

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2008

N° 119

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en Gynécologie-Obstétrique

par

Olivier PAPE

Né le 24 mai 1977 à BREST

Présentée et soutenue publiquement le 24 juin 2008

**MISE EN PLACE PRELIMINAIRE D'UNE METHODE DE
DETERMINATION NON INVASIVE DU RHESUS D FŒTAL PAR ANALYSE DE
L'ADN FŒTAL CIRCULANT DANS LE SANG MATERNEL AU SEIN DU
RESEAU SECURITE NAISSANCE DES PAYS DE LA LOIRE**

Président : Mr le Professeur PHILIPPE HJ

Directeur de thèse : Mr le Docteur WINER N

Examineurs : Mr le Professeur LOPES P

Mr le Professeur MULLER JY

Mme le Docteur BOSCHER C

Mr le Docteur BEZIEAU S

SOMMAIRE

SOMMAIRE	8
RESUME	12
I. L'ALLO-IMMUNISATION FOETO-MATERNELLE ANTI-D	13
I. 1. Définition	13
I. 2. Historique	14
I. 3. Physiopathologie	15
I. 3. 1. Le passage des hématies fœtales à travers le placenta	16
I. 3. 2. L'allo-immunisation fœto-maternelle et le transfert transplacentaire des anticorps anti-D	16
I. 3. 3. Développement de la réponse immunitaire : réponse primaire et secondaire après hémorragie fœto-maternelle	19
I. 4. Epidémiologie	22
I. 5. Circonstances d'immunisation	23
I. 5. 1. Hémorragies fœto-maternelles au cours de la grossesse	23
I. 5. 2. Pas de facteur de risque identifiable	24
I. 6. Prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle	24
I. 6. 1. Les outils du dépistage	26
I. 6. 1. 1. Chez la mère	26
I. 6. 1. 2. Chez le père	28
I. 6. 2. Prévention primaire : la femme non immunisée	29
I. 6. 2. 1. L'information des patientes	29
I. 6. 2. 2. Aspects pratiques de la prophylaxie	30
I. 6. 2. 2. 1. Mesures générales au cours de la grossesse	30
I. 6. 2. 2. 2. Prophylaxie au premier trimestre de la grossesse	32
I. 6. 2. 2. 3. Prophylaxie au deuxième trimestre de la grossesse	32
I. 6. 2. 2. 4. Prophylaxie du troisième trimestre de la grossesse	33
I. 6. 2. 2. 5. Recommandations lors de l'accouchement	34
I. 6. 3. Prévention secondaire : la femme déjà immunisée	35
I. 7. Surveillance	37

I. 7. 1. Appréhension du risque	37
I. 7. 2. La surveillance	38
I. 7. 2. 1. Les examens non invasifs	38
I. 7. 2. 1. 1. Le suivi immunologique maternel	38
I. 7. 2. 1. 2. L'échographie	38
I. 7. 2. 1. 3. La vélocimétrie Doppler	40
I. 7. 2. 1. 4. L'enregistrement du rythme cardiaque fœtal	42
I. 7. 2. 2. Les examens invasifs	42
I. 7. 2. 2. 1. L'amniocentèse	43
I. 7. 2. 2. 2. La ponction de sang fœtal	44
I. 8. Prise en charge fœtale et néonatale	45
I. 8. 1. Conséquences biologiques et cliniques de l'immunisation maternelle sur le fœtus	45
I. 8. 2. Thérapeutique in utero	46
I. 8. 2. 1. La ponction de sang fœtal	47
I. 8. 2. 2. Autres techniques de transfusion	47
I. 8. 2. 3. L'exsanguino-transfusion	48
I. 8. 2. 4. L'accouchement	48
I. 8. 3. Traitement post-natal et prise en charge en réanimation pédiatrique	49
 II – LE RHESUS D	 51
II. 1. Le gène Rhésus	51
II. 2. L'antigène et la protéine Rhésus D	52
II. 3. Les antigènes C et E et la protéine Rhésus CE	53
II. 4. Le locus Rhésus	53
II. 5. Les variants du gène RhD	54
II. 5. 1. Les gènes RhD partiels ou atténués	54
II. 5. 2. Le gène RhD délété	55
II. 5. 3. Le pseudogène RhD ψ et le gène hybride D-CE-D	56
II. 6. Répartition génotypique des personnes RhD négatif	57
III. L'ADN FŒTAL	59
III. 1. Les sources de matériel génétique	59
III. 1. 1. Les cellules fœtales	60

III. 1. 2. L'ADN fœtal libre circulant	61
III. 1. 2. 1. Découverte	61
III. 1. 2. 1. 1. Dans le sang maternel	61
III. 1. 2. 1. 1. 1. Origine	61
III. 1. 2. 1. 1. 2. Cinétique	62
III. 1. 2. 1. 2. Dans les urines maternelles	63
III. 1. 2. 2. Technique d'extraction de l'ADN libre circulant dans le sang maternel	64
III. 1. 2. 3. L'analyse par PCR quantitative en temps réel	66
III. 2. Recherche du gène RhD	68
 IV. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE SUR NANTES	 74
IV. 1. Matériels et méthodes utilisés	74
IV. 2. Résultats	74
 V. LES PROTOCOLES	 76
V. 1. Le STIC multicentrique	76
V. 2. Notre protocole	77
V. 2. 1. Patientes et échantillons	78
V. 2. 2. Résultats	79
 VI. DISCUSSION	 82
VI. 1. Généralités	82
VI. 2. Revue de la littérature	86
VI. 3. Cas particulier des grossesses gémellaires	88
VI. 4. Perspectives	88
VI. 5. Autres applications du génotypage	91
VI. 5. 1. Le sexage fœtal	91
VI. 5. 1. Les autres applications potentielles	94
VI. 5. 1. 1. Par analyse génétique du matériel fœtal	94
VI. 5. 1. 2. Par dosage dans le sang	96
VII. CONCLUSION	98
 ANNEXES	 99

RESUME

L'allo-immunisation fœto-maternelle Rhésus D est une pathologie rare, mais responsable d'une morbidité périnatale évitable (décès in utero, anasarque, anémies fœtales et néonatales sévères, prématurité et ictères néonataux graves.). Les recommandations nationales récentes incitent à la prophylaxie systématique au troisième trimestre de grossesse.

L'avènement récent du génotypage RhD fœtal sur plasma maternel permet de rechercher la présence du gène RhD du fœtus chez les mères Rhésus négatif, sans nécessité de prélèvement invasif. Cette reconnaissance prénatale non invasive permet une moindre prescription des immunoglobulines anti-D.

Nous avons testé un nouveau kit de génotypage sur 20 patientes enceintes Rhésus négatif du CHU de Nantes, et comparé nos résultats avec les phénotypes sérologiques RhD des nouveaux-nés prélevés au cordon.

Nos résultats préliminaires sont excellents avec une concordance de 100 %.

Dans le but d'évaluer ce kit, et de pouvoir recourir à l'échelon national au génