faible que lors d'une

transfusion, la fréquence d'immunisation est plus faible lors d'une grossesse que lors d'une transfusion incompatible (3). Néanmoins, l'antigène KEL1(K) est estimé plus immunogène que les antigènes des systèmes Duffy ou Kidd, bien que sa densité antigénique érythrocytaire soit plus faible. La méthode de classification semble donc complexe et un facteur relatif au statut répondeur de chaque individu est sûrement à prendre en compte.

Par exemple, il a été relevé des titres plus élevés d'anticorps anti-RH1(D) pour des patientes HLA-DQB1*0201 (12), ou alors un risque d'allo-immunisation anti-RH1(D) durant la grossesse plus élevé pour une mère HLA-A3 (13). Cela peut interroger sur l'implication de facteurs génétiques relatifs au phénotype HLA des individus autour des situations d'IFME. Les individus de phénotype « D faible » issus de certaines variations du gène RHD, auraient un risque très faible, mais non nul, de s'allo-immuniser contre des hématies de phénotype RH:1(D+) (14). Certains scientifiques ont également noté que les protéines D et CcEe ont davantage d'acides aminés différents (35 aa) que les protéines C et c (4 aa). La finalité de l'argument est qu'un individu D- aurait plus de risques de s'immuniser par du sang D+ qu'un individu C- (et donc c+) par du sang C+, car, dans le second cas, le nombre d'aa différent est bien moindre (3).

Le risque principal d'une allo-immunisation est une conséquence clinique grave lors d'une grossesse suivante, ou transfusion ultérieure, impliquant une hémolyse. Dans le cas de la grossesse, le risque se situe chez le fœtus et le phénomène se nomme : maladie hémolytique fœtale et néonatale (MHFN).

1.2. La Maladie Hémolytique Foétale et Néonatale (MHFN)

1.2.1. Rappels sur l'hémolyse

L'hémolyse est un processus physiologique libérant l'hémoglobine dans la circulation sanguine. La molécule d'hème est ensuite dégradée par l'hème oxydase en monoxyde de carbone et biliverdine, elle-même métabolisée en bilirubine par la biliverdine reductase. Puis cette bilirubine non conjuguée se lie à l'albumine plasmatique pour être transportée jusqu'au foie où elle est conjuguée à un groupement glucuronosyl. Ce n'est qu'après cette étape que la bilirubine conjuguée peut être éliminée par les voies biliaires et les selles (voir Figure 1 issue de l'article de Phyllis and al (15)).

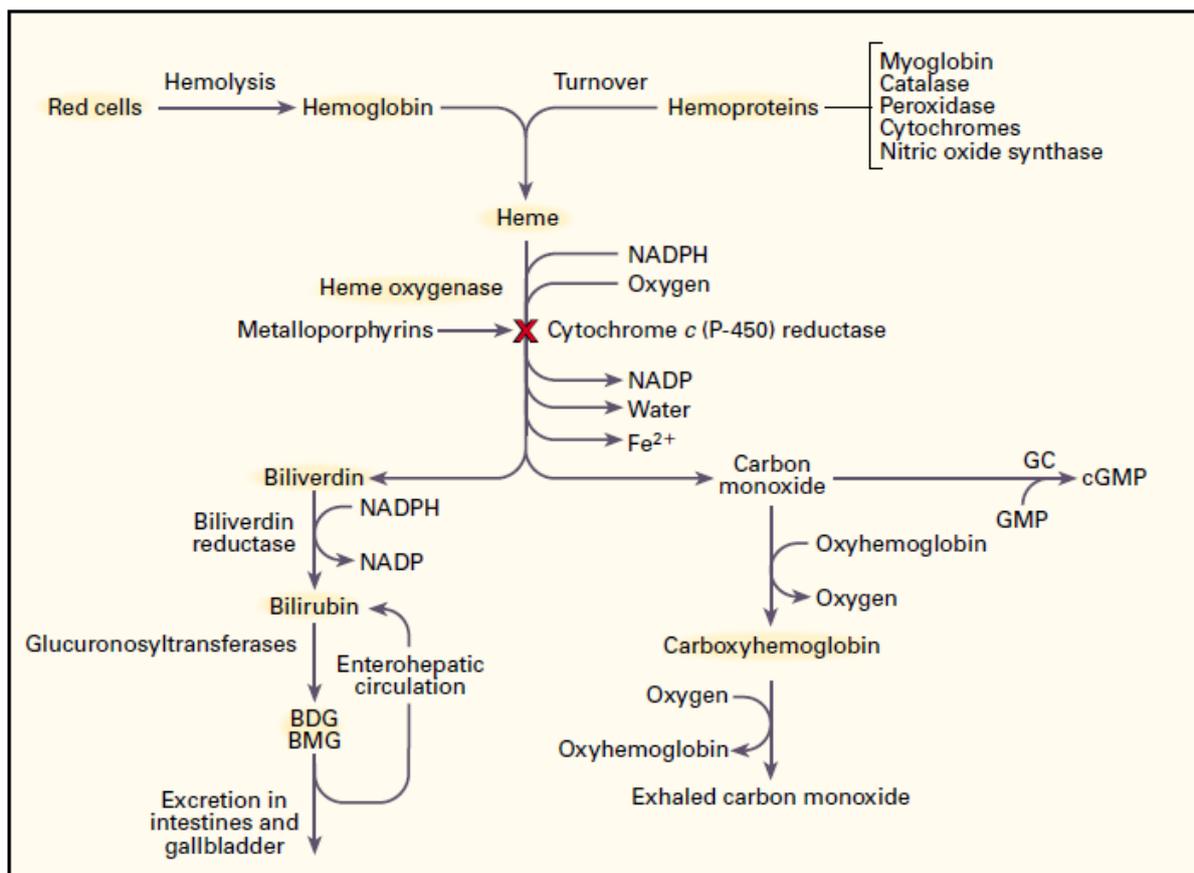


Figure 1: Voie métabolique de la dégradation de l'hème et formation de la bilirubine d'après l'article de Phyllis et al (15)

Chez le nouveau-né, un ictère physiologique peut avoir lieu durant les premiers jours de vie. En effet l'enzyme de conjugaison hépatique *UGT1A1 (Uridine Diphosphate Glucuronosyl Transferase)* prenant en charge la bilirubine liée à l'albumine n'est présente à la naissance qu'à environ 1% de sa concentration adulte, et augmente jusqu'à 100% en 14 semaines (16). Cela est couplé à une hémolyse importante les premiers jours de vie du fait d'une hémato-crite élevée et une durée de vie raccourcie des hématies à la naissance, entraînant un excès de bilirubine non conjuguée pouvant saturer l'albumine. L'excès de bilirubine sérique se distribue alors dans les tissus, dont la peau et les muqueuses, pour donner une coloration jaune au nouveau-né (ictère). Celle-ci est normalement réversible après la fin du pic d'hyperbilirubinémie à 1 semaine de vie environ (17). Le risque d'une hyperbilirubinémie prolongée et/ou de trop forte intensité réside surtout dans sa neurotoxicité. En effet, en cas de saturation de l'albumine, la bilirubine non liée passe la barrière hémato-encéphalique et peut entraîner un ictère nucléaire ou kernictère (15).

Dans le cas général d'une MHFN, les anticorps maternels accélèrent l'hémolyse causant, chez le fœtus, à la fois une anémie et une hyperbilirubinémie. Dans les formes les plus sévères, l'anémie fœtale résultante peut donner un état d'anasarque avec une mort fœtale *in utero*, ou une anémie néonatale avec hyperbilirubinémie néonatale rendant le nouveau-né ictérique et pouvant entraîner une encéphalopathie hyperbilirubinémie (ictère nucléaire) (18).

1.2.2. De la MHN à la MHFN

Le premier cas de maladie hémolytique périnatal a été décrit en 1609 par la sage-femme française Louise Bourgeois, concernant deux jumeaux présentant des symptômes

différents : l'un était hydropique et l'autre présentait l'équivalent actuel d'un ictère nucléaire (9). Ce n'est qu'en 1932 que l'hydrops fœtal, l'ictère grave et l'ictère nucléaire furent reliés en une même pathologie dénommée érythroblastose fœtale dont les premiers cas furent décrits chez le nouveau-né, d'où le nom de « maladie hémolytique du nouveau-né » (MHN ou MHNN). (4). Puis, de façon générale, le suivi de la grossesse par une équipe spécialisée a permis l'exploration de cette maladie au stade fœtal, et le nom est devenu « maladie hémolytique fœtale et néonatale » (MHFN) (19). Cette maladie correspond à une anémie hémolytique et survient des suites du passage d'allo-anticorps dirigés contre des antigènes fœtaux d'origine paternelle à travers le placenta, causant une hémolyse des globules rouges fœtaux (20), parfois complétée d'une inhibition de l'érythropoïèse fœtale dans le cas d'anticorps anti-KEL1(K) (21).

1.2.3. Caractéristiques des anticorps pour un passage transplacentaire

Les anticorps pouvant aboutir à une MHFN peuvent provenir d'une hétéro-immunisation « naturelle » (anti-A, anti-B) ou une allo-immunisation après transfusion ou HFM. Cependant, ils doivent être des immunoglobulines de classe G (IgG) qui sont les seules à pouvoir passer la barrière fœto-placentaire (BFP) et entraîner une hémolyse fœtale (22).

Le passage transplacentaire des IgG est un phénomène actif via les récepteurs FcRn placentaires. Ce phénomène initialement protecteur permet au fœtus d'obtenir une immunité passive pendant sa vie fœtale et ses premiers mois de vie, le temps que son propre système immunitaire soit fonctionnellement mature. Ce passage commence vers la fin du premier trimestre de grossesse dans l'espèce humaine, principalement sur les cellules du syncytiotrophoblaste, mais évolue linéairement en cours de la grossesse. De 5-10% des taux

d'IgG maternelles vers 17-22 SA, le fœtus finit par disposer de 120 à 130% des concentrations maternelles en anticorps à terme, preuve du caractère actif du transfert (23). Des quatre sous-classes d'IgG, les IgG1 et IgG4 passent le plus efficacement le placenta (22).

Les IgG1 et IgG3 sont les sous-classes responsables de maladies hémolytiques et les IgG1 entraîneraient des cas d'anémies plus sévères que les IgG3. Le transfert d'anticorps de la mère à l'enfant est proportionnel au taux d'immunoglobulines maternelles et à l'intégrité du placenta. Pour pouvoir entraîner une IFME, l'IgG doit également avoir une affinité suffisante pour l'antigène et pouvoir aussi activer les récepteurs Fc des macrophages. Ils sont aussi toujours actifs à +37°C (24).

1.2.4. Spécificité des anticorps

Lorsqu'une allo-immunisation est suspectée chez une femme enceinte, il est essentiel d'identifier l'anticorps impliqué car de sa spécificité va dépendre la gravité potentielle de l'immunisation (voir Tableau I). En effet certains anticorps ne peuvent entraîner une MHFN car ce sont des immunoglobulines de classe M (IgM) dont la structure pentamérique imposante empêche le passage de la BFP. D'autre part, certains antigènes sont encore absents des hématies au stade fœtal, ne permettant pas une immunisation maternelle en cas d'IFME. Les deux arguments précédents peuvent s'appliquer au système Lewis par exemple (24).

Concernant l'antigène RH1(D), on estime qu'il est développé au niveau des hématies fœtales dès le 30^{ème} jour de gestation et est donc théoriquement capable d'induire des hémolyses fœtales par allo-immunisation maternelle à partir de cette période (4).

Tableau I : Spécificité des anticorps et le risque d'anémie sévère associé

SPECIFICITE (Nomenclature traditionnelle)	SPECIFICITE (Nomenclature numérique)	MHNN	RISQUE D'ANEMIE FŒTALE < 6 g/dl (SA : semaines d'aménorrhée)	INCIDENCE DES CAS SYMPTOMATIQUES (pour 1 000 naissances)
Allo anticorps courants				
Anti-A	Anti-ABO1	OUI	NON	≈ 2
Anti-B	Anti-ABO2	OUI	NON	≈ 1
Anti-c	Anti-RH4	OUI	OUI (après 20 SA)	0.1
Anti-C	Anti-RH2	OUI	NON	< 0.1
Anti-Cw	Anti-RH8	OUI	NON	< 0.1
Anti-D	Anti-RH1	OUI	OUI (après 15 SA)	0.8
Anti-e	Anti-RH5	OUI	Exceptionnel	< 0.1
Anti-E	Anti-RH3	OUI	Rare (3 ^{ème} trimestre)	0.1
Anti-Fya	Anti-FY1	OUI	Exceptionnel	< 0.1
Anti-Fyb	Anti-FY2	OUI	NON	< 0.1
Anti-G	Anti-RH12	OUI	NON	< 0.1
Anti-H-HI (cibles A, B, AB)		NON	-	0
Anti-Jka	Anti-JK1	OUI	Exceptionnel	< 0.1
Anti-Jkb	Anti-JK2	OUI	NON	< 0.1
Anti-Kell	Anti-KEL1	OUI	OUI (après 15 SA)	0.05
Anti-Kpa	Anti-KEL3	OUI	Exceptionnel	< 0.1
Anti-Lewis	Anti-LE1, LE2	NON	-	0
Anti-Luthéran	Anti-LU1, LU2	NON	-	0
Anti-M	Anti-MNS1	OUI	Exceptionnel	< 0.1
Anti-N	Anti-MNS2	NON	-	0
Anti-P1		NON	-	0
Anti-S	Anti-MNS3	OUI	NON	< 0.1
Anti-s	Anti-MNS4	OUI	NON	< 0.1
Allo anticorps publics				
Anti-U	Anti-MNS5	OUI	Exceptionnel	< 0.1
Anti-Publics RH	Anti-RH17, 29,46	OUI	Exceptionnel	< 0.1
Anti-Publics KEL	Anti-KEL2, 4, 5,7	OUI	Exceptionnel	< 0.1
Auto Anticorps				
Auto agglutinines		NON	-	0
Auto papaine		NON	-	0

Le système ABO est le système le plus impliqué dans les MHFN, surtout dans le cas d'une mère O avec un fœtus A, AB ou B, mais donne rarement une maladie clinique. Les symptômes apparaissent le plus souvent en post-natal et ils n'incluent pas d'anémie fœtale sévère ni de prise en charge supplémentaire (11). Plus généralement, les anticorps immuns à risque d'hémolyse post-natale comprennent les anticorps anti-RH1(D), anti-KEL1(K), anti-RH4(c), anti-RH2(C), anti-RH8(Cw), anti-RH3(E), anti-RH5(e). Les trois premiers peuvent aussi entraîner une hémolyse *in utero* et anémie fœtale (24). Ce phénomène est très rare pour les allo-immunisation anti-RH3(E). Les anticorps anti-KEL1(K) ont également la particularité d'entraîner une baisse de l'hématopoïèse en recouvrant les précurseurs érythroïdes dans la moelle osseuse. Cela empêche la correction physiologique des anémies et peut avoir des conséquences cliniques lourdes, pas forcément bien corrélée aux titres de l'anti-KEL1(K) (25).

Si l'antigène RH1(D) est le premier antigène responsable d'IFME à risque de MHFN d'importance clinique, comme mis en évidence sur la Figure 2 ci-dessous, d'autres ont été décrits comme les antigènes KEL1(K), RH4(c), RH3(E), JK1(Jka), FY1(Fya) et RH2(C), ou encore des combinaisons d'antigènes avec en première ligne les antigènes RH1(D)+RH2(C) et les antigènes RH1(D)+RH3(E) (26).

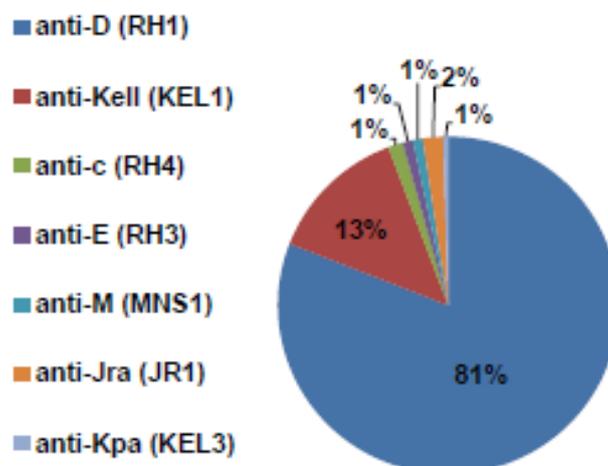


Figure 2 : Répartition des anticorps à risque d'anémie fœtale sévère lors d'IFM (Poster SFTS présenté à l'ISBT en juin 2018 sur cohorte CRNHP du 01/07/2007 au 31/12/2016)

2. Prise en charge d'une IFME à risque de MHFN

2.1. Suivi de la grossesse en IHE

Comme évoqué précédemment, environ 90 000 grossesses de femmes RH:-1 avec des fœtus RH:1 sont recensées chaque année en France. Lors de telles grossesses, deux situations biologiques peuvent se présenter : soit la femme enceinte est déjà immunisée et doit ainsi bénéficier d'un suivi spécialisé durant sa grossesse, comprenant titrages, dosages pondéraux réguliers de ses anticorps anti-RH1(D) et des explorations médico-techniques pour évaluer et prendre en charge une potentielle anémie fœtale ; soit la femme enceinte n'est pas immunisée et son suivi a alors pour but de prévenir son allo-immunisation.

La surveillance en immunohématologie érythrocytaire de la femme enceinte a ainsi 4 objectifs : dépister une allo-immunisation, surveiller son évolution, assurer la sécurité transfusionnelle et mettre en œuvre la prophylaxie de l'immunisation anti-RH1.

2.1.1. Aspects règlementaires

Les examens médicaux obligatoires durant la grossesse sont formalisés dans l'article R2122 du Code de la Santé Publique (CSP) et sont au nombre de sept pour une grossesse évoluant à son terme, selon la version du texte en vigueur depuis le 27 mai 2003 en France. Concernant l'IHE, l'article R2122-2 prévoit lors du premier examen prénatal, en cas de première grossesse, une détermination des groupes sanguins (A, B, O, phénotypes RH 1, 2, 3, 4, 5 et KEL1) si la patiente ne possède pas de carte de groupe sanguin complète (deux déterminations). C'est lors de ce premier examen, avant la fin du troisième mois de grossesse, que le phénotype Rh de la patiente doit être connu. Selon les RPC du CNGOF, si la mère est

RH:-1, elle doit recevoir une information sur l'immunisation anti-RH1(D) en termes de dépistage, suivi et prévention. A cette occasion, le phénotype RH:1 du conjoint est à documenter. Si l'on est en situation d'IFME impliquant l'antigène RH1(D), c'est-à-dire si le conjoint est RH:1(D+) ou inconnu, un génotypage fœtal est proposé, permettant de déterminer si une potentielle allo-immunisation anti-RH1 est à anticiper lors du suivi de la grossesse. Si tel est le cas, alors une prophylaxie par immunoglobulines anti-RH1(D) doit être proposée à la mère. En effet, il est maintenant recommandé en France de limiter cette prophylaxie aux seules femmes RH:-1 enceintes d'un fœtus RH:1.

Lors du premier examen prénatal, le CNGOF recommande également la réalisation d'une RAE. Si celle-ci est négative, une RAE de contrôle doit être réalisée au cours du sixième mois de grossesse, idéalement entre 26 et 28 SA. Si cette dernière est également négative et date de moins de 7 jours, une injection d'Ig anti-RH1(D) à 28SA est recommandée, après l'obtention du consentement de la patiente.

Le délai maximal de 7 jours entre la dernière RAE négative et l'injection d'Ig anti-RH1(D) n'est pas toujours respecté en pratique. Dans le cas, lors d'examens IHE ultérieurs où la RAE identifie un anticorps anti-RH1(D), le test de microtitrage développé ici peut être recommandé pour confirmer que la concentration d'Ig anti-RH1(D) retrouvée est en accord avec la date de l'injection. Cela permet de sécuriser l'absence d'immunisation avant injection d'Ig anti-RH1(D).

2.1.2. La Recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAE)

La RAE est un dépistage des anticorps dirigés contre les antigènes érythrocytaires (hors système ABO). Le plasma du patient est mis en contact d'hématies-tests de groupe sanguin O et de phénotypes sélectionnés et connus, en utilisant une technique d'hémagglutination comme le Test Indirect à l'Antiglobuline (TIA). Les anticorps de nature IgM (anticorps naturels irréguliers) sont naturellement agglutinants, mais les anticorps immuns IgG ne peuvent agglutiner seuls des hématies et nécessitent l'ajout dans le milieu réactionnel d'anticorps anti-IgG (antiglobuline) permettant de provoquer une agglutination macroscopique.

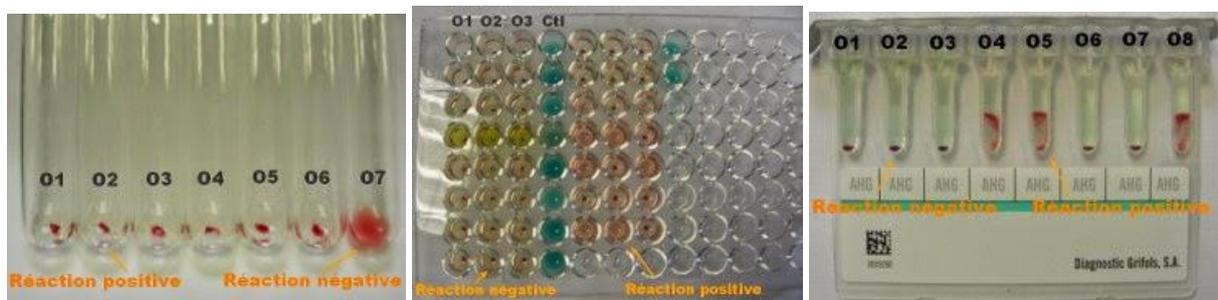


Figure 3: Résultats en technique tube (à gauche, positif du tube 01 au tube 06) / microplaque (au milieu, panel de dépistage Diagast® sur Qwalys®) / gel filtration (à droite, panel d'identification Grifols®, positifs dans les puits 04, 05 et 08)

Source : site internet ToutSurlatransfusion (<https://www.toutsurlatransfusion.com/immuno-hematologie/recherche-anticorps/realisation.php>)

Selon l'arrêté du 15 mai 2018, la RAE comporte 2 épreuves : une épreuve de dépistage utilisant 3 hématies-tests, et, en cas de positivité, une épreuve d'identification sur au moins 10 hématies-tests. La composition des panels d'hématies-tests est règlementé pour pouvoir mettre en évidence les anticorps dirigés contre les antigènes RH1(D), RH2(C), RH3(E), RH4(c), RH5(e), KEL1(K), KEL2(k), KEL4(Kpb), FY1(Fya), FY2(Fyb), JK1(Jka), JK2(Jkb), MNS1(M), MNS2(N), MNS3(S), MNS4(s), LE1(Lea), LE2(Leb), P1(P1), LU2(Lub) en épreuve de dépistage et, en plus, les anticorps dirigés contre les antigènes RH8(Cw), KEL3(Kpa) et LU1(Lua) en épreuve d'identification. Cela comprend ainsi les anticorps à incidence obstétricale et

transfusionnelle. Pour confirmer la spécificité d'un anticorps identifié en RAE, elle doit être présente sur au moins 3 hématies présentant l'antigène correspondant et absente sur au moins 3 hématies dépourvues de l'antigène. Des panels complémentaires d'hématies-tests sont généralement disponibles si besoin en laboratoire.

Une RAE a un délai de validité de 72h précisément, pouvant être étendue à 21 jours sur dérogation médicale en cas d'absence de transfusion, de greffe et de grossesse dans les 6 derniers mois. Pilier de la sécurité immunologique transfusionnelle, elle est obligatoire avant toute transfusion de concentré de globules rouges (CGR) et 3 semaines environ après une transfusion pour vérifier l'absence d'immunisation post-transfusionnelle.

Si la RAE est positive, notamment à un anticorps anti-RH1(D), elle est complétée d'un titrage +/- dosage pondéral selon le titre, à répéter régulièrement, pour compléter l'exploration de l'anticorps identifié. Un génotypage fœtal sur sang maternel peut aussi être recommandé pour certains anticorps (D, E, c et K). Ces examens de suivi permettent de pouvoir diagnostiquer une situation à risque de MHFN sévère et de justifier un suivi rapproché jusqu'à la fin de la grossesse.

2.1.3. Le groupage sanguin fœtal

Historiquement pratiqué sur prélèvement invasif au cours d'une amniocentèse ou choriocentèse (27), le génotypage fœtal est maintenant recommandé par PCR sur sang maternel. En effet, si le prélèvement invasif permet de pouvoir phénotyper directement le fœtus, le geste invasif peut provoquer une allo-immunisation ou augmenter le titre d'un anticorps. Il pourrait aussi augmenter le risque de fausse couche spontanée (FCS) bien que la puissance statistique de cette affirmation puisse encore être débattue (28). Principalement

recommandé chez la femme enceinte RH:-1 non immunisée avant l'injection d'Ig anti-RH1(D), ce test peut aussi être proposé pour une femme enceinte immunisée contre l'antigène RH1(D) pour pouvoir alléger son suivi de grossesse si son fœtus est RH:-1, comme indiqué dans la Figure 4 ci-dessous.

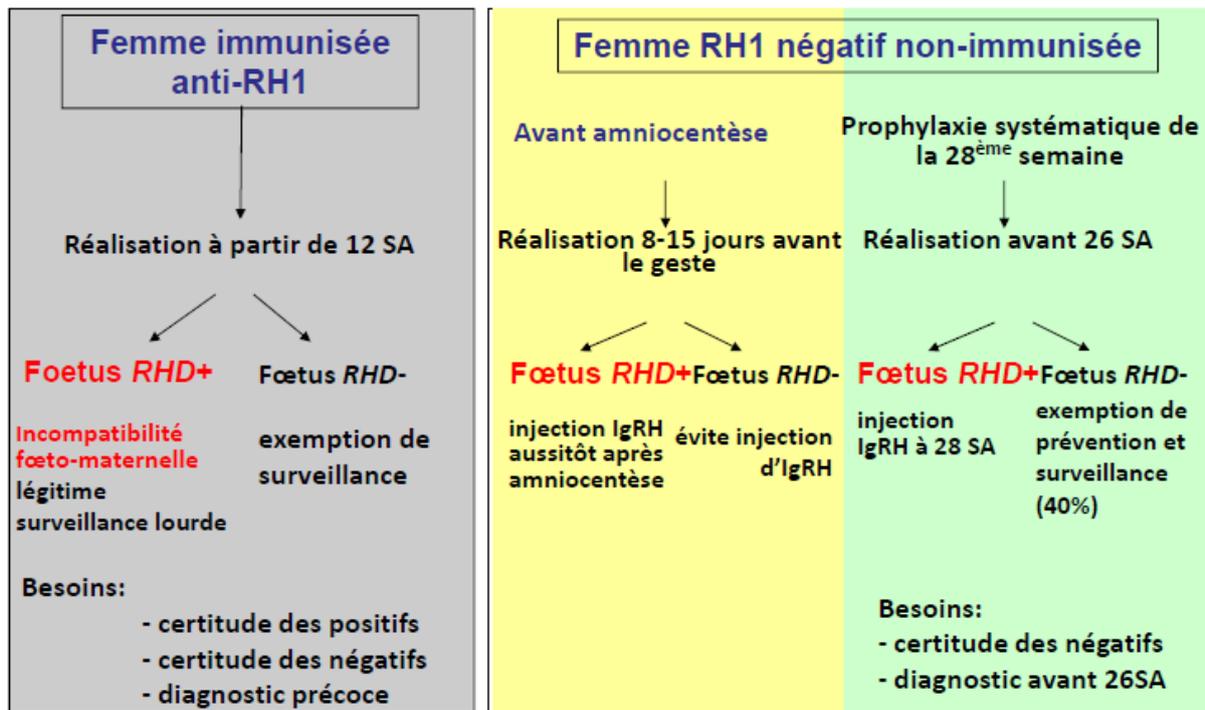


Figure 4: Indications de génotypage RHD fœtal pour une femme enceinte selon qu'elle soit immunisée ou non contre l'antigène RH1(D) (Dr Mailloux, CNRHP, 2015)

Le génotypage fœtal sur sang maternel est un test de diagnostic prénatal (DPN) encadré par le décret n°2006-1661 du 22/12/2006 modifiant le Code de la Santé Publique (CSP) en application de la loi de bioéthique du 06/08/2004. Deux déterminations sont ainsi cotées dans la nomenclature des analyses de biologie médicale : 4085 et 4086, après l'arrêté du 24 mai 2017 et l'inscription au journal officiel le 22 juin 2017. Ce génotypage Rhésus D fœtal est pris en charge par la sécurité sociale depuis le 13 juillet 2017. La demande d'analyse doit obligatoirement être accompagnée d'un consentement éclairé signé par la patiente.

Le test consiste en une amplification par PCR de certains exons du gène *RHD* (29). La mère RH : -1 étant normalement dépourvue de ce gène, seul l'ADN fœtal présent dans le sang maternel permet de positiver le test. D'abord basé sur l'amplification d'un seul exon, la technique s'est affinée en ciblant 3 exons afin de pallier certaines erreurs de détections dans les populations non caucasiennes, notamment le pseudogène ψ , et certains variants ou gènes hybrides pouvant rendre le résultat faussement positif (7 ; 18).

Les limites connues de cette approche incluent également des risques de faux négatif si la quantité d'ADN fœtal est insuffisante dans le sang maternel, réduisant l'efficacité de l'étape d'extraction et, par la suite, celle d'amplification par PCR (29). En réponse à cette limite, le CNOGF recommande de renouveler le génotypage sur sang maternel après quelques semaines si la première détermination est négative. Le premier génotypage est recommandé à partir de 12 SA bien que la sensibilité du test semble très bonne après 10 SA et jugée excellente à 15 SA (32).

Le génotypage fœtal a permis de diminuer le nombre d'injection inutiles d'Ig anti-RH1(D) en les réservant aux femmes RH:-1 porteuses de fœtus RH:1. On estime qu'environ 40% des femmes RH:-1 sont porteuses de fœtus RH:-1, l'injection d'Ig anti-RH1(D) étant inutile chez elles.

2.2. Prise en charge d'une allo-immunisation maternelle

2.2.1. Impact d'une allo-immunisation dans le suivi de la grossesse

Une RAE positive durant la grossesse va nécessiter une prise en charge particulière et différente selon l'anticorps identifié. En effet, tous les anticorps n'ont pas la même

dangerosité et tous n'impliquent pas un risque de MHFN. Comme indiqué sur la Figure 5 et décrit précédemment, les anticorps à risque d'anémie fœtale sévère *in utero* sont les anticorps anti-RH1(D), RH3(E) (rarement), RH4(c) et Kell(K). Ceux-ci vont donc demander un suivi biologique et médico-technique renforcé durant le reste de la grossesse.

Dans un premier temps, le phénotype du géniteur est à renseigner. Si ce dernier ne présente pas l'antigène à risque et que sa paternité est certaine, alors le suivi de la grossesse peut être allégé. Dans le cas contraire, un génotypage du fœtus est nécessaire pour déterminer s'il présente le gène codant pour l'antigène concerné, ou non (33). Un génotypage positif confirme la situation d'IFME et doit programmer un suivi du titre +/- concentration de l'allo-anticorps maternel afin d'anticiper le recours à l'échodoppler.

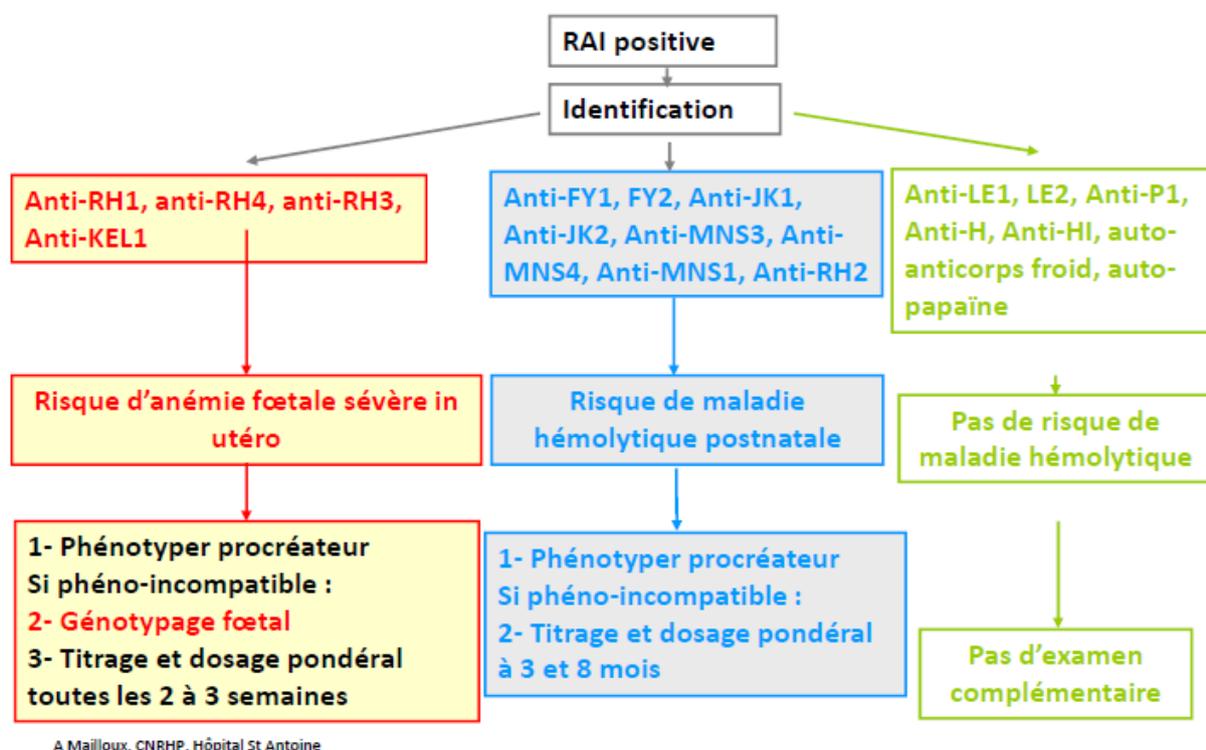


Figure 5 : Conduite à tenir selon la spécificité de l'anticorps identifié en RAE lors d'une grossesse selon les recommandations du CNRHP en 2015

2.2.3. Le titrage d'anticorps

Dans le cas d'une suspicion d'allo-immunisation fœto-maternelle, lorsque la RAE est positive et identifie un anticorps à risque de MHFN, le titrage de cet anticorps permet d'évaluer l'affinité pour l'antigène cible et ainsi évaluer le risque de MHFN clinique.

Le titrage des anticorps est un test indirect à l'antiglobuline anti-IgG sans ajout de LISS (solution de basse force ionique), basé sur la dilution géométrique de raison 2 du plasma ou sérum de la patiente. Les différentes dilutions sont ensuite mises en contact avec un pool de trois hématies natives hétérozygotes pour l'antigène correspondant à l'anticorps identifié. Après une heure d'incubation, le titre retenu est égal à l'inverse de la première dilution donnant une agglutination 1+. Par exemple, si cette image se retrouve après une dilution au 1/4 du plasma, le titre de l'anticorps est 4.

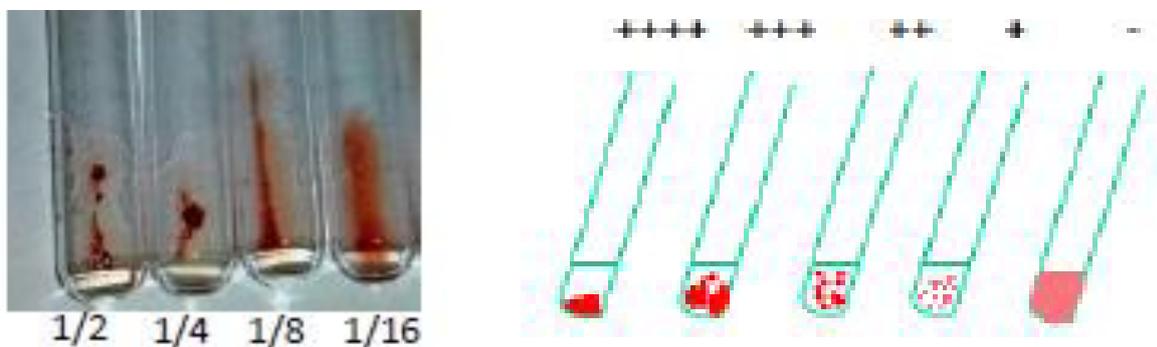


Figure 6: Résultat d'un titrage en technique tube (à gauche). Le titre retenu est l'inverse de la dilution du premier tube cotant « + » selon les critères de cotation d'intensité à droite.

En France, selon l'arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale, la technique de référence est la technique en tube, utilisant des hématies natives en solution saline 0,15M. Elle doit être standardisée vis-à-vis de ces réactifs (antiglobuline, phénotype érythrocytaire des hématies) et par rapport à un standard anti-RH1(D) de titre connu. L'échantillon précédent, congelé, s'il

est disponible, doit être repris en parallèle. Les hématies utilisées dans le cas d'anti-RH1(D) sont de phénotype RH :1,2,3,4,5 pour les anti-RH1(D) purs ou associés à une anti-RH2(C) ou anti-RH3(E). Pour les autres anticorps à tester, l'expression des antigènes correspondant doit être hétérozygote, ce qui n'est pas toujours le cas dans la littérature, posant des problèmes de comparaison.

En effet, la technique tube est la technique de référence mais elle présente les contraintes de ne pas être automatisable et d'avoir une grande variabilité de lecture inter-opérateur. Depuis plusieurs années, des tests sur des techniques en carte-gel ont lieu et la revue de la littérature proposée par Lieberman et al en 2021 fait état d'une disparité entre les hématies-tests utilisées (phénotype homozygote ou hétérozygote de l'antigène d'intérêt) limitant les comparaisons possibles (34). Pour autant, la technique gel a pour avantage d'être automatisable, plus facile et rapide à réaliser. Elle semble plus sensible que la technique tube, rendant des titres plus élevés. Concernant l'anticorps anti-RH1(D), Novaretti et al indique une grande variation du titre retrouvé en gel pour un titre en tube donné (voir Figure 7 issue de son article (35)). Un seuil de criticité biologique pour cette technique n'a pas encore été déterminé et une comparaison sur un grand nombre d'échantillons serait à envisager (36).

CTT*	Gel test titer (n)*											
	titer	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
1	0	0	0	0	4	4	8	0	0	0	0	16
2	0	0	0	0	1	4	9	3	1	1	0	19
4	0	0	0	0	0	3	4	5	5	1	0	18
8	0	0	0	0	0	0	1	4	4	3	0	12
16	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6	1	9
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	5

*CTT, conventional tube test; n, number of samples test.

Figure 7 : Titres d'anti-D déterminés par technique tube conventionnelle (CTT), testés en gel où une variation du titre semble s'observer, repris de l'article de Novaretti et al (35)

En France, le CRNHP recommande la réalisation d'un dosage pondéral en plus du titrage d'anticorps anti-RH1(D) afin d'obtenir une estimation plus précise de la concentration. En effet, pour l'allo-immunisation anti-RH1(D) le risque d'anémie fœtale sévère *in utero* est défini selon le résultat du dosage pondéral avec un seuil à 1 µg/mL comme résumé sur la Figure 8 ci-dessous. Le Tableau II nuance cependant ce seuil selon l'avancée de la grossesse.

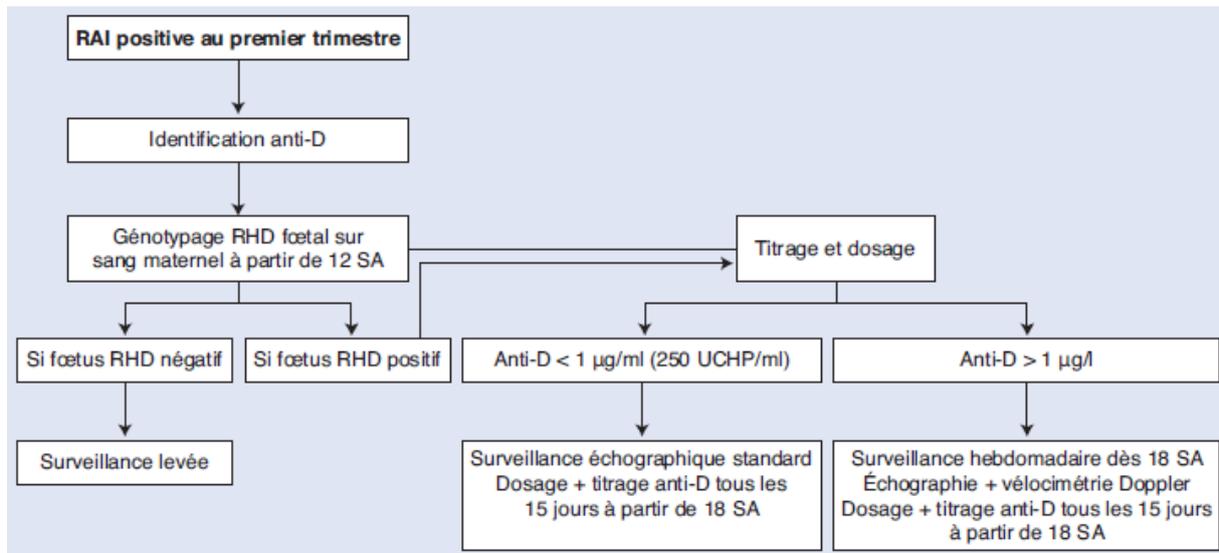


Figure 8: Arbre décisionnel des grossesses avec allo-immunisation anti-RH1(D) d'après le Dr Mailloux (33)

Chez une femme enceinte, après un titrage d'anticorps anti-RH1(D) de titre inférieur à 4 en technique tube, Cortey et al (33) recommande d'utiliser le microtitrage pour orienter sur son origine (allo-anticorps ou anticorps passifs après injection d'Ig anti-RH1(D)) d'où l'intérêt de développer cette technique.

2.2.4. Le dosage pondéral d'anticorps

En parallèle du titrage de l'anticorps, pour un titre d'anticorps anti-RH1(D) supérieur à 8 en technique tube, un dosage pondéral de l'anticorps est recommandé pour évaluer la concentration des anticorps plus précisément qu'avec le titrage. Lors de la découverte d'un

allo-anticorps anti-RH1(D) par exemple, le dosage pondéral est recommandé pour avoir des concentrations initiales. Par la suite, le titre est suivi et peut être complété d'un dosage pondéral lors d'une variation franche du titre, afin d'obtenir une nouvelle valeur de concentration de l'anticorps anti-D (33).

Le dosage pondéral est basée sur un principe d'hémagglutination en flux continu via un « autoanalyser », comme décrit par Moore et al en 1969 (37) ; voir Figure 9).

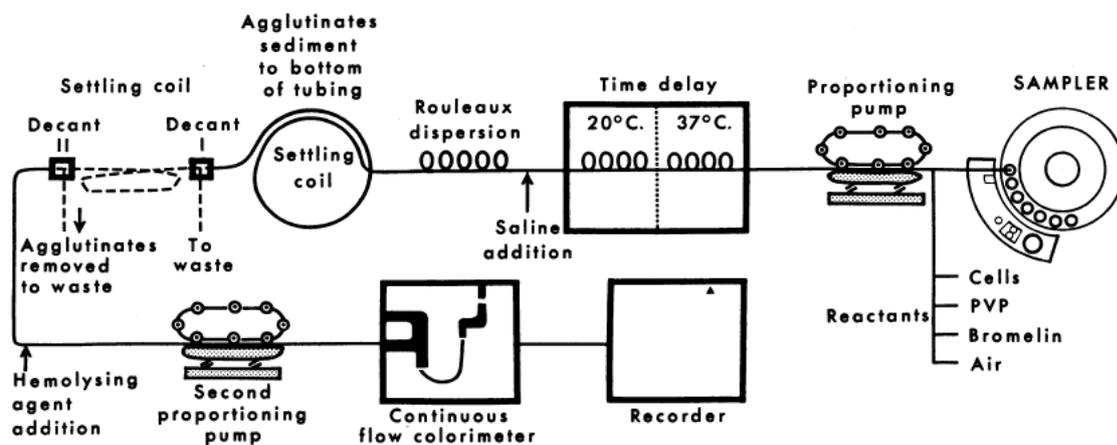


Figure 9: Schéma d'un AutoAnalyseur d'hémagglutination en flux continu (Moore et al (37))

En France, elle est utilisée pour doser les anticorps anti-RH1, 2, 3, 4 et 5. Pour l'anticorps anti-RH1, des hématies-tests RH1 sont mises en contact avec le sérum des patientes. Les agglutinats formés en cas de réaction positive (présence d'anticorps anti-RH1) sont enlevés et les hématies restantes sont lysées. L'automate mesure ensuite l'absorbance de cet hémolysât, dont l'intensité est inversement proportionnelle à la concentration en anticorps RH1 du sérum de la patiente. La concentration retrouvée est enfin comparée à une gamme étalon de concentrations connues en anticorps anti-RH1(D) pour déduire celle de la patiente.

Cette technique possède un coefficient de variation élevé : entre 5 et 20%. Ainsi, une variation du taux d'anticorps n'est jugée significative qu'à partir de 30% (12 ; 27).

Il existe 2 variantes de cette technique (39) :

- la variante « 2 temps » : les hématies-tests sont prétraitées par broméline, facilitant la fixation des anticorps sur les hématies et permettant un dosage global des IgG et IgM
- la variante « 1 temps » : la broméline est ajoutée directement dans le circuit, détruisant beaucoup d'IgG3 et ne permettant de doser presque que les anticorps de haut affinité IgG1

Le résultat d'un dosage pondéral s'exprime en $\mu\text{g/mL}$ pour les Ig anti-RH1, et en unité internationale (UI/mL) ou en unités locales (CHP/mL) pour les Ig anti-RH2/3/4/5, avec la conversion : $1 \mu\text{g/mL} = 5 \text{ UI/mL} = 250 \text{ UCHP/mL}$ pour les Ig anti-RH1. Les anticorps à risque d'anémie fœtale sévère *in utero* possèdent un seuil critique (voir Tableau II (40)), au-dessus duquel de nouvelles mesures de suivi de la grossesse sont recommandées selon la CNGOF.

Tableau II : Valeurs seuils critiques d'alerte des principaux anticorps à risque fœtal (40)

Anti-RH1	Dosage pondéral (titre au moins égal au 1/16 ^e)	4 $\mu\text{g/mL}$ (1 000 U CHP)	3 $\mu\text{g/mL}$ (750 U CHP)	2 $\mu\text{g/mL}$ (500 U CHP)	1 $\mu\text{g/mL}$ (250 U CHP)	0,7 $\mu\text{g/mL}$ (175 U CHP)
Anti-KEL1	Titre	> 1/128	1/128	1/64	1/16	1/16
Anti-RH4 Anti-RH3	Dosage pondéral (titre au moins égal à ¼)	3 000 U CHP/mL	1 500 U CHP/mL	1 000 U CHP/mL	750 U CHP/mL	500 U CHP/mL
Semaines d'aménorrhée		18	24	28	32	36
<p>En situation d'incompatibilité, le risque d'anémie fœtale sévère dépend du taux de l'anticorps et de l'âge gestationnel. Par exemple, un anti-RH1 dosant 1 $\mu\text{g/mL}$ expose un fœtus Rh positif à un risque d'anémie sévère seulement à partir de 7 mois de grossesse (32^e semaine d'aménorrhée). Pour un taux de 4 $\mu\text{g/mL}$ le risque apparaît dès 18 semaines. Titre: test indirect à l'antiglobuline – hématies-test normales-lecture macroscopique des agglutinats. Dosage pondéral: seul l'anti-RH1 est couramment exprimé en $\mu\text{g/mL}$ (1 $\mu\text{g} = 5 \text{ UI} = 250 \text{ U CHP}$). CHP: centre d'hémiologie périnatale.</p>						

Le dosage pondéral a pour inconvénients de nécessiter un automate spécialisé encombrant dédié à cette analyse, pour lequel la mise au point est assez difficile. Cette technique n'est utilisée couramment qu'en France et au Royaume-Uni pour évaluer le risque de MHFN (41).

Concernant les anticorps anti-RH1(D), il est recommandé par la SFTS de répéter le titrage et dosage pondéral tous les 15 jours à partir de 18 SA comme indiqué sur la Figure 10. Un dosage pondéral supérieur 1 µg/mL va cependant conditionner le suivi obstétrical de la patiente, passant d'un suivi échographique standard à un suivi échographique rapproché et un suivi non invasif de diagnostic d'anémie fœtale par mesure du pic systolique de vélocité de l'artère cérébrale moyenne (PSV-ACM) toutes les semaines.

2.2.5. Prise en charge fœtale

Si historiquement, les examens fœtaux dépendaient de techniques invasives, de nouvelles techniques non invasives supplantent maintenant les premières. Ainsi la mesure de la densité optique sur liquide amniotique après amniocentèse et le calcul de l'indice de Liley publié en 1961 sont considérés comme obsolètes. Il est actuellement recommandé d'utiliser la mesure du pic systolique de vélocité de l'artère cérébrale moyenne (PSV-ACM). Cet examen non invasif permet d'estimer l'hémoglobine fœtale avec une excellente sensibilité et ainsi diminuer le recours aux gestes invasifs. Le PSV-ACM mesuré est ensuite comparé aux valeurs définies par l'équipe de Mari and al (42) selon l'âge gestationnel pour donner une valeur en MoM (*multiple of median*). Une valeur $\geq 1,5$ MoM signe une anémie fœtale à 8 g/dL ou moins (33) et, couplée à la spécificité de l'anticorps retrouvé, elle impose une surveillance par mesure du PSV-ACM une à deux fois par semaine afin d'anticiper une baisse de l'hémoglobine fœtale. Cet examen permet ainsi de programmer une ponction de sang fœtal en cas d'anémie avérée selon la mesure du PSV-ACM (43). La méthode invasive de ponction de sang fœtale est ainsi limitée et le recours à une transfusion *in utero* (TIU) pour corriger l'anémie est souvent retardé.

En pratique, les situations cliniques reconnues à risque d'anémie fœtale sont adressées à un Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal (CPDPN) (44) et l'équipe spécialisée aura pour charge de dépister et traiter les anémies fœtales avant le stade d'anasarque. Les actes transfusionnels seront alors prévus après organisation entre le CPDPN, le CNRHP et les centres de compétences (33). D'autres examens peuvent aider à la détection de signes d'anémie fœtale, comme le suivi par échographie morphologique et le rythme cardiaque fœtal.

La prise en charge d'une anémie fœtale, en anténatal, peut passer par des transfusions *in utero* (TIU), bien qu'elles présentent un risque supplémentaire d'allo-immunisation (45). Les produits transfusés doivent être de groupe O RH:-1 et respecter le phénotype étendu maternel pour éviter une nouvelle immunisation. Les CGR sont réduits de volume en cas de TIU afin d'obtenir une hémocrite > 70% et sont compatibles avec le plasma maternel. La première transfusion peut avoir lieu dès 17 SA et le rythme des TIU est fonction du taux d'hémoglobine initial et celui atteint en fin de transfusion. Elles peuvent être programmées jusqu'à l'accouchement (42). Durant une TIU, l'hémoglobine est suivie régulièrement, avec pour but d'atteindre le 75^e percentile du terme.

Une alternative à une ultime TIU peut aussi passer par un accouchement prématuré (44). En effet, en cas d'IFME diagnostiquée *in utero*, il n'existe pas de bénéfice à prolonger la grossesse après 37 SA, âge gestationnel à partir duquel l'enfant n'est plus considéré comme prématuré. Comme énoncé précédemment, la concentration fœtale en anticorps, qui augmente beaucoup en fin de grossesse par transfert actif placentaire, augmente le processus d'hémolyse. La Société Française de Transfusion Sanguine (SFTS) a ainsi mise au point un arbre de recommandations avec le CNRHP pour la prise en charge de patientes enceintes allo-immunisée qui est représenté par la Figure 10 ci-dessous.

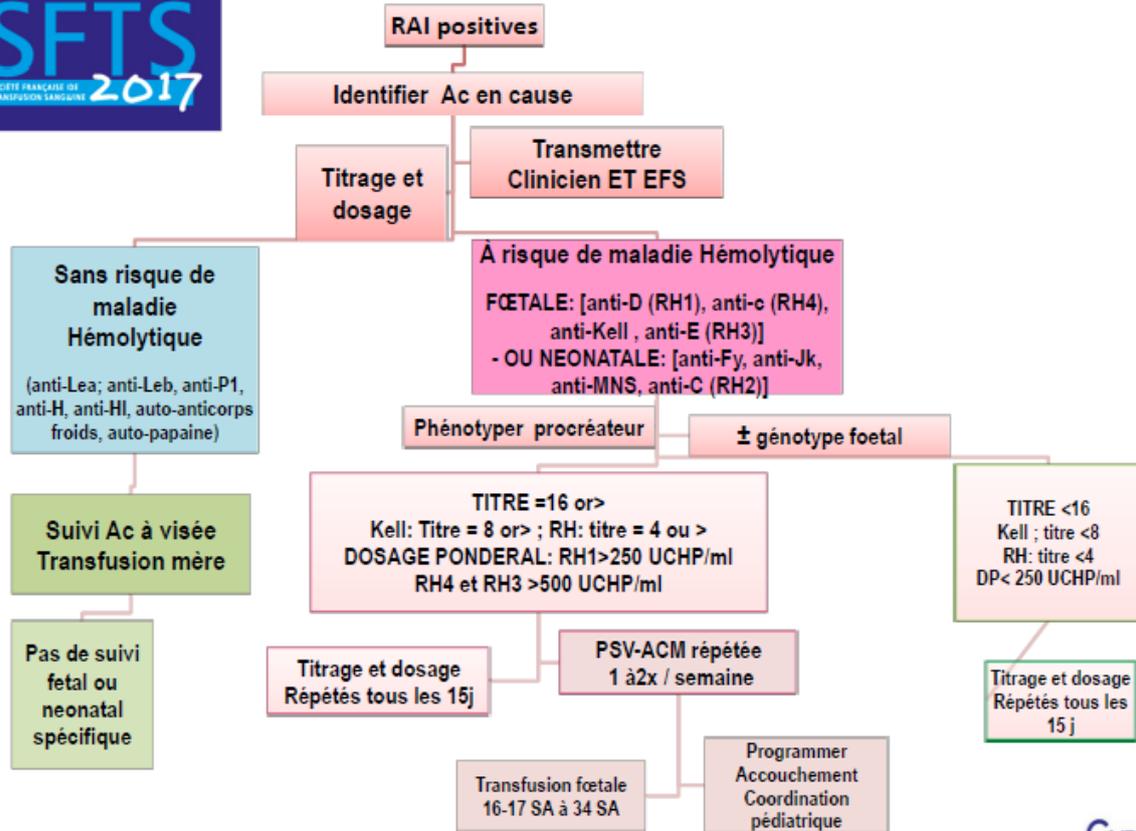


Figure 10 : Arbre décisionnel en cas de RAE positive lors d'une grossesse (SFTS 2017)

2.2.6. Prise en charge néonatale

A la naissance, un test direct à l'antiglobuline (TDA) est effectué sur sang de cordon ou sang veineux périphérique afin de confirmer l'allo-immunisation si le test est positif. Dans ce cas, le résultat indique que des anticorps sont fixés sur les hématies du nouveau-né. Une technique d'élution suivie d'une identification par TIA peut ensuite permettre de confirmer la spécificité des anticorps à l'origine de l'IFME.

L'ictère du nouveau-né peut être pris en charge par photothérapie intensive continue, qui transforme la bilirubine non-conjuguée cutanée en photo-dérivés éliminés directement en court-circuitant l'étape de conjugaison hépatique qui est l'étape limitante du métabolisme chez le nouveau-né. Dans le cas d'une hyperbilirubinémie sanguine sévère nécessitant une

correction rapide, il peut être pratiqué une exsanguino-transfusion (EST). Cet acte consiste en un remplacement d'une grande partie de la masse sanguine du nouveau-né par le sang total reconstitué issu d'un donneur, en simple ou en double volume. Cela permet également d'aider à corriger l'anémie néonatale, et d'éliminer une partie des anticorps et hématies recouvertes d'anticorps (en cas de TDA fortement positif) en plus d'éliminer une partie de la bilirubine. En cas d'anémie avec anasarque sans ictère, une « EST partielle » peut être pratiquée (46).

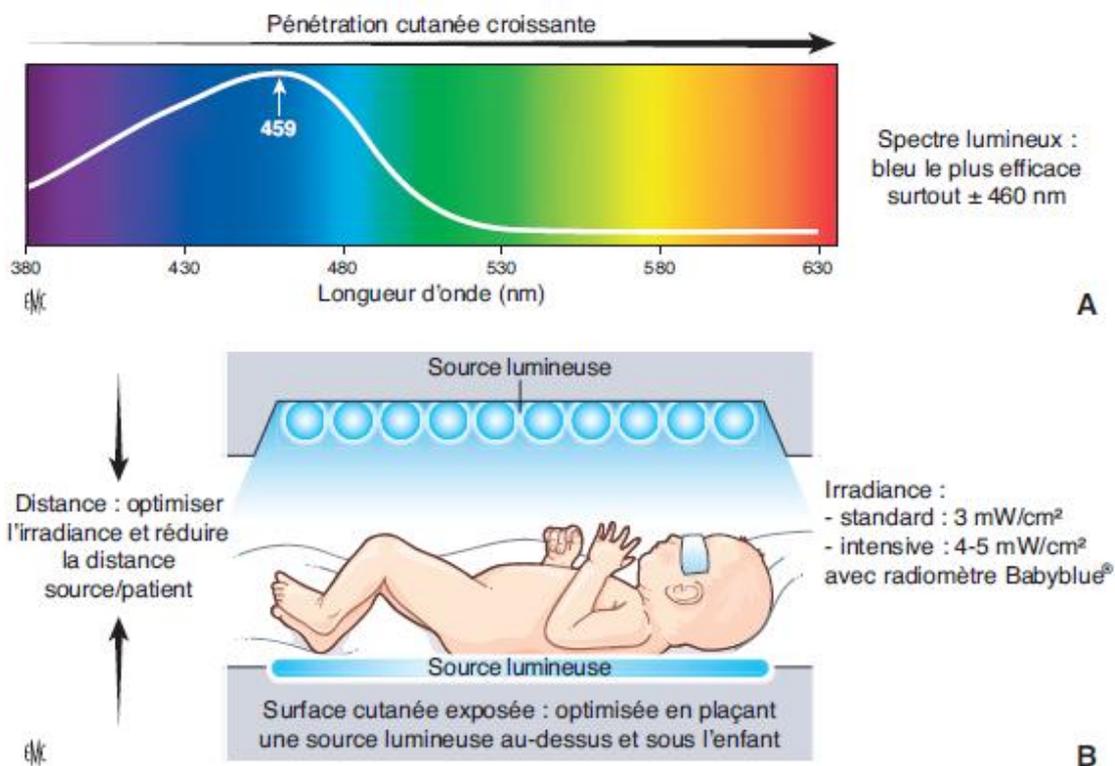


Figure 11: Facteurs influençant l'efficacité de la photothérapie pour corriger l'hyperbilirubinémie néonatale, selon l'article d'Academy et al (46)

Ainsi, une allo-immunisation contre l'antigène RH1(D) peut avoir des conséquences graves pour un fœtus/nouveau-né, pouvant éventuellement mettre en jeu son pronostic vital et impliquer des thérapeutiques lourdes. Heureusement, depuis plusieurs décennies maintenant, une stratégie de prévention existe : l'immunoprophylaxie par injection d'immunoglobuline anti-RH1(D) (Ig anti-RH1(D)).

3. Prévention d'une immunisation anti-RH1(D)

3.1. Historique de la stratégie préventive en France

En France, les premiers protocoles de prévention de l'allo-immunisation anti-RH1(D) remontent au début des années 1970s. Suivant les données de l'étude de Pollack et al de la fin des années 1960s démontrant l'efficacité sur le taux d'immunisation anti-RH1(D) d'une dose intramusculaire de 300µg d'Ig anti-RH1(D) dans les 72h suivant l'accouchement (47), les Ig anti-RH1(D) furent d'abord utilisées exclusivement lors de l'accouchement des femmes RH:-1 avec un nouveau-né RH:1. Puis la pratique s'est généralisée aux situations identifiées comme à risque d'HFM durant la grossesse (voir Annexe I) ce qui a permis de diviser par 10 environ le taux d'immunisation chez les femmes enceintes entre 1970 et 1995 (48). Malgré cela, un risque résiduel d'allo-immunisation anti-RH1(D) fut estimée en Ile-de-France à 0,9 pour 1000 naissances, soit environ 750 femmes en 1995. Si les raisons évoquées de ce risque impliquent surtout des non-administrations malgré indication ou une posologie inadéquate non basée sur le test de Kleihauer, il est estimé que 25% des allo-immunisations anti-RH1(D) seraient spontanées et échapperaient donc à la prévention ciblée (49).

Ce dernier élément a motivé le CNGOF à recommander en 2005 une prophylaxie systématique à 28 SA chez les femmes enceintes RH :-1 non immunisée contre l'antigène D en plus de la prévention ciblée en cours de grossesse et après l'accouchement (32). L'ajout d'une prévention systématique au 3^{ème} trimestre, déjà pratiquée par d'autres pays développés, fut démontré comme efficace par la revue bibliographique de Parant et al de 2006 (50). Le Tableau III de l'article de MH Poissonnier (51) ci-dessous résume les recommandations actuelles de suivi et prise en charge d'une femme enceinte RH :-1 non immunisée.

Tableau III : Recommandations pour la prise en charge des femmes enceintes RH:-1 et la prévention de l'allo-immunisation anti-RH1 (CNGOF, 2006)

< 15 SA	15 à 27 SA	27 à 29 SA	29 SA à accouchement	Accouchement
Prélever une RAI avant toute injection d'IgRh				
Prévention ciblée : - FCS, IVG, GEU, IMG - Métorragies, môle, réduction embryonnaire, cerclage, traumatisme abdominal - Ponction amniotique, biopsie de trophoblaste	Prévention ciblée : -Risque élevé d'HFM(*) (HFM↑↑) FC tardive, IMG, MIU, traumatisme abdomino-pelvien, cordocentèse -Risque faible d'HFM Amniocentèse simple, métorragies, cerclage tardif	Prévention Systématique	Prévention ciblée : Abstention si 300µg(28SA) SAUF SI risque élevé d'HFM (HFM↑↑) (version, MIU, traumatisme abdomino-pelvien, ponction cordon ou organe foetal)	Si nouveau-né RhD positif : ⇒ Injection d'IgRh Abstention possible si : - < 3 semaines après IgRh - ET Kleihauer négatif - ET anti-D>6ng/ml
Kleihauer : non	Kleihauer : oui si HFM↑↑	Kleihauer : non	Kleihauer : oui si HFM↑↑	Kleihauer : oui
Rhophylac® 200 IV dans les 72h	Rhophylac® 200 IV dans les 72h	Rhophylac®300 IM ou IV	Rhophylac®200 IV dans les 72h	Rhophylac®200 IV dans les 72h
<i>Avant toute injection d'IgRh, prélever une RAI (sans attendre le résultat) pour s'assurer a posteriori de l'absence d'immunisation</i>				
<i>Après toute injection d'IgRh, assurer la traçabilité (dossier patiente ET pharmacie ; 2 étiquettes dans la boîte)</i>				
Calendrier des RAI : Premier trimestre (avec groupe sanguin si non fait) ; 6 ^e mois (peut correspondre à la RAI avant l'injection systématique à 28 SA) ; 8 ^e mois seulement si Rhophylac® 300 non fait à 28 SA ; quatre dernières semaines : sécurité transfusionnelle				
(*)HFM : hémorragie foeto-maternelle. ; HFM↑↑ : risque élevé d'HFM				

Malgré cela, si l'allo-immunisation anti-RH1(D) n'est apparemment plus l'immunisation la plus fréquente durant la grossesse, au point de devenir un évènement d'incidence rare, elle reste une part importante de cas de foetus gravement affectés durant la grossesse d'après des études de pays développés ayant recommandé le même type de prévention à 28SA (52,53).

	Pal et al. (2013)	Koelewijn et al. (2008) ¹⁵	Geifman-Holtzman et al. (1997) ⁵	Filbey et al. (1995) ¹⁶	Pepperell et al. (1977) ¹⁷	Queenan et al. (1969) ¹⁸	Polesky (1967) ¹⁹
Antibody							
D	0.8	0.8	2.6	1.4	13.3	16.5	43.3
E	2.0	1.0	2.0	0.5	1.0	1.9	1.9
c	0.6	0.5	0.7	0.3	0.8	0.7	1.6
Kell	0.7	0.7	3.2	0.4	0.5	1.6	2.2

Figure 12 : Fréquence des anticorps lors d'allo-immunisation foeto-maternelles pour 1000 échantillons selon les articles de la littérature repris dans l'article de Pal et al (53)

3.2. L'immunoglobuline anti-RH1(D) (Ig anti-RH1(D))

3.2.1. Présentation du médicament

L'Ig anti-RH1(D) est une immunoglobuline spécifique de type IgG dirigée contre l'antigène RH1(D) des érythrocytes. Elle est collectée par plasmaphérèse de volontaires sains RH :-1 hyperimmunisés par l'injection répétée d'hématies RH:1. Le bénévolat pour cette pratique en France a été interdite en 1980. Ainsi la grande majorité des Ig anti-RH1(D) proviennent de donneurs rémunérés en Amérique du Nord (48). La spécialité utilisée en France est le Rhophylac® qui a remplacé la spécialité Natead® le 21 juillet 2005 mais elle est commercialisée en Suisse depuis 1996, en Allemagne depuis 2002, ainsi que dans d'autres pays européens et aux Etats-Unis depuis 2004. Le Rhophylac® 300µg contient, selon son RCP, 84,1% d'IgG1, 7,6% d'IgG2, 8,1% d'IgG3 et 1,0% d'IgG4.

En France, le Rhophylac® possède deux présentations galéniques : des seringues préremplies de 300µg/2mL et 200µg/2mL qui peuvent être administrées en intramusculaire (IM) ou en intravasculaire (IV). Ces présentations galéniques ont orienté le choix français d'une prévention systématique par injection de 300µg à 28 SA plutôt que deux injections de 100µg à 28 et 34 SA comme effectuée au Royaume-Uni. Etant un produit dérivé du sang, il existe un risque théorique de transmission d'agents pathogènes, bien qu'à ce jour, aucun cas de transmission virale n'a été rapportée (2). L'élimination virale s'effectue par une combinaison de traitements solvant-détergent et nanofiltration (48).

L'immunoprophylaxie par Ig anti-RH1(D) est utilisée depuis plusieurs décennies, bien que le mécanisme d'action ne soit pas encore précisément connu. Des hypothèses existent, notamment la saturation des sites antigéniques RhD des hématies fœtales, l'immunomodulation par liaison du fragment Fc des Ig anti-RH1(D) aux récepteurs FcγRIIB

(CD34) des lymphocytes, ou encore l'élimination des hématies RH:1 fœtales dépendante de la capacité des Ig anti-RH1(D) à lier ces hématies et les récepteurs FcγRIII (CD16) des cellules phagocytaires (48). La dernière hypothèse semble bien corrélée à l'efficacité des Ig anti-RH1(D) (54). *A contrario*, ces immunoglobulines ne semblent pas masquer entièrement les sites antigéniques, environ 8% théoriquement avec 100µg d'Ig anti-RH1(D) pour 5 mL d'hématies fœtales (55). Les Ig anti-RH1(D) n'activent pas le complément ; la phagocytose reste donc l'hypothèse principale d'élimination des hématies fœtales (48).

3.2.2. Pharmacocinétique

D'après les données de Cortey et al (56), les Ig anti-RH1(D) type Rhophylac® se répartissent entre le secteur vasculaire et extravasculaire en 48h. Cela rejoint les observations du Dr Dupont notant l'absence de corrélation en technique de microtitrage entre les concentrations mesurées et théoriques sur des prélèvements datant de moins de 48h après l'injection de Rhophylac®(57). Une fois réparties entre les deux secteurs, les Ig anti-RH1(D) ont une demi-vie d'élimination d'environ 3 semaines et peuvent donner des RAE positives pendant 1-3 mois pour une dose initiale de 100µg ou 2-4 mois pour une dose initiale de 300µg (56). Ce dernier point est évidemment dépendant de la consommation éventuelle des anticorps par des HFM, parfois silencieuses, au cours de la grossesse. Ainsi, après l'injection systématique à 28 SA, on peut s'attendre à voir une RAE positive à l'accouchement, et l'aide interprétative de la technique de microtitrage est bien documentée dans ce cas pour distinguer des anti-RH1(D) passifs d'une allo-immunisation dès lors que les dates d'injections et doses de Rhophylac® administrés sont documentés (39).

Les formes galéniques IM et IV du Rhophylac® ne semblent pas différer en efficacité ou sécurité (58) dans le même système de prévention pré- et post-natal qu'actuellement en France. L'étude de Bichler et al (59) comparant la pharmacocinétique des formes IV et IM de 300µg lors de la prévention systématique à 28 SA conclut à des concentrations moyennes d'anti-RH1(D) différentes jusqu'à 7 jours après administration mais elles semblent devenir comparables à partir 2-3 semaines post-administration (voir Figure 13).

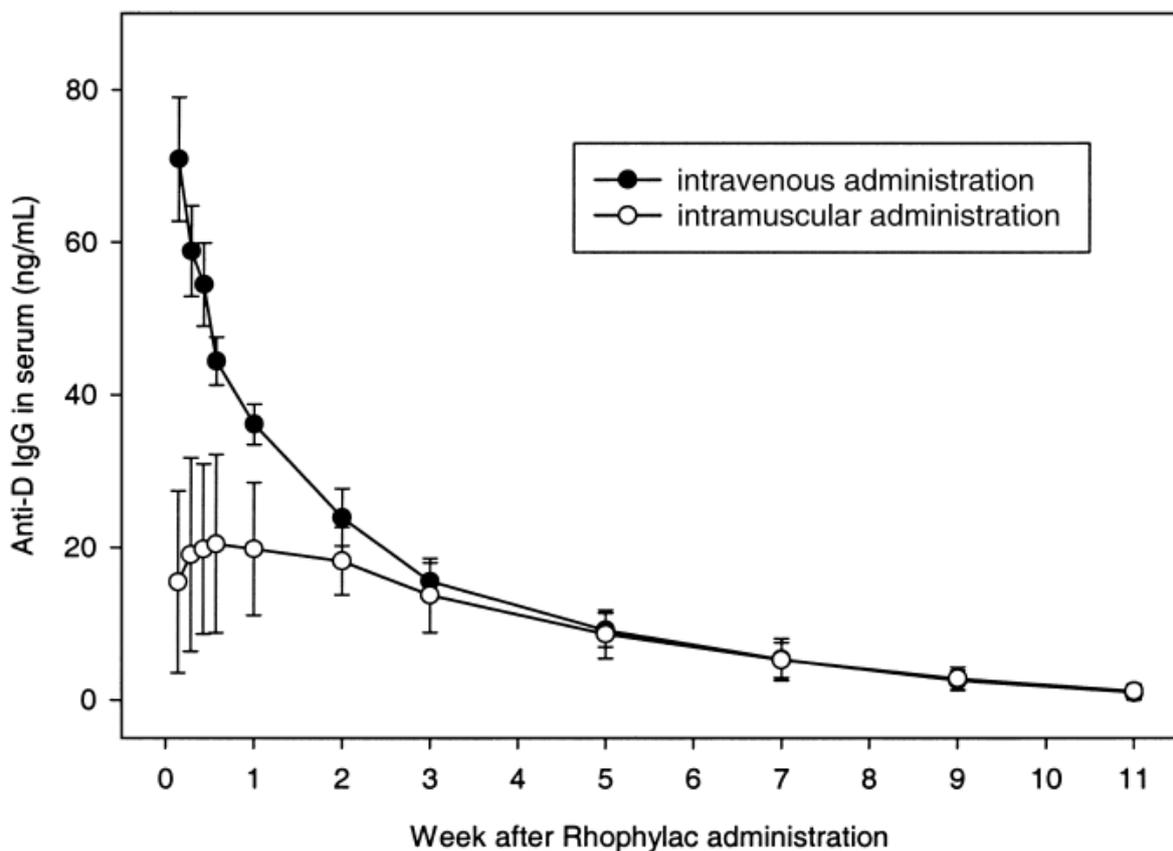


Figure 13: Moyenne (et écart-type) des concentrations sériques en IgG anti-D après injection de 300µg d'immunoglobulines anti-D à 28 SA de grossesse montrant des concentrations devenant comparables à partir de 2 semaines après administration de Rhophylac®, d'après l'article de Bichler et al (59)

3.2.3. Indications du Rhophylac® en France

En France, les indications actuelles de ce médicament, disponibles dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP), comprennent une prophylaxie *antepartum* et *postpartum*. La première inclut une « prévention planifiée » faisant référence à l'injection à 28 SA, et une « prophylaxie à la suite de complications de grossesse » (listées en Annexe 1). La prévention *postpartum* correspond à l'accouchement d'un nouveau-né RH:1 chez une femme RH:-1.

Ces indications ont été revues par la Commission de la Transparence de la HAS lors de son avis du 31 mars 2010. Au premier trimestre, une injection de 200µg de Rhophylac® est recommandée pour tous les évènements de l'Annexe I sans limite inférieure d'âge ni test de Kleihauer nécessaire. Au second trimestre, les évènements à risque modéré de passage d'hématies fœtales (métrorragies, cerclage du col utérin et menace d'accouchement prématuré nécessitant un traitement) ne nécessitent pas non plus de test de Kleihauer et peuvent nécessiter 200µg de Rhophylac®, alors que les évènements à risque importants de passage d'hématies fœtales voient leur dose recommandée dépendre d'un test de Kleihauer.

L'injection systématique du troisième trimestre s'effectue à 28 semaines d'aménorrhée (28 SA +/- 1 SA) et est de 300µg en IM. Cette prophylaxie systématique fait écho à des immunisations mises en évidence à cette période après des HFM silencieuses, sans forcément de signes cliniques apparents (60). En cas d'oubli, un rappel de 300µg peut être réalisé jusqu'à 32 SA. Après 32SA, le rappel sera de 200µg. Après cette injection systématique, il n'est pas nécessaire de répéter les RAE pour dépister une immunisation anti-RH1 jusqu'à l'accouchement. À ce moment, un phénotype du nouveau-né est réalisé pour confirmer son phénotype RH1(D)-positif et la mère bénéficie d'une nouvelle injection de Rhophylac® dans les 72h suivant le postpartum. Une ou plusieurs doses complémentaires peuvent être

administrées selon le résultat du test de Kleihauer. En cas d'oubli de cette injection, un rappel peut être réalisé jusqu'à 30 jours après l'accouchement.

Une zone d'ombre dans les indications de la HAS concerne le troisième trimestre dans le cas d'évènements à risque d'hémorragie fœtale après l'injection systématique anténatale de 300µg. La question de réinjecter du Rhophylac® à la mère peut se poser, ainsi que de savoir si suffisamment d'Ig anti-RH1(D) est encore présent pour protéger la mère d'une allo-immunisation anti-RH1 jusqu'à l'accouchement. Le microtitrage peut ici avoir un intérêt.

3.3. Adapter la dose d'Ig anti-RH1(D)

L'étude de 1990 de Sebring et Polesky (61) semble indiquer que le volume de sang fœtal concerné dans les HFM est souvent très faible : moins de 0,05mL dans 74% des cas, moins d'1mL dans 96% des cas, moins de 2mL dans 97,1% des cas et moins de 30mL dans 99,67% des cas. Le seuil souvent retenu pour qualifier une HFM d'importante est 30mL car il correspond au volume théorique neutralisé par 300µg d'Ig anti-RH1(D), soit 20µg/mL d'hématies fœtales (62). Si ces hémorragies massives sont rares, estimées à environ 3 pour 1 000 naissances (5), l'incidence des HFM augmente avec l'avancée de la grossesse (63) et cet argument a contribué à l'injection systématique de 300µg d'Ig anti-RH1(D) à 28 SA.

3.3.2. Le Test de Kleihauer

Le Test de Kleihauer est un test diagnostique permettant de distinguer les hématies adultes des hématies fœtales, inscrit au Journal officiel en 2007 d'après l'arrêté du 24 janvier de la même année. Ce test est basé sur la propriété d'acido-résistance de l'hémoglobine fœtale. Sur frotti sanguin, les hématies sont fixées à l'alcool, traitées par tampon acide, et puis

colorées en rose pour identifier les hématies fœtales qui retiennent le colorant à ce pH. Le frotti est ensuite lu au microscope et les hématies fœtales sont comptées sur environ 10 000 globules rouges adultes. L'origine fœtale de telles hématies comptées chez une femme enceinte a été démontrées par Zipursky et al (8). Une persistance d'hémoglobine fœtale dans certaines hémoglobinopathies peut néanmoins surestimer ce nombre (64).

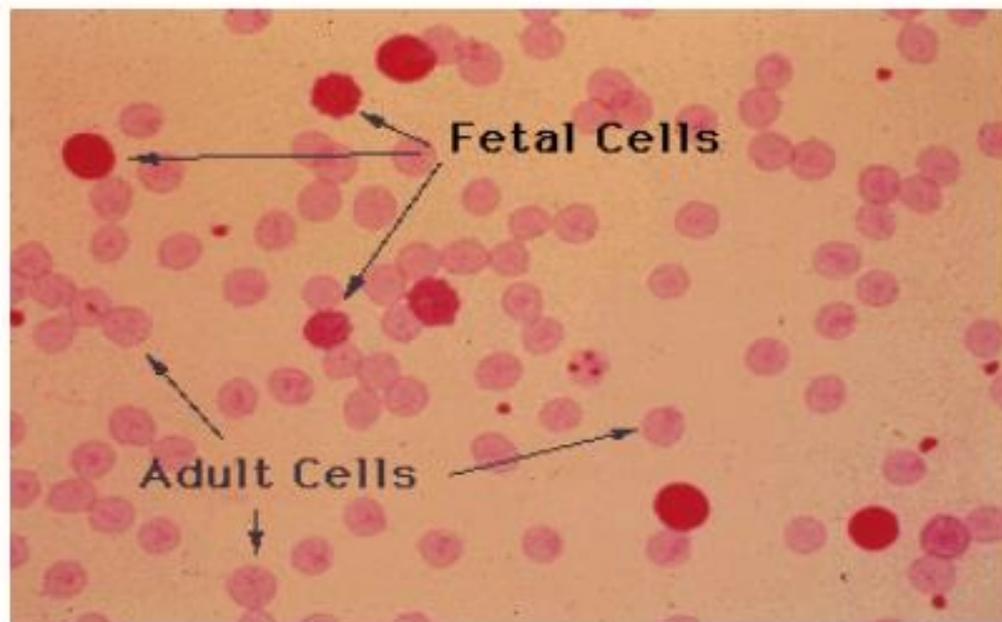


Figure 14 : Image d'hématies adultes (roses pâles) et fœtales (magenta) au microscope optique après la coloration du Test de Kleihauer

Cet examen est essentiel pour pouvoir diagnostiquer une hémorragie fœto-maternelle (HFM) et peut permettre d'en évaluer l'intensité en quantifiant les hématies fœtales (HF) parmi les hématies adultes (HA). Cette information permet d'adapter la dose d'Ig anti-RH1(D) à administrer pour neutraliser le sang fœtal et ainsi empêcher l'immunisation maternelle (voir le Tableau IV ci-dessous). Il est estimé qu'1 HF pour 10 000 HA correspond à environ 0,5mL de sang fœtal dans la circulation maternelle, ou 0,25mL d'HF.

3.3.3. Adaptation posologique de l'immunoglobuline anti-RH1

La quantification des hématies fœtales dans le sang maternel est recommandée lorsque l'HFM peut devenir importante, pour garder une efficacité optimale avec un rapport de 20 µg d'Ig anti-RH1(D) par ml de globules rouges RH :1(D+) (65).

Tableau IV : Adaptation de la dose d'immunoglobulines anti-D en fonction du volume d'HFM estimé par le test de Kleihauer (CNGOF, 2012)

Kleihauer (HF/10 000 HA)	Dose de 100 µg ^a		Dose de 200 µg ^a		Dose de 300 µg		Voie d'administration
	Doses	µg	Doses	µg	Doses	µg	
0-4	1	100	1	200	1	300	Intraveineuse (i.v.) directe
5-24	2	200	1	200	1	300	
25-44	3	300	2	400	1	300	
45-64	4	400	2	400	2	600	
65-84	5	500	3	600	2	600	Perfusion sur quatre heures diluée dans 250 ml de NaCl à 9 pour mille
85-104	6	600	3	600	2	600	
105-124	7	700	4	800	3	900	
125-144	8	800	4	800	3	900	
145-164	9	900	5	1000	3	900	
165-184	10	1000	5	1000	4	1200	
185-204	11	1100	6	1200	4	1200	
205-224	12	1200	6	1200	4	1200	
225-244	13	1300	7	1400	5	1500	
245-264	14	1400	7	1400	5	1500	
265-284	15	1500	8	1600	5	1500	
285-304	16	1600	8	1600	6	1800	

HF : hématies fœtales ; HA : hématies adultes.

^a La dose la plus basse actuellement commercialisée en France est de 200 µg. Dans les cas où une dose de 100 µg serait suffisante, il est recommandé de ne pas fractionner les doses.

En cas de suspicion d'une HFM, la dose de Rhophylac® à administrer est conditionnée par plusieurs paramètres : la nature de l'évènement hémorragique, le trimestre de grossesse et le résultat du test de Kleihauer si ce dernier est recommandé. Au premier trimestre de la grossesse, une injection intravasculaire ou intramusculaire de 200µg d'Ig anti-RH1(D) est justifiée pour les évènements à risque modéré de passage d'hématies fœtales, sans test de Kleihauer préalable. Du fait du faible volume sanguin fœtal à cette période, une injection préventive n'est pas nécessaire pour d'autres évènements.

Aux deuxième et troisième trimestres, la dose de Rhophylac® des évènements à risque important de passage d'hématies fœtales (voir Annexe I) est guidée par un test de Kleihauer permettant d'estimer la quantité de sang fœtal dans l'hémorragie. Pour les autres évènements, dont les évènements à risque modéré de passage d'hématies fœtales, une dose de 200µg est recommandée, sans quantification de sang fœtal par test de Kleihauer nécessaire.

Ainsi, la dose de Rhophylac® administrée est adaptée pour couvrir le volume de sang fœtal. Néanmoins, dans le cas d'évènements à risque d'HFM successifs, il peut être intéressant de pouvoir quantifier l'Ig anti-RH1(D) restant chez la mère afin d'évaluer la nécessité d'en réinjecter. La technique de microtitrage peut aider à répondre à cette demande en rendant un résultat numérique de concentration en anticorps anti-RH1 à confronter à une valeur seuil. Cette analyse pourrait alors s'inscrire dans l'arbre décisionnel de réinjection de RHOPHYLAC®. D'un point de vue économique, le microtitrage est facturé en moyenne à environ 27€. Une injection de Rhophylac® 200µg coûte environ 85€. (66)

3.4. Anticorps immun ou anticorps passif ?

Le microtitrage est une technique élaborée pour augmenter au maximum la sensibilité de détection des anticorps dirigés contre le système Rhésus. Cela lui permet de détecter une très faible concentration d'anticorps, soit issue d'Ig anti-RH1(D) soit issue d'une allo-immunisation.

En effet, la décroissance théorique du Rhophylac® dans l'organisme peut être comparée au résultat numérique du microtitrage pour permettre d'orienter l'identification d'un anticorps anti-RH1 plutôt en tant qu'anticorps passif type Ig anti-RH1(D) ou comme allo-

anticorps immun si sa concentration semble excessive. Dans le cadre d'évènements à risque d'HFM consécutifs, le microtitrage pourrait également servir à justifier ou non la réinjection d'une dose d'immunoglobuline anti-RH1(D).

3.5. Quel seuil d'Ig anti-RH1(D) pour protéger d'une allo-immunisation ?

Le seuil de concentration sanguine en d'Ig anti-RH1(D) permettant d'établir qu'une femme enceinte est protégée contre une allo-immunisation est surtout théorique. Un seuil d'environ 6 ng/mL peut se justifier selon deux argumentaires.

Tout d'abord, pour un volume moyen de sang d'environ 4-5L, une femme voit son volume de plasma augmenter d'environ 48% durant la grossesse (67). Ce dernier peut alors atteindre environ 4L en moyenne haute en fin de grossesse. Le volume de sang fœtal des HFM étant inférieurs à 2mL dans 98% des cas (61), soit un volume d'hématies fœtales d'environ 1mL, 20-25µg d'Ig anti-RH1(D) sont, selon l'OMS, théoriquement suffisant pour couvrir la femme enceinte. Pour un test comme le microtitrage effectué sur plasma, une concentration d'environ 6 ng/mL peut ainsi théoriquement servir de seuil pour estimer qu'une femme enceinte est protégée. Ce seuil se base sur 24µg d'Ig anti-RH1(D) et sur un volume plasmatique de fin de grossesse (environ 4L).

Deuxièmement, la Figure 15 ci-dessous du CNRHP exploite la cinétique d'élimination d'une injection de 300µg d'Ig anti-RH1(D) en parallèle de la concentration sanguine en Ig anti-RH1(D) retrouvée chez la femme enceinte. La concentration de 45 ng/mL correspond environ aux 300µg injectés et théoriquement neutralisant pour 15 mL d'hématies fœtales selon le seuil de 20 µg d'Ig anti-RH1(D) par mL souvent retenu pour une efficacité prophylactique (62). Avec

la demi-vie de 3 semaines environ du Rhophylac®, les concentrations successives mesurées arrivent à 6 ng/mL pour une quantité d'Ig anti-RH1(D) résiduelles pouvant neutraliser environ 2mL d'hématies fœtales, ce qui est bien supérieur au volume moyen d'une HFM.

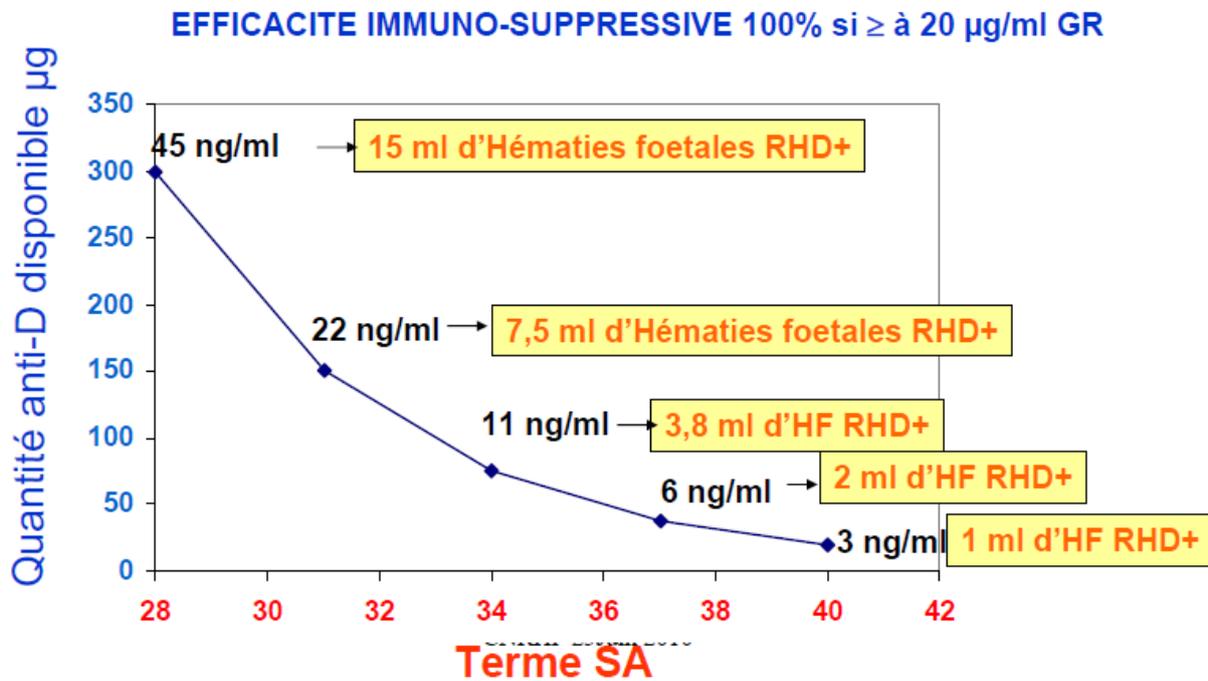


Figure 15 : Concentration en anti-RH1 attendue à la suite d'une injection d'Ig anti-RH1(D) 300 μ g faite à 28 SA en IV. La concentration en anti-RH1 diminue de moitié toutes les 3 semaines.

Le cumul de plusieurs HFM de faibles volumes, dont l'incidence précise reste difficile à évaluer, couplé à l'élimination progressive de l'Ig anti-RH1(D) dans le temps peut induire un risque théorique de perte de la protection contre une immunisation anti-RH1 avant la fin de la grossesse. Le microtitrage pourrait être utile en cas de doute sur cette couverture via sa valeur numérique qui pourra être comparé à 6 ng/mL pour estimer si la femme est toujours protégée ou s'il est recommandé de réinjecter des Ig anti-RH1(D).

Partie 2 : Données expérimentales

1. Objectifs

L'objectif principal de ce travail est de mettre au point la méthode de microtitrage ou microdosage des anticorps anti-RH1(D) la plus performante possible et d'essayer de l'automatiser.

Le microtitrage a été décrit dans les publications du Pr Yves Brossard (39) et repris dans la thèse d'exercice et la publication du Dr Magali Dupont concernant l'intérêt de cette technique dans le suivi de grossesse (57). Ces documents ont servi de base à l'élaboration du microtitrage à l'EFS AURA, sans oublier l'aide des EFS Bretagne et Alpes-Méditerranée utilisant déjà cette technique en routine.

Plusieurs supports microfiltrations ont été testés dans ce travail car certains pourraient permettre une automatisation de la technique. Si le support le plus décrit est la carte gel IgG Biorad®, nous avons essayé deux autres supports microfiltrations disponibles sur site.

Après le choix du support microfiltration, différents paramètres ont été testés pour répondre aux exigences d'une validation de méthode. D'autres tests ont également été réalisés pour connaître la robustesse de la méthode et adapter la fréquence de réalisation des analyses.

Parallèlement, ce travail a permis de proposer des pistes pour les indications du microtitrage d'après les données disponibles dans la littérature et les recommandations des sociétés savantes.

2. Matériel et méthodes

2.1. Echantillons

La validation sur site de la technique du microtitrage a été réalisée au laboratoire d'immunohématologie érythrocytaire (IHE) de l'Établissement Français du Sang Auvergne-Rhône-Alpe, site de Grenoble, de novembre 2020 à mai 2021. Le microtitrage ciblant des femmes enceintes, la grande majorité des échantillons utilisés provient de femmes en âge de procréer, enceintes ou non. 3 échantillons proviennent d'hommes car les plasmas présentent des caractéristiques spécifiques (forte lactescence, ictère, ...).

82 échantillons de patients ont été sélectionnés pour un ou plusieurs tests afin d'obtenir une puissance statistique suffisante pour répondre aux différents critères préconisés pour une validation de méthode. Le sang est prélevé sur tube EDTA et provient des établissements de soins dépendant du site de Grenoble de l'EFS AURA.

Parmi les 82 échantillons, 32 ont permis d'explorer la spécificité du test et les interférences fréquentes en IHE. Ils ont une RAE négative ou identifient un anticorps différent de l'anticorps anti-RH1(D). 5 échantillons concernent des femmes enceintes ayant reçu une injection de Rhophylac® plus de 10 semaines avant le prélèvement. Pour ces 5 prélèvements, la RAE est négative mais le microtitrage s'est révélé positif. Leurs résultats ont donc été traités dans l'analyse de sensibilité de la technique.

Parmi les 27 échantillons restants : 3 présentent un témoin auto positif en RAE, 7 sont visuellement hémolysés, 1 est ictérique, 1 présente de la fibrine, 2 sont lactescents, 7 ont été congelés entre la RAE et le microtitrage, 3 identifient un anti-RH3(E) en RAE, 1 identifie un

anti-RH4(c) en RAE, 1 provient d'un patient traité par Daratumumab et 1 provient d'un patient anciennement traité par Daratumumab® (arrêt du traitement il y a 1 an).

47 échantillons proviennent de patientes ayant reçu récemment une injection d'Ig anti-RH1(D) dont 42 ont une RAE positive identifiant un anticorps anti-RH1(D). La date d'injection et la dose de Rhophylac® sont connues. Les patientes avaient une RAE négative avant injection d'Ig anti-RH1(D). Ces échantillons ont permis d'explorer la sensibilité du test.

Enfin, 8 échantillons de patients connus avec un allo-anticorps anti-RH1(D) ou une association d'allo-anticorps anti-RH1(D) + RH2(C) ont été utilisés pour explorer la sensibilité du microtitrage pour les allo-anticorps.

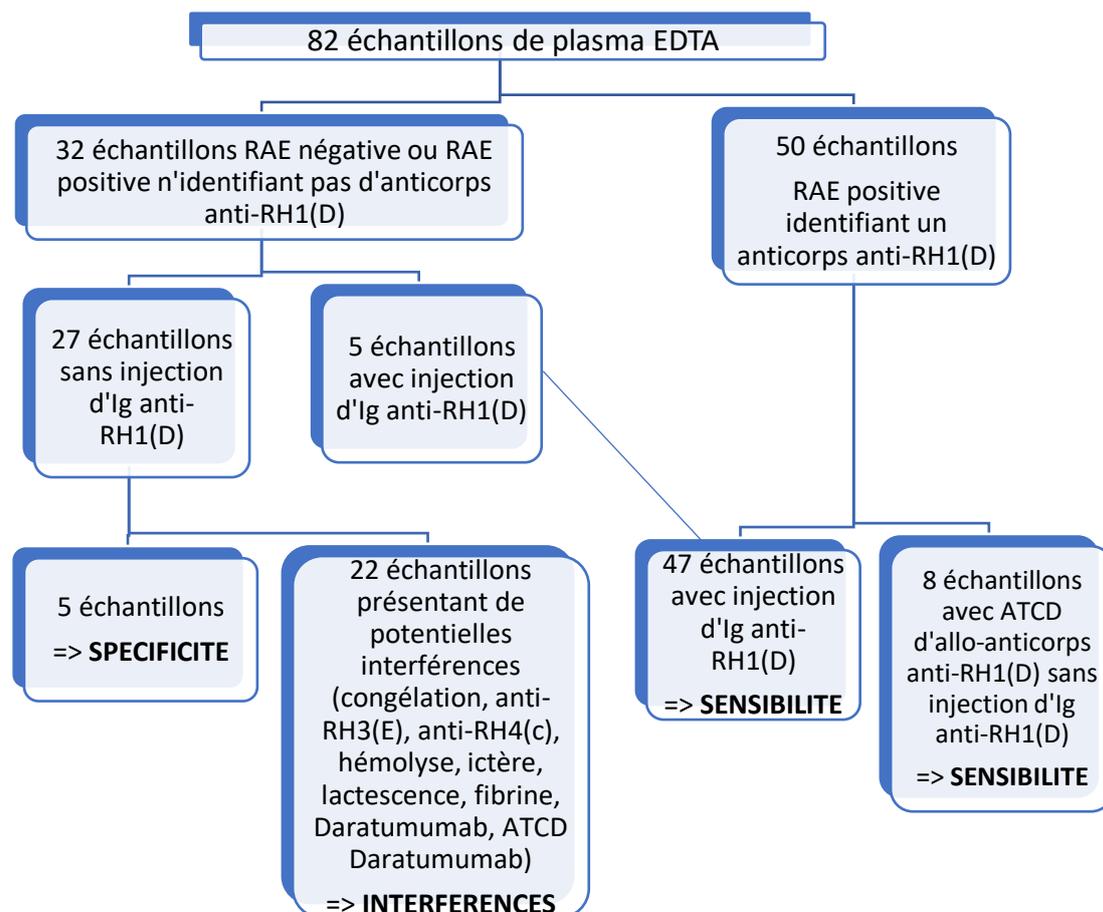


Figure 16 : Répartition des différents échantillons pour les tests de sensibilité, spécificité et interférences de la validation de méthode du microtitrage

2.2. Support microfiltration

Le modèle de support microfiltration utilisé couramment dans les techniques de microtitrage est la carte-gel IgG Biorad®. En mettant en place la technique, il a été décidé de tester, en plus, 2 autres marques de support comprenant des antiglobulines polyvalentes. Les dénominations, images, principes et potentiels d'automatisation des 3 supports sont résumés dans le Tableau V ci-dessous.

Tableau V : Dénomination et image des 3 supports microfiltration testés, ainsi que la possibilité d'automatiser la technique sur un automate disponible à l'EFS AURA site de Grenoble.

Nom du support microfiltration	Image du support	Principe du support	Automatisation possible à l'EFS AURA site de Grenoble ?
IgG Biorad®		Antiglobuline anti-IgG Support gel microfiltration	Non
Ortho BioVue® Coombs IgG C3d Poly		Antiglobuline polyvalente Support avec microbilles de verre	Oui, sur automate ORTHO VISION® Max
DG Gel Coombs Grifols® Configuration AHG		Antiglobuline polyvalente Support gel microfiltration	Non

Dans la suite de ce travail, par soucis de simplicité, les noms des supports sont résumés ainsi : support Biorad®, support OCD® (*Ortho Clinical Diagnostics*®) et support Grifols®.

2.3. Hématies tests utilisées dans le microtitrage

Les hématies-tests utilisées dans la technique ont été définies précisément. Ce sont des hématies de phénotype R0r ou RH:1,-2,-3,4,5, KEL:-1 papainées (référence article : 243759 ; désignation : HEM01), développées par l'UPR de Nantes. Elles sont diluées à 0,8% dans une solution de conservation. Chaque flacon contient 5mL d'hématies diluées.

Le phénotype et le traitement enzymatique permettent d'intensifier la réaction d'agglutination (68). Le traitement par papaine des hématies détruit certains systèmes antigéniques et ainsi augmente l'intensité de réaction des systèmes restants, comme le système Rhésus. Ce traitement enzymatique coupe un certain nombre de charges négatives (type salicylate « COO- ») en surface des hématies, diminuant ainsi la force de répulsion entre elles, ou potentiel zêta (voir Figure 17 ci-dessous). La distance entre les hématies se réduit favorisant la réaction d'hémagglutination.

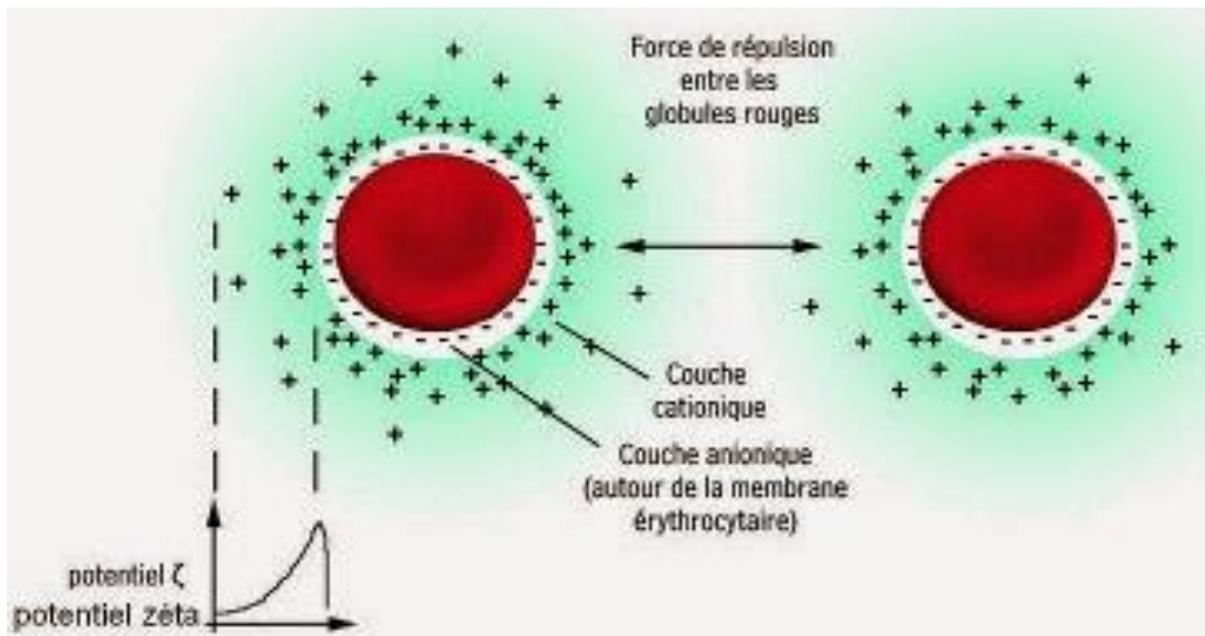


Figure 17: Illustration du potentiel Zêta (source : site internet ToutSurLaTransfusion <https://www.toutsurlatransfusion.com/immuno-hematologie/anticorps/potentiel-zeta.php>)

L'utilisation d'hématies prêtes à l'emploi plutôt que le traitement enzymatique sur site des hématies relève d'une logique d'efficacité et de standardisation. Le traitement par papaïne est une technique longue et l'UPR de Nantes propose des flacons d'hématies traitées à prêtes à l'emploi, utilisés d'ailleurs par d'autres laboratoires d'analyses médicales en France.

Chaque flacon d'hématies se conserve 28 jours à 2-8°C selon la notice fournisseur, cependant des tests complémentaires sur site ont permis d'évaluer la durée de conservation d'un flacon ouvert.

2.4. Etalon anti-RH1(D)

2.4.1. Description

L'étalon interne utilisé pour cette technique est l'étalon international WHO (code NIBSC : 16/332) de concentration en Ig anti-RH1 de 297 UI/mL soit 59,4 µg/mL dans un volume de 100µL. Ce dernier a été dilué sur site à 24 ng/mL et gardé en échantillons congelés de 500µL. Le diluant utilisé est du plasma AB de phénotype RH:1,2,-3,4,5 et KEL:-1 issu de donneur et qualifié pour usage non thérapeutique.

La dilution de l'étalon a été réalisée en deux étapes pour un facteur de dilution total de 1/2475. La concentration finale de l'étalon a été contrôlée par dosage pondéral au LBM de l'EFS Haut-de-France-Normandie, afin de connaître approximativement la concentration réelle de l'étalon dilué. D'autre part, l'incertitude technique de la dilution de l'étalon a été calculée sur la base des incertitudes de mesure issues des qualifications métrologiques des différents appareils utilisés. Le résultat de l'incertitude globale technique est de 0,95%, soit une concentration de 24 +/- 0,228 ng/mL.

2.4.2. Dosage pondéral par un AutoAnalyser

Le dosage pondéral de l'étalon dilué a été réalisé au laboratoire d'IHE du LBM EFS Haut-de-France-Normandie, site de Lille. La méthode utilisée est une technique modifiée de Rosenfield sur AutoAnalyseur à flux continu. L'automate utilisé est associé à un instrument de mesure de densité optique. L'appareil a été également standardisé avec de l'étalon international WHO et utilise des hématies-test de phénotype R1R2 ou RH :1,2,3,4,5

Cette technique présente une incertitude d'au moins 20% pour une concentration aussi faible. L'analyse a été répétée 8 fois pour limiter les erreurs aléatoires. Ce dosage indique une concentration de 25 ng/mL en méthode « 1 temps » et 23 ng/mL en méthode « 2 temps ».

Ainsi la concentration mesurée par dosage pondéral est cohérente avec la cible calculée de 24 ng/mL.

2.5. Recherche d'anticorps érythrocytaire (RAE)

Les techniques de RAE dépistage et RAE identification ont été réalisées sur l'automate ORTHO VISION® Max par le laboratoire d'IHE de l'EFS Auvergne-Rhône-Alpes, site de Grenoble.

Elles sont basées sur le principe d'hémagglutination entre des hématies de phénotype connu et le plasma du patient. L'automate utilise comme support des cassettes ORTHO BIOVUE SYSTEM Anti-IgG, -C3d, polyspecific® contenant des microbilles de verre, et des panels : le panel UPR DNT 01 pour le dépistage et le panel PRU INT01 pour l'identification. Après centrifugation des cassettes, les hématies agglutinées sont retenues par les microbilles et les hématies non agglutinées sédimentent au fond de la colonne.

Le test sur cet automate requiert 2 Contrôles de Qualité Internes (CQI) : 1 CQI anti-RH1 et 1 CQI anti-FY1 (UPR Marseille).

2.6. Microtitrage d'anticorps anti-RH1(D)

2.6.1. Principe

Le microtitrage est un test indirect à l'antiglobuline (TIA) en support solide, soit plus précisément une hémagglutination indirecte en microfiltration. Le plasma de la patiente est mis en contact avec des hématies-tests et il s'en suit 2 phases :

- Une phase d'incubation pour fixer l'anticorps sur le site antigénique des hématies
- Une phase de révélation grâce à l'antiglobuline contenue dans le support de filtration

Chaque puits du support contient une dilution précise du plasma de la patiente. Le profil visuel d'agglutination de la carte est ensuite comparé à celui d'une carte comprenant les dilutions d'un étalon de concentration connue en anti-RH1. Cela permet d'estimer la concentration en anti-RH1 de la patiente.

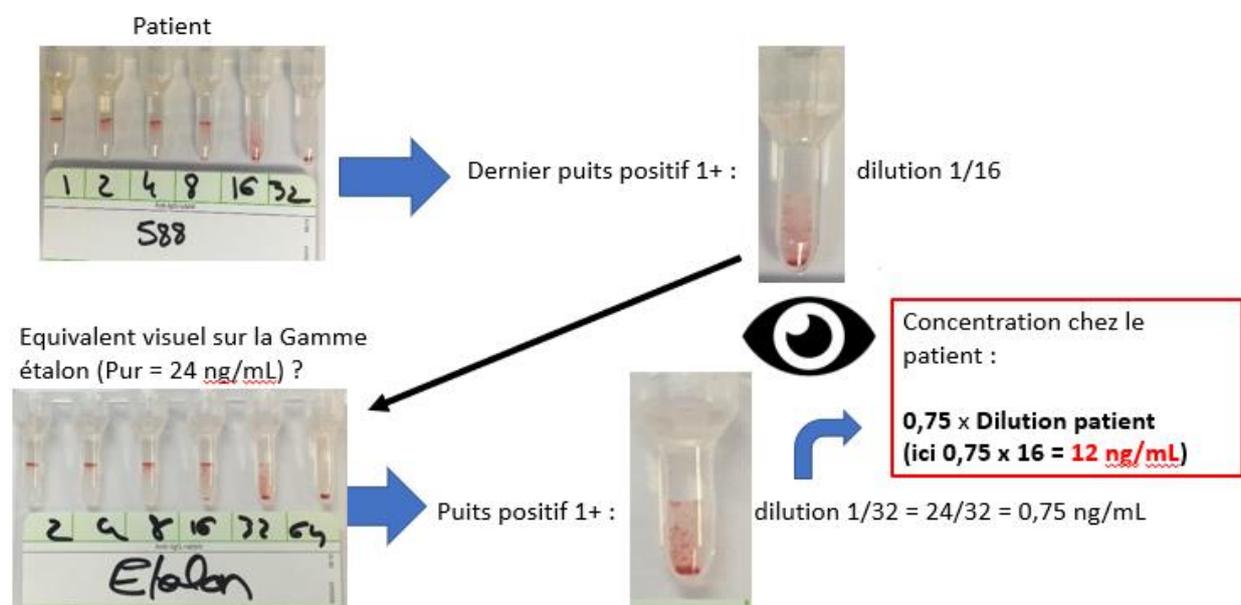


Figure 18: Principe d'interprétation d'un résultat de microtitrage anti-RH1(D). Exemple visuel sur des cartes-gels IgG Biorad®. La concentration du patient en anticorps anti-RH1(D) est de 12 ng/mL selon cette méthode de microtitrage.

2.6.2. Technique

L'ensemble du matériel (tubes à hémolyse et supports microfiltrations) doit être identifié et les dilutions sont notées devant chaque puits des supports.

Diluer le plasma et l'étalon selon des dilutions géométriques de raison 2 avec une solution hypotonique compatible avec le support microfiltration choisi. Puis 50 μ L d'hématies prêtes à l'emploi sont distribuées dans chaque puits et 25 μ L de plasma/étalon dilué est distribué dans les puits correspondants. Ensuite les supports sont incubés 15min à 37°C dans un incubateur adapté. Enfin ils sont centrifugés 5 min à 2500 g dans une centrifugeuse adaptée pour pouvoir révéler la présence d'hémagglutination.

L'étalon est utilisé pour valider la série par la conformité de la concentration retrouvée et la qualité de la décroissance observable entre les différents puits de la carte. Une fois la série validée techniquement, le résultat de chaque échantillon est reporté sur une feuille de paillasse dédiée. Le résultat est ensuite interprété selon la concentration théorique attendue en fonction de la date et la dose de Rhophylac® injectée.

2.6.3. Interprétation

La concentration mesurée est comparée à la concentration théorique attendue calculée à partir de la date et de la dose d'immunoglobulines anti-RH1 injectée (voir Tableau VI ci-dessous). Le microtitrage permet ainsi d'estimer si l'anticorps anti-RH1(D) identifié en RAE provient de l'Ig anti-RH1 injectée précédemment ou d'une allo-immunisation.

La valeur numérique rendue est aussi utile dans le cadre de la prévention ciblée pour estimer si une patiente est toujours protégée par une concentration suffisante en Ig anti-RH1 ou si une nouvelle injection de RHOPHYLAC® est nécessaire.

Tableau VI : Concentrations sériques théoriques attendues en anti-RH1 passifs après administration d'Ig anti-RH1 (33)

Voie	Délai après injection	Concentration après injection de		
		100 µg	200 µg	300 µg
Intraveineuse	1 heure	30 ng/ml	60 ng/ml	90 ng/ml
	24 heures	20 ng/ml	40 ng/ml	60 ng/ml
	48 heures	15 ng/ml	30 ng/ml	45 ng/ml
Intraveineuse ou intramusculaire	1 semaine	12 ng/ml	24 ng/ml	36 ng/ml
	2 semaines	9,5 ng/ml	19 ng/ml	28,5 ng/ml
	3 semaines	7,5 ng/ml	15 ng/ml	22,5 ng/ml
	4 semaines	6 ng/ml	12 ng/ml	18 ng/ml
	5 semaines	4,7 ng/ml	9,4 ng/ml	14,1 ng/ml
	6 semaines	3,8 ng/ml	7,6 ng/ml	11,4 ng/ml
	7 semaines	3 ng/ml	6 ng/ml	9 ng/ml
	8 semaines	2,4 ng/ml	4,8 ng/ml	7,2 ng/ml
	9 semaines	1,9 ng/ml	3,8 ng/ml	5,7 ng/ml
	10 semaines	1,5 ng/ml	3 ng/ml	4,5 ng/ml
	11 semaines	1,2 ng/ml	2,4 ng/ml	3,6 ng/ml
	12 semaines	0,9 ng/ml	1,8 ng/ml	2,7 ng/ml
	13 semaines	0,75 ng/ml	1,5 ng/ml	2,25 ng/ml
	14 semaines	0,6 ng/ml	1,2 ng/ml	1,8 ng/ml
	15 semaines	0,45 ng/ml	0,9 ng/ml	1,35 ng/ml

Exemple : calcul de la concentration maximale attendue chez une patiente ayant reçu 300 µg d'IgRh 8 semaines avant, puis 200 µg d'IgRh 2 semaines avant le prélèvement sanguin : 7,2 + 19 = 26,2 ng/ml.

2.7. Analyse statistique

Des calculs statistiques ont été réalisés sur le logiciel Microsoft Excel. Le coefficient de corrélation de Spearman a été calculé pour comparer les concentrations mesurées en microtitrage et les concentrations théoriques en cas d'anticorps passif (Figure 20).

3. Résultats

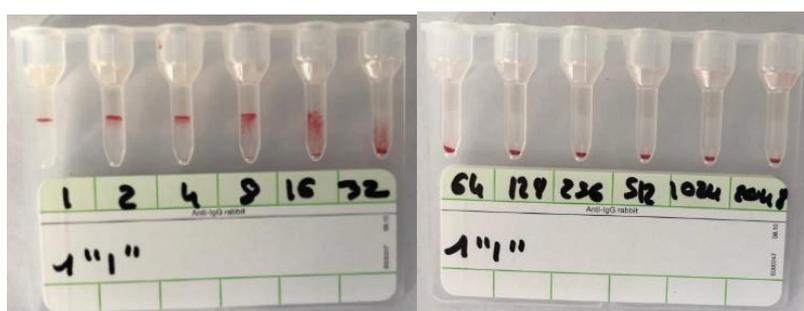
3.1. Choix du support microfiltration

Les trois supports microfiltration (Biorad® - OCD® - Grifols®) ont été testés sur 5 aliquotes congelées de l'étalon international dilué, pour des dilutions géométriques de raison 2 allant jusqu'à 2048. Les résultats sont reportés dans le Tableau VII ci-dessous ; les images des supports microfiltration sont disponibles en Annexe II.

Les modèles OCD® et Grifols® montrent un résultat similaire : malgré une décroissance d'intensité au fil des puits, l'hémagglutination ne se négative pas. Les dernières dilutions positives (DDP) ne sont pas stables entre les 5 échantillons, ce qui est indispensable au rendu du résultat. Pour le support IgG Biorad®, la DDP est 32 pour les 5 aliquotes et l'intensité d'hémagglutination décroît au fil des puits jusqu'à se négativer.

Tableau VII : Intensités d'hémagglutination dans les puits de 3 supports microfiltrations testés (Biorad®, OCD®, Grifols®). Pour Grifols® et OCD® les réactions d'hémagglutination ne se négativent pas et la DDP n'est pas fixe. Pour le support Biorad®, la DDP est claire à la dilution 32 et l'intensité d'hémagglutination décroît au fil des puits jusqu'à se négativer.

Support Biorad®	Dilution											
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
Etalon 1	4	4	4	3	2	1	0.5	0	0	0	0	0
Etalon 2	4	4	3	3	2	1	0.5	0	0	0	0	0
Etalon 3	4	4	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0
Etalon 4	4	4	3	3	2	1	0.5	0	0	0	0	0
Etalon 5	4	4	4	3	2	1	0.5	0	0	0	0	0



Images de l'étalon 1 (Biorad®) :

Support OCD®	Dilution											
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
Etalon 1	4	4	3	3	2	2	1	1	1	1	1	0.5
Etalon 2	4	4	4	3	3	2	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5
Etalon 3	4	4	4	3	3	2	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Etalon 4	4	4	3	3	3	2	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5
Etalon 5	4	4	3	3	3	2	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5



Image de l'étalon 1 (OCD®) :

Support Grifols®	Dilution											
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
Etalon 1	4	3	3	3	2	2	1	1	1	0.5	0.5	1
Etalon 2	4	4	4	3	2	2	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Etalon 3	X	4	4	3	3	2	1	1	1	0.5	0.5	1
Etalon 4	4	4	4	3	3	2	1	0.5	1	0.5	0	0.5
Etalon 5	4	4	4	3	3	2	1	0.5	1	0.5	0.5	0.5

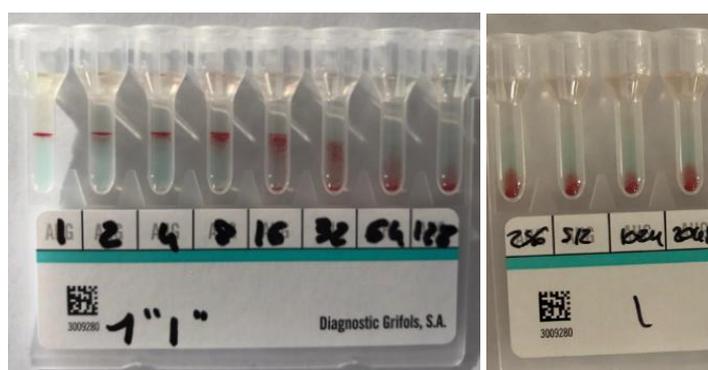


Image de l'étalon 1 (Grifols®) :

D'après ces résultats, les supports filtrations OCD® et DG Gel Coombs AHG Grifols® ne semblent pas convenir pour une technique de microtitrage d'anticorps anti-RH1(D). Le support IgG Biorad® est plus fiable dans son rendu de la DDP. La suite de la mise en place de la méthode a donc été réalisée avec les supports filtration IgG Biorad®.

3.2. Validation de la méthode sur carte gel IgG Biorad®

3.2.1. Répétabilité

Ici, un test de répétabilité permet d'évaluer l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'une mesure sur support IgG Biorad®. L'étalon international dilué a été analysé 5 fois par le même technicien, le même jour, au même endroit et le résultat et le rendu visuel de chaque puits ont été comparés. Les résultats sont synthétisés dans le Tableau VIII ci-dessous.

Tableau VIII : Résultats du test de répétabilité sur un étalon anti-RH1(D) dilué à 24 ng/mL : la dernière dilution positive est 32, l'intensité d'hémagglutination décroît au fil des dilutions et les puits à garder pour rester sur 1 carte à 6 puits sont les puits 2 à 64 (intensités 4+ à 0,5+/0)

Gel testé	Dilution											
BIORAD IgG	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
Etalon 1	4	4	4	3	2	1	0.5	0	0	0	0	0
Etalon 2	4	4	3	3	2	1	0.5	0	0	0	0	0
Etalon 3	4	4	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0
Etalon 4	4	4	3	3	2	1	0.5	0	0	0	0	0
Etalon 5	4	4	4	3	2	1	0.5	0	0	0	0	0
Puits à garder (jaune = cadre de lecture)						X						

Les résultats du test de répétabilité sont conformes aux critères définis dans le protocole de validation de méthode :

- les puits d'une même dilution ont au maximum une dilution d'écart
- le rendu visuel est satisfaisant et tous les niveaux d'intensité sont représentés
- la dernière dilution positive (1+) correspond à la même dilution sur les cinq cartes

Ce test de répétabilité permet également d'optimiser le support microfiltration de l'étalon. La carte comporte 6 puits : en ne distribuant pas l'échantillon non dilué, nous pouvons réaliser un étalon microtitrage sur une seule carte tout en conservant le visuel d'une intensité 4+ (dilution 2) à 0,5+/0 (dilution 64).

3.2.2. Test de reproductibilité

Nous avons testé 10 aliquotes de l'étalon international dilué à 24 ng/mL. Chaque aliquote a ensuite été testé en microtitrage à des jours différents et en alternant entre deux professionnels habilités au titrage d'anticorps anti-érythrocytaires. Les résultats sont disponibles ci-dessous dans le Tableau IX.

Tableau IX : Résultats du test de reproductibilité sur étalon anti-RH1(D) dilué à 24 ng/mL : la dernière dilution positive est 32. Les variations de jour ou d'opérateur n'affecte pas le résultat du microtitrage. Le cadre de lecture de la dilution 2 à 64 utilisé 5 fois montre des intensités d'hémagglutination de 4+ à 0. (NR = Non Réalisé)

Operateur (Initiales)	Jour du test	Dilution											
		1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
EB	08/01/2021	4	4	4	3	2	1	NR	NR	NR	NR	NR	NR
AM	12/01/2021	4	4	3	3	2	1	0.5	0	0	0	0	0
AM	19/01/2021	4	4	3	3	2	1	NR	NR	NR	NR	NR	NR
AM	25/01/2021	NR	4	4	3	2	1	0	NR	NR	NR	NR	NR
EB	26/01/2021	NR	4	4	3	2	1	0	NR	NR	NR	NR	NR
AM	26/01/2021	NR	4	3	3	2	1	NR	NR	NR	NR	NR	NR
EB	27/01/2021	NR	4	4	3	2	1	0	NR	NR	NR	NR	NR
AM	28/01/2021	4	4	3	3	2	1	0.5	0	0	0	0	0
EB	03/02/2021	NR	4	4	3	3	2	0	NR	NR	NR	NR	NR
AM	15/02/2021	NR	4	4	3	2	1	0	NR	NR	NR	NR	NR
Dernière Dilution Positive (jaune = cadre de lecture)							X						

Les résultats de reproductibilité selon le jour du test sont en accord avec les critères d'acceptation du protocole de validation de méthode :

- les puits d'une même dilution ont au maximum une dilution d'écart
- le rendu visuel est satisfaisant et environ tous les niveaux d'intensité sont représentés
- la DDP correspond à la même dilution : la dilution 32, interprétable sur les 7 échantillons où un résultat au puits 64 (intensité 0,5 ou 0) est renseigné

Il n'y a pas de variabilité inter-opérateur car les résultats des échantillons testés sont reproductibles. Un nombre supplémentaire d'opérateurs est prévu ultérieurement lors de l'habilitation de nouvelles personnes.

3.2.3. Spécificité et interférences

27 échantillons dont la RAE n'identifie pas d'anticorps anti-RH1(D) ont été testés en microtitrage. Les résultats sont reportés dans le Tableau X ci-dessous.

25 échantillons donnent des concentrations négatives en microtitrage. Ainsi, on peut estimer que les caractéristiques suivantes ne sont pas des interférences pour la technique de microtitrage :

- Congélation du plasma
- Témoin auto positif en RAE
- Présence de fibrine
- Hémolyse, lactescence ou ictère
- Antécédent de traitement par Daratumumab arrêté depuis 1 an
- Présence d'un anticorps anti-RH3(E) identifié en RAE

Au contraire, un plasma dans lequel a été identifié un anticorps anti-RH4(c) de forte intensité en RAE a donné un résultat positif > 384 ng/mL en microtitrage (voir Figure 19 ci-dessous). Également, le plasma d'un patient actuellement sous traitement par Daratumumab® a été testé et une interférence homogène, sans décroissance d'intensité, est visible dans tous les puits des cartes-gels. Cependant, le traitement par Daratumumab® chez une femme enceinte est très rare donc il n'y a pas eu d'exploration complémentaire.

Tableau X : Résultat des tests de spécificité et interférences du microtitrage. La présence d'un témoin auto positif en RAE, la fibrine, l'hémolyse, la lactescence, la congélation, un ATCD de traitement par Daratumumab arrêté depuis plus d'un an et la présence d'un anticorps anti-RH3(E) n'interfèrent pas avec le microtitrage. La présence d'un anticorps anti-RH4(c) et le traitement par Daratumumab interfèrent avec le microtitrage. (NR = Non-Rendu)

Numéro d'échantillon	Date d'analyse	Congélation	Résultat RAE	Témoin auto en RAE	Interférence potentielle	Résultat microtitrage (en ng/mL)
1821030471	25/01/2021	Oui	Négative			0
1821030478	25/01/2021	Oui	Négative			0
1820511029	25/01/2021	Oui	Négative		Fibrine	0
1820510561	25/01/2021	Oui	Négative	3+		0
1821040003	25/01/2021	Non	Négative			0
1821040030	25/01/2021	Non	Négative			0
1821040038	25/01/2021	Non	Négative			0
1821040012	25/01/2021	Non	Négative			0
1820510828	28/01/2021	Oui	Négative	1+		0
1821030443	28/01/2021	Oui	anti-E	1+		0
1821040453	28/01/2021	Non	Négative		DARA arrêté il y a plus d'un an	0
1821040567	28/01/2021	Non	Négative		Hémolyse	0
1821040524	28/01/2021	Non	Négative			0
1821040544	28/01/2021	Non	Anti-E			0
1821041125	01/02/2021	Non	Négative		Hémolyse	0
1821041126	01/02/2021	Non	Négative		Hémolyse	0
1821041141	01/02/2021	Non	Négative		Hémolyse	0
1821050009	01/02/2021	Non	Négative		Hémolyse	0
1821050013	01/02/2021	Non	Négative		Hémolyse	0
1821040957	01/02/2021	Non	Négative		Lactescence	0
1821041120	01/02/2021	Non	Négative		Hémolyse	0
1821041069	01/02/2021	Non	Négative		Ictère	0
1821041031	01/02/2021	Non	Négative		Lactescence	0
1820510093	01/02/2021	Oui	Négative			0
1820511007	01/02/2021	Oui	Anti-E			0
1821030416	28/01/2021	Oui	Anti-c			> 384
1821030491	28/01/2021	Oui	NR		Daratumumab	NR

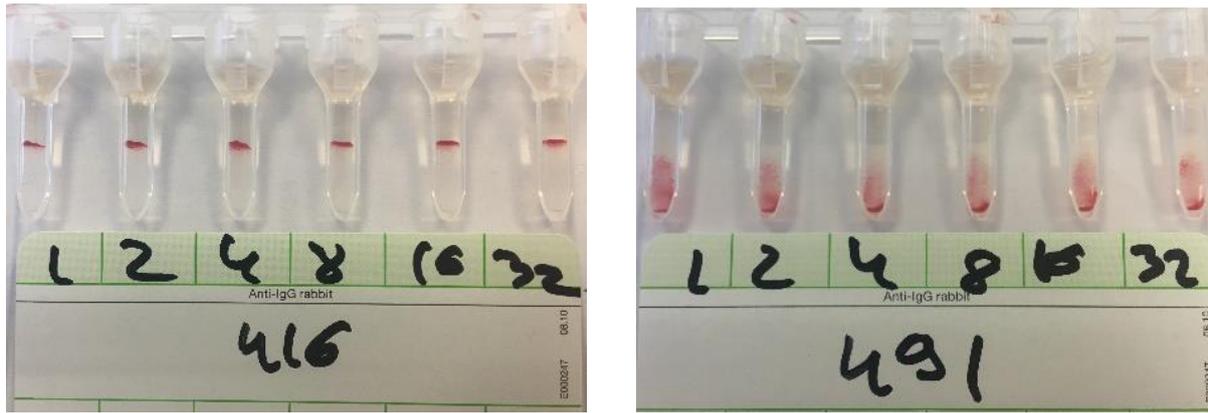


Figure 19 : Photographies de support Biorad® testés avec 50µL d'hématies test et 25µL de plasma par puit. La dilution du plasma, dans du plasma AB, est renseignée sur le puits. Les puits du support de gauche contiennent un plasma identifiant un anticorps anti-RH4(c) en RAE et sont d'intensité 4+. Les puits du support de droit contiennent le plasma d'un patient traité activement par Daratumumab et sont d'intensité 2+ sans décroissance.

3.2.4. Sensibilité et limite de détection

47 échantillons de patientes ayant reçu récemment une injection d'Ig anti-RH1(D) ont été analysés par microtitrage. Cela inclut les 5 échantillons dépistés négatifs en RAE mais pour lesquelles les patientes avaient reçu du Rhophylac® il y a plus de 10 semaines.

Tableau XI : Résultats de sensibilité du microtitrage. Les analyses sont positives malgré une RAE parfois négative, d'où l'importance des renseignements sur la date et la dose injectée.

Numéro d'échantillon	Date d'analyse	Date de prélèvement	Résultat RAE (intensité)	Résultat microtitrage (en ng/mL)	Délai entre injection et prélèvement	Date d'injection d'Ig anti-RH1(D)	Dose d'Ig anti-RH1(D) reçue (en µg)	Concentration théorique si anticorps passif
1820501037	15/01/2021	12/12/2020	2+	3	57	16/10/2020	300	5.43
1820500784	19/01/2021	10/12/2020	3+	24	2	08/12/2020	200	28.25
1820500901	19/01/2021	10/12/2020	3+	12	37	03/11/2020	300	14.83
1820510001	19/01/2021	13/12/2020	1+	1.5	96	08/09/2020	200	1.68
1820501040	19/01/2021	11/12/2020	0.5+/1+	1.5	87	15/09/2020	200	2.21
1820500747	25/01/2021	10/12/2020	3+	24	2	08/12/2020	200	28.25
1820500899	25/01/2021	10/12/2020	3+	24	3	07/12/2020	200	27.42
1820510173	25/01/2021	14/12/2020	2+	3	44	31/10/2020	200	8.01
1820510917	25/01/2021	18/12/2020	2+	6	29	19/11/2020	200	12.57

1820520005	25/01/2021	21/12/2020	2+	3	46	05/11/2020	300	7.55
1820510118	25/01/2021	14/12/2020	0.5+/1+	1.5	83	22/09/2020	300	2.49
1820520300	25/01/2021	21/12/2020	1+	1.5	59	23/10/2020	200	5.11
1821020189	25/01/2021	11/01/2021	0.5+	1.5	54	18/11/2020	200	5.94
1821030410	25/01/2021	19/01/2021	0.5+	0.75	67	13/11/2020	200	4.02
1821030980	26/01/2021	22/01/2021	2+	6	33	20/12/2020	200	11.15
1821030816	26/01/2021	22/01/2021	0.5+/1+	1.5	80	03/11/2020	200	2.72
1821030946	26/01/2021	23/01/2021	2+	3	39	15/12/2020	200	9.31
1821031021	26/01/2021	23/01/2021	1+	3	53	01/12/2020	200	6.12
1821040001	26/01/2021	25/01/2021	2+	3	60	26/11/2020	200	4.96
1821040081	26/01/2021	24/01/2021	0.5+/2+	1.5	58	27/11/2020	200	5.27
1821040094	26/01/2021	22/01/2021	1+	3	59	24/11/2020	200	5.11
1821031047	26/01/2021	23/01/2021	1+	3	25	29/12/2020	200	14.17
1821040156	26/01/2021	25/01/2021	1+	3	65	21/11/2020	200	4.27
1820500756	28/01/2021	09/12/2020	3+	12	20	19/11/2020	200	16.46
1820511079	28/01/2021	20/12/2020	2+	3	55	26/10/2020	200	5.76
1821021172	28/01/2021	16/01/2021	3+	12	18	29/12/2020	200	17.48
1821040493	28/01/2021	26/01/2021	1+/2+	3	59	28/11/2020	200	5.11
1821040353	28/01/2021	26/01/2021	2+	6	27	30/12/2020	200	13.35
1821040397	28/01/2021	26/01/2021	0.5+	1.5	84	03/11/2020	200	2.41
1821040584	28/01/2021	27/01/2021	3+	24	16	11/01/2021	300	27.85
1821040531	28/01/2021	27/01/2021	3+	24	2	25/01/2021	200	28.25
1820510174	25/01/2021	14/12/2020	Négative	1.5	77	28/09/2020	200	2.98
1821040092	25/01/2021	25/01/2021	Négative	1.5	73	13/11/2020	200	3.36
1820511064	28/01/2021	20/12/2020	Négative	3	94	17/09/2020	300	2.68
1820500826	01/02/2021	10/12/2020	Négative	3	73	28/09/2020	200	3.36
1821030922	26/01/2021	22/01/2021	Négative	0.75	93	21/10/2020	200	1.84
1820490588	15/02/2021	02/12/2020	3+	12	28	04/11/2020	200	12.95
1820501027	15/02/2021	12/12/2020	3+	12	29	13/11/2020	200	12.57
1820501039	15/02/2021	12/12/2020	3+	24	12	30/11/2020	300	31.40
1820511004	15/02/2021	19/12/2020	2+	6	44	05/11/2020	300	12.02
1820511005	15/02/2021	18/12/2020	2+	6	58	21/10/2020	300	7.90
1820510898	15/02/2021	18/12/2020	2+	6	45	03/11/2020	200	7.78
1820510769	15/02/2021	17/12/2020	2+	6	40	07/11/2020	200	9.04
1820510511	15/02/2021	18/12/2020	2+	6	47	01/11/2020	200	7.32
1821061075	15/02/2021	12/02/2021	2+	3	67	07/12/2020	200	4.02
1821061064	15/02/2021	12/02/2021	3+	12	27	16/01/2021	200	13.35
1821070055	15/02/2021	13/02/2021	2+	6	39	05/01/2021	200	9.31

Tous les 47 échantillons ont un test de microtitrage positif.

La comparaison des résultats en microtitrage par rapport à la concentration attendue selon la date et la dose de Rhophylac® reçue est disponible sur la Figure 20 ci-dessous. Les concentrations mesurées en microtitrage sont très proches des concentrations théoriques attendues selon la pharmacocinétique du Rhophylac®.

Aucun point aberrant n'a été relevé. 1 concentration mesurée en microtitrage (3 ng/mL) a été trouvée supérieure à la concentration théorique attendue (2,68 ng/mL). Néanmoins, les deux concentrations sont très proches donc il n'y a pas eu d'investigation complémentaire.

Certaines concentrations mesurées sont plus faibles que les concentrations théoriques. Il peut s'agir d'HFM silencieuses qui n'ont pas pu être détectées cliniquement, elles sont la cible de la prévention systématique par Rhophylac® à 28 SA.

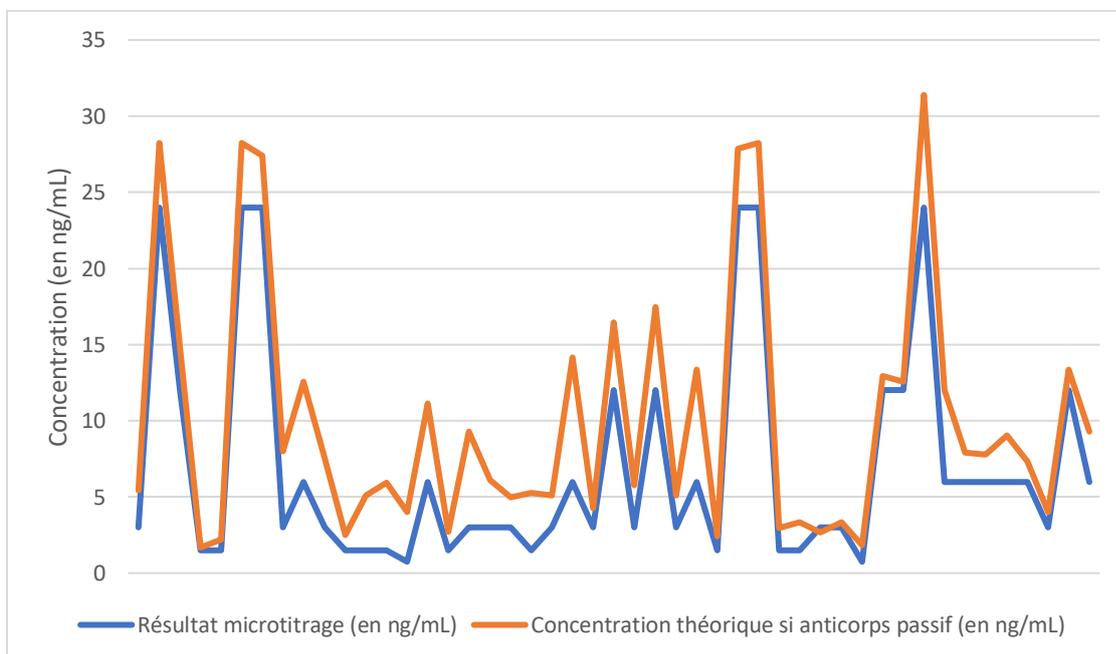


Figure 20 : Comparaison des concentrations mesurées en microtitrage avec les concentrations théoriques d'après la date d'injection de Rhophylac® et la dose reçue : concentrations visuellement similaires sans grande disparité. Concentration théorique souvent supérieure visuellement à la concentration mesurée mais les HFM silencieuses ne peuvent être renseignées

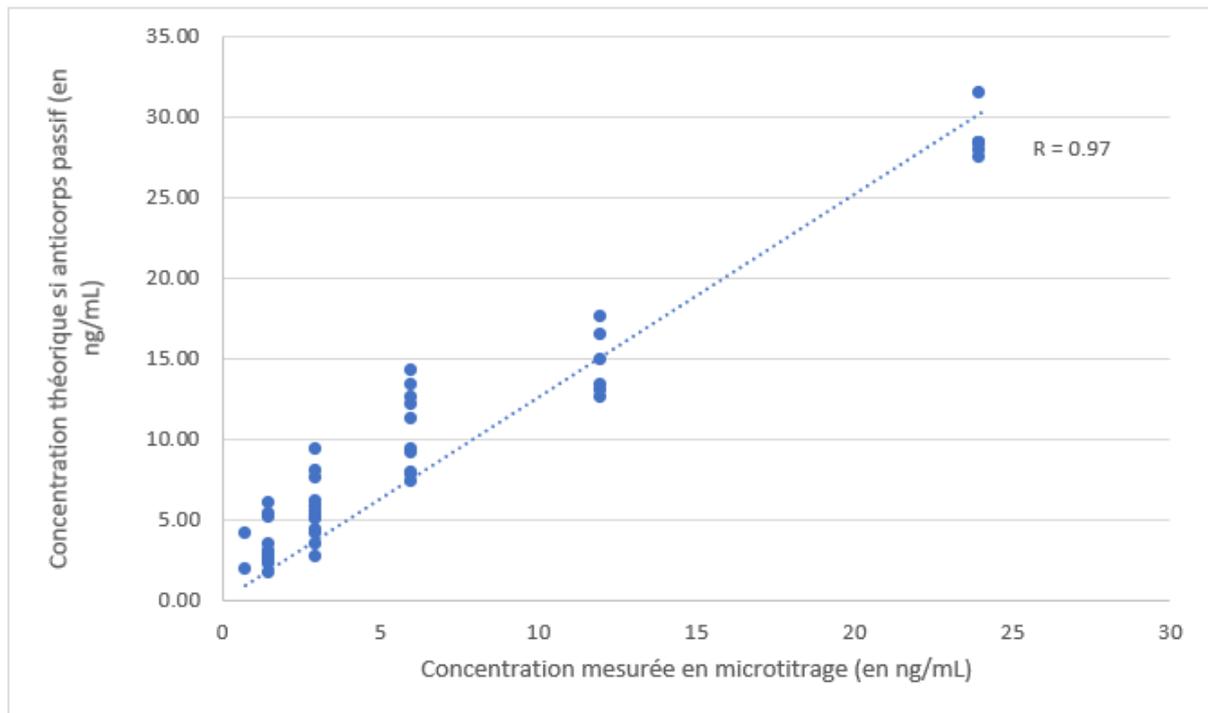


Figure 21 : Coefficient de corrélation entre la concentration mesurée en microtitrage et la concentration théorique attendue en anticorps anti-RH1(D) d'après les données pharmacocinétiques des Ig anti-RH1(D). Le coefficient de corrélation "r" est de 0,97.

La technique de microtitrage montre des résultats très bien corrélés à la concentration théorique attendue d'après la date d'injection d'Ig anti-RH1(D) et la dose reçue. En effet, le coefficient de corrélation de Spearman calculé est de 0,97 (Figure 21).

Les résultats des 8 patients connus avec au moins un allo-anticorps anti-RH1(D) présentant une RAE positive, d'intensité différente, identifiant au moins un anti-RH1(D) sont disponibles dans le Tableau XII. Leurs tests de microtitrage ont tous été positifs donc le microtitrage est efficace pour détecter des allo-anticorps anti-RH1(D).

Tableau XII : Résultats du microtitrage pour les 8 patients connus avec un allo-anticorps anti-RH1(D) et présentant une RAE positive identifiant au anticorps anti-RH1(D). Tous les échantillons sont positifs en microtitrage.

Numéro d'échantillon	Date d'analyse	Date de prélèvement	Congélation	Résultat RAE (intensité)	Témoin auto en RAE	Interférence potentielle	Résultat microtitrage
1820501013	19/01/2021	11/12/2020	Oui	2+			3
1821030817	26/01/2021	22/01/2021	Non	4+	1+		>192
1821031156	26/01/2021	24/01/2021	Non	1+			1.5
1821040141	26/01/2021	25/01/2021	Non	4+			96
1820520449	28/01/2021	22/12/2020	Oui	3+		Anti-RH2(C)	12
1821030463	28/01/2021	20/01/2021	Oui	4+		Anti-RH2(C)	>385
1820510513	28/01/2021	16/12/2020	Oui	3+			48
1821040354	28/01/2021	25/01/2021	Non	3+			48

Pour déterminer la limite de détection selon le protocole de validation de méthode, nous considérons la dilution la plus faible exploitable, c'est-à-dire une réaction positive dans le puit de dilution 1 (plasma pur) d'intensité correspondant à la dernière dilution positive de la carte-étalon. Cette DDP étant généralement au puit de dilution 32 sur la carte-gel de l'étalon soit une concentration de 0,75 ng/mL. On peut considérer qu'une équivalence avec le puit de plasma pur de la patiente est la limite de détection, c'est-à-dire : 0,75 ng/mL.

3.2.5. Robustesse

Plusieurs tests de robustesse ont été réalisés pour cette méthode de microtitrage afin d'évaluer la stabilité dans le temps de plusieurs éléments.

Tout d'abord, la stabilité des hématies-tests après ouverture du flacon a été évaluée. Pour cela, un test de microtitrage a été reproduit plusieurs jours consécutifs sur une nouvelle aliquote d'étalon congelé à chaque fois. Le flacon d'hématies-tests utilisé a été ouvert à J0 du test et puis gardé fermé à 2-8°C entre chaque jour. Les résultats obtenus sont disponibles dans le Tableau XIII ci-dessous.

Tableau XIII : Résultats de stabilité d'un flacon d'hématies-tests à 2-8°C. Les intensités restent similaires jusqu'à J11 inclus. A J14, les intensités augmentent par puits, même si la dernière dilution positive reste 32.

Gel testé	DILUTION					
	2	4	8	16	32	64
BIORAD IgG						
J0	4	4	3	2	1	0
J1	4	4	3	2	1	0
J2	4	4	3	2	1	0
J3	4	4	3	2	1	0
J4	4	3	3	2	1	0
J7	4	4	3	2	1	0
J9	4	4	3	2	1	0
J10	4	3	3	2	1	0
J11	4	4	3	2	1	0
J14	4	4	4	3	2	0.5
J16	4	4	3	3	2	0.5

L'écart d'intensité par puits diffère au maximum de 1 au fil des jours. La dernière dilution positive reste 32, cependant son intensité augmente de 1 à 2 à partir de J14. Cela pourrait compromettre la concordance aux puits de support microfiltration des patients. Ainsi, on peut estimer qu'un flacon ouvert d'hématies-test peut être gardé jusqu'à 11 jours à 2-8°C.

Dans un second temps, la stabilité des échantillons a été étudiée en utilisant une aliquote d'étalon dilué, un échantillon patient avec RAE négative, deux échantillons avec RAE positive identifiant un anti-RH1(D) d'intensité différente avec injection récente de Rhophylac®, et un échantillon avec RAE positive identifiant un anti-RH1(D) chez un patient connu avec un allo-anticorps anti-RH1(D). Les échantillons ont été testés par microtitrage à J0, J4, J7 et J11 et ont été gardés à 2-8°C entre les tests. Les résultats sont disponibles dans le Tableau XIV.

Tableau XIV : Stabilité d'échantillons à 2-8°C avec des microtitrages réalisés à J0, J4, J7 et J11. L'écart d'intensité par puits n'excède pas 1 et la dernière dilution positive reste identique.

Numéro d'échantillon	Date de prélèvement	Congélation	Résultats des dilutions (J0 = 26/01/2021 J4 = 01/02/2021 J7 = 04/02/2021 J11 = 08/02/2021)												Dernière dilution pertinente			
				1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048		
Etalon dilué 24 ng/mL	08/01/2021	Oui	J0	4	4	3	3	2	2	0.5	0	0	0	0	0	1/32 (2+)		
			J4	4	4	3	3	2	2	0.5	0	0	0	0	0	1/32 (2+)		
			J7	4	4	3	3	2	1	0.5	0	0	0	0	0	1/32 (1+)		
			J11	4	4	4	3	3	2	0.5	0	0	0	0	0	1/32 (2+)		
1821040524 RAE négative	27/01/2021	Non	J0	0	0	0	0	0	0							0		
			J4	0	0	0	0	0	0								0	
			J7	0	0	0	0	0	0									0
			J11	0	0	0	0	0	0									0
1821040397 Anti-D passif RAE : 0,5+	26/01/2021	Non	J0	3	2	0.5	0	0	0							1/2 (2+)		
			J4	3	2	0.5	0	0	0								1/2 (2+)	
			J7	3	2	0.5	0	0	0									1/2 (2+)
			J11	3	2	0.5	0	0	0									1/2 (2+)
1821040584 Anti-D passif RAE : 3+	27/01/2021	Non	J0	4	4	4	3	2	1	0	0	0	0	0	0	1/32 (1+)		
			J4	4	4	3	3	2	1	0.5	0	0	0	0	0	0	1/32 (1+)	
			J7	4	4	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1/32 (1+)	
			J11	4	4	4	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1/32 (1+)	
1821040354 Allo-anticorps anti-D RAE : 3+	25/01/2021	Non	J0	4	4	4	4	4	3	2	1	0	0	0	0	1/128 (1+)		
			J4	4	4	4	4	3	2	2	1	0	0	0	0	1/128 (1+)		
			J7	4	4	4	4	3	2	2	1	0	0	0	0	0	1/128 (1+)	
			J11	4	4	4	4	3	3	2	1	0.5	0	0	0	0	1/128 (1+)	

Les 5 échantillons testés à J0, J4, J7 et J11 montrent des profils d'intensité similaires : il n'y a pas d'écart d'intensité supérieur à 1 par puits et la dernière dilution positive reste la même. L'intensité de la DDP est identique, sauf à J7 pour l'étalon dilué. Il est cependant admis une stabilité des échantillons 11 jours à 2-8°C.

4. Discussion

Les objectifs de ce travail comprennent la validation d'une méthode de microtitrage ou microdosage des anticorps anti-RH1(D), la comparaison de différents supports microfiltrations pour une automatisation potentielle à l'EFS site de Grenoble, et des propositions d'indications pour cette analyse.

Les résultats de répétabilité, reproductibilité, sensibilité, spécificité et robustesse de la technique de microtitrage sont conformes aux critères de validation définis. Un programme d'EEQ ou, à défaut, une comparaison inter-laboratoire (CIL) sont envisageables, en collaboration avec d'autres LBM réalisant la méthode. La technique est simple, peu chronophage et compatible avec l'activité de routine. La stabilité des réactifs et des échantillons sur plus d'une semaine donne de la souplesse dans la réalisation de l'analyse, permettant d'optimiser l'organisation de l'activité du laboratoire.

Les hématies-tests utilisées sont de phénotype RH:1,-2,-3,4,5 (R0r). Les tests de spécificité ont montré une absence d'interférences des anticorps anti-RH3(E) sur le microtitrage. L'antigène RH3(E) étant absent des hématies-tests, les anticorps ciblant des antigènes absents des hématies-tests (C, E) n'interfèrent pas avec le résultat. Ceci permettra donc d'envisager la méthode de microtitrage d'anticorps anti-RH1(D) chez des patientes également allo-immunisées contre des antigènes RH3(E) et/ou RH2(C).

L'automatisation de la technique n'est actuellement pas compatible avec le parc automate disponible à l'EFS AURA, qui comprend un automate ORTHO VISION® Max d'OCD®. Les supports microfiltrations OCD® sont difficiles à lire et le résultat des tests de répétabilité

ne permet pas d'envisager un déploiement de la méthode sur un tel support. Il est néanmoins possible d'envisager une automatisation de la méthode de microtitrage avec des cartes-gels Biorad® sur automate Biorad® comme cela a été mis en place par Beaud et al en 2019 sur IH 500 Biorad®(69). Dans cette perspective, le parc automate disponible en AURA est un frein à l'automatisation de la méthode définie comme un des objectifs de ce travail.

La composition du gel Biorad® (contenant une antiglobuline anti-IgG) peut expliquer la différence de réactivité observée par rapport aux supports Grifols® et OCD® (contenant des antiglobulines polyvalentes). Ainsi, l'utilisation d'un modèle de support microfiltration OCD® contenant une antiglobuline anti-IgG et compatible avec l'automate ORTHO VISION® Max pourrait être une autre piste vers l'automatisation en AURA, si un tel modèle de support est disponible en France.

Concernant les indications du microtitrage des anticorps anti-RH1(D), cette analyse est pratiquée couramment dans certaines régions françaises car plébiscitée par certains établissements de soins. Elle est également citée dans les recommandations du CNGOF. Néanmoins la demande est variable d'une région à l'autre. Elle fait partie, en France, des analyses d'IHE réalisables par l'EFS, mais n'est pas encore développée dans la région AURA.

Comme cité précédemment, 3 types de prévention de l'immunisation maternelle sont proposés en France chez la femme RH:-1 enceinte d'un fœtus RH:1 selon le contexte et le stade de la grossesse : la prophylaxie ciblée, la prévention systématique à 28 SA et l'injection en post-partum. Le document cadre de portée nationale de l'EFS recommande l'utilisation du microtitrage :

- Devant une absence de diminution d'intensité de l'agglutination entre 2 RAE en 15 jours ou plus.
- Devant l'absence d'information concernant l'injection potentielle d'Ig anti-RH1(D)
- Devant une intensité réactionnelle incohérente avec la date d'injection d'Ig anti-RH1 annoncée
- En cas d'absence de RAE négative dans les 7 jours précédents l'injection d'Ig anti-RH1

La littérature fait bien état de son rôle dans la différenciation d'anticorps passifs après injection d'Ig anti-RH1 et d'allo-immunisation anti-RH1. L'article de Dupont et al (57) met bien en évidence l'efficacité de la technique dans cette indication, et ouvre la possibilité d'utiliser cette analyse avant de réinjecter du Rhophylac® dès-lors qu'un seuil acceptable a été trouvé.

Comme présenté précédemment, 6 ng/mL est un seuil acceptable qui permet de garder une marge de sécurité vis-à-vis d'HFM ultérieures, d'après la littérature concernant la pharmacocinétique du médicament, le volume des HFM, et la physiologie de la femme enceinte. Par ailleurs, cette indication avec un seuil de 6 ng/mL est déjà utilisée pour le microtitrage dans d'autres régions et donne de bons résultats.

La publication de Dupont et al (57) invite à considérer que les Ig anti-RH1(D) s'équilibrent entre les compartiments vasculaires et extravasculaires. Ainsi, une quantité de Rhophylac® serait sûrement présente en extravasculaire, non dosable par prélèvement sanguin mais disponible en cas de consommation du Rhophylac® plasmatique, donnant un potentiel de neutralisation d'hématies fœtales plus important que dosé dans le sang. Ces éléments permettent d'expliquer la difficulté d'interprétation du microtitrage dans les 48h suivant l'injection de Rhophylac® (57).

Ce travail ouvre également une perspective intéressante sur l'utilisation du microtitrage pour ne proposer une nouvelle injection de Rhophylac® qu'aux patientes dont la protection n'est plus assurée par la dose précédente. Cette indication, bien que peu documentée dans la littérature, s'inscrit dans une logique de limitation de l'exposition des patientes à des Ig anti-RH1. En effet, bien que considéré comme un médicament très bien toléré, le Rhophylac® reste un médicament dérivé du sang (MDS). Il comporte donc des risques de transmission d'agents pathogènes. Un risque éthique est également à relever : le Rhophylac® est produit en injectant des hématies RH1 à des donneurs RH:-1 rémunérés. En France, cette pratique reposait initialement sur du bénévolat, puis elle a été interdite dans les années 1980 pour causes éthiques et sécuritaires. L'utilisation, dans un pays, d'un médicament dont la production est interdite sur les concitoyens peut interroger. Également, les donneurs étant transfusés avec des hématies RH1, les prélever ensuite est une pratique interdite au nom de la sécurité sanitaire. On peut aussi noter que la production est massivement issue de donneurs d'Amérique du Nord. Ainsi, l'importation est très coûteuse par rapport à une production locale (48).

Dans une approche sécuritaire de limitation d'exposition des sujets aux produits dérivés du sang, le génotypage fœtal a déjà permis de diminuer la prescription de Rhophylac® de 40% en limitant les indications aux femmes RH:-1 porteuses de fœtus génotypés RH:1. La prescription d'un test de microtitrage avant chaque réinjection de Rhophylac® peut ainsi compléter les analyses IHE utilisables dans cet objectif : il permet d'éviter une sur-prescription de ce médicament, tout en assurant la protection des patientes contre une allo-immunisation anti-RH1(D). Le coût d'un test de microtitrage, en moyenne 27€, est également favorable par rapport au coût d'une dose de Rhophylac (85€ pour 200µg).

Une alternative à l'utilisation de ce MDS serait l'utilisation d'anticorps monoclonaux, cependant aucun n'est pour l'instant commercialisé. Le critère principal d'efficacité est la clairance des hématies fœtales, et le Roledumab[®], en Phase 3 depuis plusieurs années maintenant, est le médicament le plus prometteur à l'heure actuelle. Cette alternative permettrait de résoudre les problèmes éthiques soulevés vis-à-vis du Rhophylac[®].

Pour continuer sur les indications de la méthode de microtitrage, les conclusions d'un groupe de travail de 2019 indiquent qu'il est nécessaire d'harmoniser les indications du microtitrage et du dosage pondéral. En effet, ce groupe de travail, à l'initiative du CNRHP et présenté au congrès SFTS le 19 septembre 2019, a pour objectifs de faire un état des lieux du suivi IH des grossesses en France, et de réviser les recommandations françaises. Les conclusions intermédiaires font état d'un très bon respect de la chaîne impliquant une RAE positive, l'identification de l'anticorps jusqu'au titrage si l'anticorps est d'intérêt obstétrical. Cependant, il conclut aussi sur un manque d'harmonisation des pratiques concernant les techniques de quantification autres que le titrage : microtitrage et dosage pondéral. Ainsi, on peut s'attendre à une actualisation des recommandations aux vues de nouvelles données et technologies disponibles.

Dans d'autres pays, les recommandations n'impliquent pas nécessairement les mêmes analyses dans des situations d'allo-immunisation foëto-maternelles (70).

Aux États-Unis par exemple, l'ACOG (*American College of Obstetricians and Gynecologists*) ne recommande que le titrage de l'anticorps identifié après une RAE positive. Le titre critique varie de 8 à 32 selon le laboratoire. Dépasser ce titre déclenche un suivi par la mesure régulière du PSV-ACM. Le titre initial retrouvé conditionne également la fréquence de suivi par titrage (71).

Au Royaume-Uni, un anticorps anti-RH1(D) identifié sur RAE durant une grossesse est directement quantifié par dosage pondéral, sans titrage, d'après les recommandations du RCOG (*Royal College of Obstetricians and Gynecologists*) de 2014 (41). Le risque évalué par la quantification est ensuite confronté au phénotype du conjoint pour déterminer ensuite un potentiel suivi par la mesure régulière du PSV-ACM.

L'avènement dans les années 2000 du suivi échographique foëtal et du génotypage foëtal par des techniques non invasives (PSV-ACM et génotypage foëtal sur sang maternel) ont changé l'intérêt porté aux tests de prédiction des MHFN. Ainsi, les disparités de techniques d'analyses s'observent entre les pays, souvent par abandon de techniques lourdes comme le dosage pondéral. Néanmoins, des techniques simples comme le microtitrage peuvent permettre d'alléger la prescription d'Ig anti-RH1 sans nécessiter d'importants investissements financiers, d'espace ou de temps.

5. Conclusion

Le microtitrage ou microdosage d'anticorps anti-RH1(D) est une technique de quantification des anticorps anti-RH1(D) dont l'intérêt est grandissant avec l'utilisation mondiale des immunoglobulines anti-RH1(D), depuis plusieurs décennies, dans le cadre de la prophylaxie de la MHFN.

Ce travail a permis de valider une méthode de microtitrage spécifique, sensible et robuste, mais non automatisable compte-tenu du parc automate disponible sur le site de l'EFS de Grenoble. Néanmoins, le support microfiltration Biorad® retenu dans ce travail permet une automatisation sur automate Biorad®, comme l'IH 500.

Ce travail a permis de proposer différentes indications de prescription du microtitrage :

- Différencier un allo-anticorps anti-RH1(D) d'un anticorps passif après injection d'Ig anti-RH1(D) (Rhophylac®) lorsque les intensités réactionnelles ne sont pas cohérentes avec la date de l'injection ou lorsqu'une RAE n'a pas été réalisée dans les 7 jours précédant l'injection.
- Evaluer la nécessité de réinjecter du Rhophylac® en cas de situation à risque d'hémorragie foëto-maternelle, et donc d'immunisation anti-RH1(D). Si la concentration sanguine maternelle en Ig anti-RH1(D) est supérieure au seuil de 6 ng/mL, une nouvelle injection pourra être évitée.

En effet, ce médicament, bien que sécuritaire, doit cependant être utilisé a minima, de par son statut de médicament dérivé du sang dont la production impliquant des donneurs rémunérés peut poser des questions éthiques. Ainsi, un microtitrage systématique pourrait être envisagé avant toute nouvelle injection de Rhophylac®. Ceci permettrait de compléter l'arsenal d'analyses d'immunohématologie érythrocytaire disponibles pour le suivi des femmes enceintes en situation d'incompatibilité foëto-maternelle.

THÈSE SOUTENUE PAR : Edouard BONNEVILLE

**TITRE : VALIDATION D'UNE METHODE DE RECHERCHE D'ANTICORPS
ERYTHROCYTAIRES ANTI-RH1 EN MICROTITRAGE A L'ETABLISSEMENT
FRANÇAIS DU SANG AUVERGNE-RHÔNE-ALPES**

CONCLUSION :

Le microtitrage ou microdosage d'anticorps anti-RH1(D) est une technique de quantification des anticorps anti-RH1(D) dont l'intérêt est grandissant avec l'utilisation mondiale des immunoglobulines anti-RH1(D), depuis plusieurs décennies, dans le cadre de la prophylaxie de la MHFN.

Ce travail a permis de valider une méthode de microtitrage spécifique, sensible et robuste, mais non automatisable compte-tenu du parc automate disponible sur le site de l'EFS de Grenoble. Néanmoins, le support microfiltration Biorad® retenu dans ce travail permet une automatisation sur automate Biorad®, comme l'IH 500.

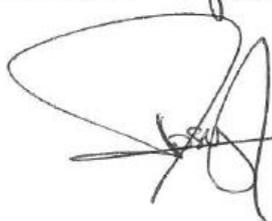
Ce travail a permis de proposer différentes indications de prescription du microtitrage :

- Différencier un allo-anticorps anti-RH1(D) d'un anticorps passif après injection d'Ig anti-RH1(D) (Rhopylac®) lorsque les intensités réactionnelles ne sont pas cohérentes avec la date de l'injection ou lorsqu'une RAE n'a pas été réalisée dans les 7 jours précédant l'injection.
- Evaluer la nécessité de réinjecter du Rhophylac® en cas de situation à risque d'hémorragie fœto-maternelle, et donc d'immunisation anti-RH1(D). Si la concentration sanguine maternelle en Ig anti-RH1(D) est supérieure au seuil de 6 ng/mL, une nouvelle injection pourra être évitée.

En effet, ce médicament, bien que sécuritaire, doit cependant être utilisé *a minima*, de par son statut de médicament dérivé du sang dont la production impliquant des donneurs rémunérés peut poser des questions éthiques. Ainsi, un microtitrage systématique pourrait être envisagé avant toute nouvelle injection de Rhophylac®. Ceci permettrait de compléter l'arsenal d'analyses d'immunohématologie érythrocytaire disponibles pour le suivi des femmes enceintes en situation d'incompatibilité fœto-maternelle.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 4 Jun 2021



Pr MOSSUZ Pascal
Chef du service d'HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE
Institut de Biologie et Pathologie
CHU Grenoble-Alpes

LE DOYEN : Michel SEVE




LE DIRECTEUR DE THESE :

Dr Claudine GIROUX-LATHUILE



LE TUTEUR UNIVERSITAIRE :

Pr Pascal MOSSUZ



Pr MOSSUZ Pascal
Chef du service d'HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE
Institut de Biologie et Pathologie
CHU Grenoble-Alpes

Bibliographie

1. Practical Transfusion Medicine. Practical Transfusion Medicine. 2005.
2. Haute Autorité de Santé. Détermination prénatale du génotype RHD foetal à partir du sang maternel [Internet]. 2011. Available from: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2011-10/rapport_genotypage_foetal.pdf
3. Urbaniak SJ. Alloimmunity to RhD in humans. *Transfus Clin Biol*. 2006;13(1-2 SPEC. ISS.):19–22.
4. Mannessier L. Suivi de l'allo-immunisation fœto-maternelle. *Transfus Clin Biol*. 2003;10(3):258–62.
5. Wylie BJ, D'Alton ME. Fetomaternal hemorrhage. *Obstet Gynecol*. 2010;115(5):1039–51.
6. Chown B. Anaemia from bleeding of the fetus into the mother's circulation. *Obstet Gynecol Surv*. 1954;9(6):851–3.
7. Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstrichs. *Klin Wochenschr*. 1957;35(12):637–8.
8. Zipursky A, Pollack J, Neelands P, Chown B, Israels LG. The transplacental passage of foetal red blood cells and the pathogenesis of Rh immunisation during pregnancy. *Obstet Gynecol Surv*. 1964;19(2):233–5.
9. Bowman J. The management of hemolytic disease in the fetus and newborn. *Semin Perinatol*. 1997;21(1):39–44.
10. Woodrow JC, Donohoe WTA. Rh-immunization by Pregnancy: Results of a Survey and Their Relevance to Prophylactic Therapy. *Br Med J*. 1968;4(5624):139–44.
11. Hendrickson JE, Delaney M. Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn: Modern Practice and Future Investigations. *Transfus Med Rev* [Internet]. 2016;30(4):159–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmr.2016.05.008>
12. Hildén J -O, Gottvall T, Lindblom B. HLA phenotypes and severe Rh(D) immunization. *Tissue Antigens*. 1995;46(4):313–5.
13. Kumar US, Ghosh K, Gupte SS, Gupte SC, Mohanty D. Role of HLA antigens in Rh (D) alloimmunized pregnant women from Mumbai, Maharashtra, India. *J Biosci*. 2002;27(2):135–41.
14. Yazer MH, Bruncker PA, Bakdash S, Tobian AAR, Triulzi DJ, Earnest V, et al. Low incidence of D alloimmunization among patients with a serologic weak D phenotype after D+ transfusion. *Transfusion*. 2016;56(10):2502–9.
15. Phyllis A, Dennery MD. Neonatal Hyperbilirubinemia. *English J*. 2001;344(8):581–90.
16. Watchko JF, Lin Z. Exploring the genetic architecture of neonatal hyperbilirubinemia. *Semin Fetal Neonatal Med* [Internet]. 2010;15(3):169–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2009.11.003>

17. Lauer BJ, Spector ND. Hyperbilirubinemia in the newborn. *Pediatr Rev.* 2011;32(8):341–9.
18. Huguet-Jacquot S, Toly-Ndour C, Cortey A, Carbonne B, Mailloux A. Diagnostic et suivi biologiques des allo-immunisations anti-érythrocytaires chez la femme enceinte. *Rev Francoph des Lab.* 2015;
19. Moise KJ. Red blood cell alloimmunization in pregnancy. *Semin Hematol.* 2005;42(3):169–78.
20. Tormey CA, Hendrickson JE. Transfusion-related red blood cell alloantibodies: Induction and consequences. *Blood.* 2019;133(17):1821–30.
21. Brossard Y. La maladie hémolytique du nouveau-né par incompatibilité fœto-maternelle. *Rev Française des Lab.* 2001;2001(329):7–10.
22. Pyzik M, Sand KMK, Hubbard JJ, Andersen JT, Sandlie I, Blumberg RS. The neonatal Fc Receptor (FcRn): A misnomer? *Front Immunol.* 2019;10(JULY).
23. Elefant É. Le passage placentaire des immunoglobulines. *Bull Acad Natl Med.* 2012;196(8):1601–12.
24. Miquel E, Cavelier B, Bonneau JC, Rouger P. Incompatibilités fœtomaternelles érythrocytaires (IFME) : de la surveillance immunohématologique des femmes enceintes à la maladie hémolytique du nouveau-né (MHNN). *Transfus Clin Biol.* 2005;12(1):45–55.
25. Nordvall M, Dziegiel M, Hegaard HK, Bidstrup M, Jonsbo F, Christensen B, et al. Red blood cell antibodies in pregnancy and their clinical consequences: Synergistic effects of multiple specificities. *Transfusion.* 2009;49(10):2070–5.
26. Markham KB, Rossi KQ, Nagaraja HN, O’Shaughnessy RW. Hemolytic disease of the fetus and newborn due to multiple maternal antibodies. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015;213(1):68.e1-68.e5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.01.049>
27. Bennett PR, Kim CL Van, Colin Y, Warwick RM, Cherif-Zahar B, Fisk NM, et al. Prenatal Determination of Fetal RhD Type by DNA Amplification. *N Engl J Med* [Internet]. 1993 Aug 26;329(9):607–10. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199308263290903>
28. Alfirevic Z, Navaratnam K, Mujezinovic F. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;2017(9).
29. Guinchard E, Bricca P, Monnier S, Rigal D. RHD fœtal sur plasma maternel: Validation de méthode sur 200 patientes. *Transfus Clin Biol* [Internet]. 2014;21(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2013.12.001>
30. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA, et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood.* 1999;93(1):385–93.
31. Chan FY, Cowley NM, Wolter L, Stone M, Carmody F, Saul A, et al. Prenatal RHD gene determination and dosage analysis by PCR: Clinical evaluation. *Prenat Diagn.* 2001;21(4):321–6.

32. Collège national des gynécologues et obstétriciens français (CNGOF). Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D fœto-maternelle. Recommandations pour la pratique clinique élaborées par le Collège national des gynécologues et obstétriciens français. *Gynecol Obstet Fertil*. 2006;
33. Cortey A, Mailloux A, Huguet-Jacquot S, Castaigne-Meary V, Macé G, N'Guyen A, et al. Incompatibilités fœtomaternelles érythrocytaires. *EMC - Pédiatrie - Mal Infect*. 2012;7(3):1–22.
34. Lieberman L, Andrews J, Evans MD, Cohn CS. Comparison of prenatal anti-D titration testing by gel and tube methods: A review of the literature. *Transfusion* [Internet]. 2021 Apr 2;trf.16388. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/trf.16388>
35. Novaretti MCZ, Jens E, Pagliarini T, Bonifácio SL, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Comparison of conventional tube test with diamed gel microcolumn assay for anti-D titration. *Clin Lab Haematol*. 2003;25(5):311–5.
36. Flesiopoulou I, Pouliakis A, Politou M, Dourouki A, Damaskos C, Koutsouri T, et al. Red Blood Cell Alloantibody Titration - Does the Titration Method Matter? *Clin Lab* [Internet]. 2020;66(06/2020). Available from: <http://www.clin-lab-publications.com/article/3383>
37. Moore BPL. Automation in the blood transfusion laboratory: I Antibody detection and quantification in the Technicon AutoAnalyzer. *Canad Med Ass J*. 1969;100(Blood Transfusion Laboratory):381–7.
38. Toly-Ndour C, Mourtada H, Huguet-Jacquot S, Maisonneuve E, Friszer S, Pernot F, 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):294–305.
39. Brossard Y, Parnet-Mathieu F, Larsen M. Diagnostic et suivi prénatals des allo-immunisations érythrocytaires. *Feuillets de Biologie*. 2002. p. 11–7.
40. Huguet-Jacquot S, Toly-Ndour C, Cortey A, Carbonne B, Mailloux A. Diagnostic et suivi biologiques des allo-immunisations anti-érythrocytaires chez la femme enceinte. *Rev Francoph des Lab* [Internet]. 2015;2015(470):73–80. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X\(15\)30035-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X(15)30035-6)
41. Royal College of Obstetricians & Gynaecologists. The Management of Women with Red Cell Antibodies during Pregnancy. *Manag Women with Red Cell Antibodies Dur Pregnancy*. 2014;(65):1–26.
42. Mari G. Noninvasive Diagnosis by Doppler Ultrasonography of Fetal Anemia Due to Maternal Red-Cell Alloimmunization. *Obstet Gynecol Surv*. 2000;55(6):341–2.
43. Friszer S, Maisonneuve E, Macé G, Castaigne V, Cortey A, Mailloux A, et al. Determination of optimal timing of serial in-utero transfusions in red-cell alloimmunization. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;46(5):600–5.
44. Girault A, Friszer S, Maisonneuve E, Guilbaud L, Cortey A, Jouannic JM. Intrauterine blood transfusion: Status report of 4 years of practice in France (2011–2014). *J Gynecol*

- Obstet Hum Reprod. 2017;46(2):119–24.
45. Schonewille H, Klumper FJCM, van de Watering LMG, Kanhai HHH, Brand A. High additional maternal red cell alloimmunization after Rhesus- and K-matched intrauterine intravascular transfusions for hemolytic disease of the fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(2):143.e1-143.e6.
 46. Academy A, Cgr P, National C, Sat EFS, Saint EFS, Efs A, et al. Procédure Exsanguino - transfusion (EST) du nouveau - né pour correction d'une hyperbilirubinémie et/ou anémie. 2013;1–34.
 47. Pollack W, Gorman JG, Hager HJ, Freda VJ, Tripodi D. Antibody-mediated immune suppression to the rh factor: Animal models suggesting mechanism of action. *Obstet Gynecol Surv.* 1969;24(1):23–6.
 48. Carbonne B, Brossard Y. Prévention de l'allo-immunisation anti-D: des années 1970 à l'avènement des immunoglobulines monoclonales ?Prevention of alloimmunization: from the 1970s to the advent of monoclonal immunoglobulins? *Rev médecine périnatale.* 2013;5(4):208–12.
 49. Branger B, Winer N. Épidémiologie de l'allo-immunisation anti-D pendant la grossesse. *J Gynécologie Obs Biol la Reprod.* 2006;
 50. Parant O. [Comparison of the efficacy of different methods for the prevention of anti-D allo-immunization during pregnancy: targeted strategy limited to risk situations or associated with systematic prevention in the 3rd trimester]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* [Internet]. 2006 Feb;35(1 Suppl):1S93–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16495834>
 51. Poissonnier MH. La prévention de l'allo-immunisation érythrocytaire fœto-maternelle Rhésus. *J Gynecol Obs Biol Reprod.* 2007;36:S12–5.
 52. Zwingerman R, Jain V, Hannon J, Zwingerman N, Clarke G. Alloimmune Red Blood Cell Antibodies: Prevalence Pathogenicity in a Canadian Prenatal Population. *J Obstet Gynaecol Canada.* 2015;37(9):784–90.
 53. Pal M, Williams B. Prevalence of maternal red cell alloimmunisation: A population study from Queensland, Australia. *Pathology.* 2015;47(2):151–5.
 54. Brinc D, Lazarus AH. Mechanisms of anti-D action in the prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009;185–91.
 55. Kumpel BM, Elson CJ. Immune Suppression – a Paradox Awaiting Resolution ? 2001;22(1):26–31.
 56. Cortey A, Brossard Y, Biologiques ET, Immunoglobulines DES, Vendittelli F, Gallot D, et al. Recommandations pour la pratique clinique Effets indésirables et information des patientes. *Biol Reprod.* 2006;35(69408):112–8.
 57. Dupont M, Gouvitsos J, Dettori I, Chiaroni J, Ferrera V. Intérêt de la technique de microtitrage des anticorps anti-RH1 dans le suivi immunohématologique des femmes enceintes. *Transfus Clin Biol.* 2007;14(4):381–5.
 58. MacKenzie IZ, Bichler J, Mason GC, Burnett Lunan C, Stewart P, Al-Azzawi F, et al.

- Efficacy and safety of a new, chromatographically purified rhesus (D) immunoglobulin. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;117(2):154–61.
59. Bichler J, Schöndorfer G, Pabst G, Andresen I. Pharmacokinetics of anti-D IgG in pregnant RhD-negative women. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2003;110(1):39–45.
 60. Bowman JM, Pollock JM. Failures of Intravenous Rh Immune Globulin Prophylaxis: An Analysis of the Reasons for Such Failures. Vol. 1, *Transfusion Medicine Reviews.* 1987. p. 101–12.
 61. Polesky HF. Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence, and clinical effects. *Transfusion.* 1990;30(4):344–57.
 62. Pollack W, Ascari WQ, Crispen JF, O'Connor RR, Ho TY. Studies on Rh Prophylaxis. *Transfusion.* 1971;11(6):340–4.
 63. Mannessier L, Alie-Daram S, Roubinet F, Valat AS, Depoortère MH, Fournié A, et al. [Prevention of hemolytic disease of the fetus and the newborn: it is necessary to act]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* [Internet]. 2000 Sep;29(5):441–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11011272>
 64. Kohne E. 50 Years Kleihauer-Betke test. *Klin Padiatr.* 2007;219(5):252–3.
 65. Cortey A, Brossard Y. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D foeto-maternelle - Aspects pratiques. *J Gynecol Obs Biol Reprod.* 2006;35(Supplément 1):123–30.
 66. Ravinet J, Carbonne B. Recommandations pour la pratique clinique Analyse économique de la prévention de l' immunisation anti-D. 2006;35(69408):104–11.
 67. Aguree S, Gernand AD. Plasma volume expansion across healthy pregnancy: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2019;19(1):1–11.
 68. KUHNS WJ, BAILEY A. Use of red cells modified by papain for detection of Rh antibodies. *Am J Clin Pathol.* 1950;20(11):1067–9.
 69. Beaud J, Delaby H, Toly-Ndour C, Mailloux A, Huguet-Jacquot S. Evaluation au CNRHP de l'automate IH-500 (Bio-Rad®) pour le microtitrage des anti-D (anti-RH1). *Transfus Clin Biol* [Internet]. 2019 Sep;26(3):S58–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1246782019301491>
 70. Bettelheim D, Panzer S, Reesink HW, Csapo B, Pessoa C, Guerra F, et al. Monitoring and treatment of anti-D in pregnancy. *Vox Sang* [Internet]. 2010 Mar 17;99(2):177–92. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1423-0410.2010.01322.x>
 71. Porter TF. ACOG Practice Bulletin No. 192: Management of Alloimmunization During Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2018;131(3):e82–90.

ANNEXE I : Circonstances pouvant induire des hémorragies fœto-maternelles au cours de la grossesse

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

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

Aux deuxième et troisième trimestres

Risque important de passage d'hématies fœtales :

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

Risque modéré de passage d'hématies fœtales :

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

ANNEXE II : Image des tests de comparaison des 3 types de support microfiltration

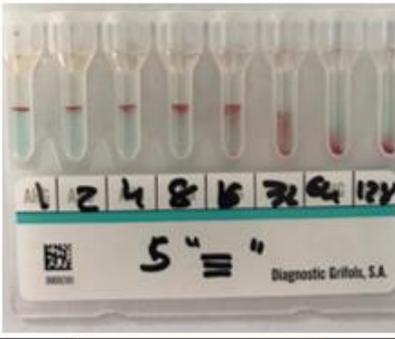
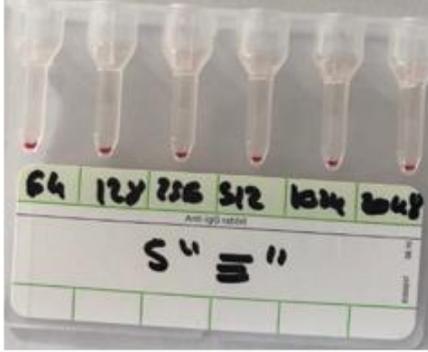
Etalon 1 (24 ng/mL)		
IgG Biorad®	Poly Ortho Clinical Diagnostics®	DG Gel Coombs AHG Grifols®

Etalon 2 (24 ng/mL)		
IgG Biorad®	Poly Ortho Clinical Diagnostics®	DG Gel Coombs AHG Grifols®

Etalon 3 (24 ng/mL)		
IgG Biorad®	Poly Ortho Clinical Diagnostics®	DG Gel Coombs AHG Grifols®
		
		

Etalon 4 (24 ng/mL)		
IgG Biorad®	Poly Ortho Clinical Diagnostics®	DG Gel Coombs AHG Grifols®
		
		

Etalon 5 (24 ng/mL)

IgG Biorad®	Poly Ortho Clinical Diagnostics®	DG Gel Coombs AHG Grifols®
		
		

ANNEXE III : Protocole de validation de méthode du microtitrage

Protocole de Validation de Méthode du Microtitrage anti- RH1 (D)

NATURE DE L'ANALYSE : Recherche d'anticorps anti-érythrocytaires RH1 par microtitrage

PORTEE D'ACCREDITATION : PORTEE FLEXIBLE ETENDUE (B)

La technique est manuelle, mises au point par le laboratoire IHE de l'EFS de Grenoble pour laquelle il n'existe pas d'équivalent « fournisseur ».

METHODE UTILISEE : HEMAGGLUTINATION INDIRECTE EN MICROFILTRATION SUR GEL **METHODE QUALITATIVE (EXAMEN A LECTURE SUBJECTIVE)**

La méthode comporte 2 phases :

- Une phase d'incubation permettant la fixation de l'anticorps sur le site antigénique correspondant présent sur les hématies tests
- Une phase de révélation à l'aide d'une anti-globuline contenue dans le support de filtration

La lecture de l'intensité des agglutinats est réalisée par l'œil de l'opérateur.

- Une réaction positive traduit la présence d'un anticorps dans le plasma (hématies tests en liseré au sommet du gel ou dispersées dans le gel).
- Une réaction négative traduit l'absence d'anticorps dans le plasma (hématies tests sédimentées au fond du puit du gel)

Principe de la méthode : Dosage des anticorps anti-RH1 plasmatiques par comparaison visuelle à une gamme étalon de concentration connue en anticorps anti-RH1. La concentration plasmatique est ensuite comparée aux concentrations théoriques après administration d'anticorps IgG anti-RH1 (RHOPHYLAC®) pour déterminer le caractère passif (ACP) ou allo d'un anticorps anti-RH1.

Contexte d'utilisation de la méthode :

Méthode utilisée pour quantifier des anticorps anti-RH1 supposés passifs chez une femme enceinte :

- Devant une absence de diminution d'intensité de l'agglutination entre 2 RAI
- Devant une absence d'information concernant l'injection potentielle d'IgG anti-RH1
- Devant une intensité réactionnelle incohérente par rapport à la date renseignée d'injection des IgG anti-RH1
(RAA/LAB/IHE/FI/109) : Intensité > +++ à > 1 mois Intensité > ++ à > 50 jours Intensité > + à > 70 jours

SITE : IHE GRENOBLE

METHODE QUALITATIVE - : PROCESSUS SIMPLE (1 SEULE ETAPE)

Les documents suivants sont gardés en annexe du protocole de validation de méthode :

- Référence des réactifs, numéro de lot et péremption des supports réactionnels, diluants et solution de lavage utilisés
- Feuilles de travail (avec images et résultats par puits réactionnels si automats)
- Identification et résultats des prélèvements de patients dans la technique de comparaison (si nécessaire)
- Identification et résultats des CIQ utilisés (si nécessaire)

PARAMETRES	BIBLIO	VALIDATION SUR SITE	CRITERES ATTENDUS
<u>Rétabilité</u>	NA	Réalisé pour chaque type de carte-gel, sur des aliquotes de l'étalon RH1 dilué. Le même opérateur réalise au minimum 5 fois le microtitrage	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Lisibilité facile ➤ Au maximum 1 dilution d'écart pour le rendu des résultats ➤ Dernière dilution positive identique
<u>Fidélité intermédiaire /Reproductibilité (intra-laboratoire)</u> <u>Variabilité inter opérateur</u>	NA	NA - Méthode qualitative Au moins 5 microtitrages de l'étalon à réaliser sur plusieurs jours par différents membres du LBM	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dernière dilution positive identique ➤ Différence d'intensité de 1+ tolérée pour chaque puit ➤ Lisibilité facile ➤ Intensités de réaction dégressive allant de « 4+ » à « 0/0,5+ »
<u>Justesse</u>	NA	NA - Méthode qualitative	
<u>Exactitude</u>	NA	NA – Méthode qualitative Une approche de l'exactitude est réalisée par l'analyse des résultats d'EEQ si disponibles en validation initiale. Option 2 : comparaison au dosage pondéral réalisé à Lille	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dernière dilution positive (1+) identique pour l'EEQ ➤ Concentration similaire avec erreur tolérée de 20% pour le DP
<u>Spécificité (Vrais négatifs)</u>	Non	Non – absence de méthode de référence au sens strict du terme (cf SH GTA 04). Voir limite de détection Par type de carte : <ul style="list-style-type: none"> ➤ Test au minimum sur 5 échantillons de routine avec RAI négative ➤ Test au minimum sur 5 échantillons congelés avec RAI négative ➤ Test au minimum sur 1 échantillon avec RAI positive anti-E $\text{Spécificité} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$ Avec VN = Vrais Négatifs ; FP = Faux Positifs	<p>90-100% Toute discordance sera explorée</p>

<u>Sensibilité</u> <u>(Vrais positifs)</u>	Non	Non – absence de méthode de référence au sens strict du terme (cf SH GTA 04). Voir limite de détection Tests sur échantillons de routine : ➤ Test au minimum sur 5 échantillons de routine avec un anticorps passif anti-RH1 RHOPHYLAC® ➤ Test au minimum sur 5 échantillons de routine avec un allo-anticorps anti-RH1	90-100% Toute discordance sera explorée
<u>Incertitudes de mesure</u>	Oui (si disponible)	Oui (cf. analyse de risque de la méthode)	
<u>Limite de détection</u>	Oui	Oui : évaluer la limite de détection d'un anticorps anti-RH1 La limite de détection correspond à la dernière cotation 1+ disponible, à savoir la concordance visuelle entre une intensité de réaction établie à 1+ pour le patient et la même intensité 1+ de l'étalon	< 6 ng/mL (seuil théorique pertinent pour la protection contre une hémorragie foeto-maternelle)
<u>Interférences</u>	Oui	Hémolyse, Turbidité, Ictère, Fibrine, Lactescence – Non évalué Test sur échantillons de routine et/ou congelés : - Test au minimum sur 1 échantillon jugé hémolysé - Test au minimum sur 1 échantillon présentant de la fibrine - Test au minimum sur 1 échantillon jugé lactescent - Test au minimum sur 1 échantillon jugé ictérique - Test au minimum sur 1 échantillon de patient traité par Daratumumab	Fiche fournisseur et analyse de risque (hémolyse, anticorps monoclonaux thérapeutiques ou pathologiques)
<u>Comparaison avec méthode du laboratoire</u>	Oui	NA – nouvelle méthode au sein de la région Méthode correspondant aux descriptions de la littérature : - Y. Brassard et al. Diagnostic et suivis prénatals des allo-immunisations érythrocytaires. Feuilletts de biologie 2002-vol XXXVIII n°245:11-17 - Bichler J, Schandorfer G, Pabst G, Andresen I. Pharmacokinetics of anti-D IgG in pregnant RhD-negative women. BJOG. 2003 Jan; 110(1):39-45. - Witter FR, Shirey RS, Nicol SL, Ness PM. Postinjection kinetics of antepartum Rh immune globulin. Am J Obstet Gynecol. 1990 Sep;163(3):784-6. - Dupont M, Gouvitsos J, Dettori J, Chiaroni J, Ferrera V. Intérêt de la technique de microtitrage des anticorps anti-RH1 dans le suivi immunohématologique des femmes enceintes. Transfus Clin Biol. 2007;14(4):381-5.	
<u>Comparaison des méthodes testées entre elles</u>	Oui	Oui – comparaison des cartes gels ORTHO/GRIFOLS/BIORAD (cf. tests de Répétabilité/Sensibilité/Spécificité)	100% de concordance entre les méthodes comparées. Toutes les spécificités des Ac doivent être également identifiées par la méthode testée

<u>Contamination</u>	Oui (si automate)	NA - technique manuelle	Absence de contamination inter-échantillons.
<u>Stabilité des réactifs</u>	Oui	Oui : fiche fournisseur et analyse de risque Conservation des Cartes-Gel : stabilité des cartes gels jusqu'à péremption Conservation des hématies HEM01 : stabilité selon la notice fournisseur + Test des hématies HEM01 après ouverture du flacon (durée à adapter selon la fréquence envisagée de l'analyse) Étalon dilué (cf. « Stabilité des échantillons »)	100% de concordance Une différence d'intensité de 1+ peut être tolérée
<u>Intervalle de référence</u>	NA	NA – méthode qualitative	
<u>Stabilité des échantillons</u>	Oui	Test au minimum sur 5 échantillons dont 1 échantillon d'étalon dilué à J0/J4/J7/J11 Stabilité étudié après conservation à 2-8°C	100% de concordance Une différence d'intensité de 1+ peut être tolérée

*Bibliographie : L. Manessier et al. Transfusion Clinique et Biologique 13 (2006) 271-277.

** Arrêté du 15 mai 2018

Aide : Procédure GEDEON (pour les RAI autres que anti-A/B) : **LAB/ANA/DF/PR/002 + LAB/DC/PR/006**

⇒ Comparaison de méthode : les échantillons peuvent être des plasmas/sérums frais étudiés au jour le jour en fonction du recrutement du laboratoire ou bien à partir d'une plasma/séro-thèque (patients, CIQ, EEQ), les tests comparatifs dans ce cas-là doivent être réalisés dès la décongélation et centrifugation des échantillons. Le titre de ces anticorps doit être si possible < ou = à 4 en technique tube ou par la technique de référence du laboratoire, si possible de sensibilité équivalente à la technique tube.

*Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes*



Serment de Galien



« En présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

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

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Résumé de la thèse

L'incompatibilité fœto-maternelle érythrocytaire est une situation que présentent plusieurs dizaines de milliers de femmes enceintes chaque année en France. Historiquement l'allo-immunisation anti-RH1(D) était la plus fréquente et la plus à risque de maladie hémolytique fœtale et néo-natale. Actuellement en France, un médicament est indiqué pour les femmes RH:-1 porteuses d'un enfant RH:1 : la spécialité Rhophylac®, en prévention *antepartum* ciblée et systématique, ainsi qu'en prévention *postpartum*. Ces préventions combinées ont prouvé leur efficacité, mais les immunoglobulines anti-RH1(D) injectées ne sont pas différenciables d'une allo-immunisation par les examens d'IHE traditionnels.

Le test de microtitrage permet de faire cette distinction, via une comparaison à la pharmacocinétique du médicament. Ce travail a permis de le mettre en place au LBM de l'EFS AURA, site de Grenoble, mais son automatisation n'est pas encore possible.

Les indications de cette analyse font encore l'objet de discussion nationale, car en plus de distinguer les anticorps passifs d'allo-anticorps, le microtitrage peut aussi servir de garde-fou avant de réinjecter du Rhophylac® en se basant sur le seuil de 6 ng/mL. Ce médicament, bien que jugé sécuritaire, reste un médicament dérivé du sang dont la méthode de production reste éthiquement controversée. Ainsi la limitation des injections doit être le chemin à suivre, et peut être aidée par le microtitrage.

MOTS-CLES : MICROTITRAGE, MICRODOSAGE, SUIVI IHE DE LA FEMME ENCEINTE, RHOPHYLAC, MHFN, MHNN, INCOMPATIBILITE FOETO-MATERNELLE

FILIÈRE : Biologie médicale

CANDIDAT : Edouard BONNEVILLE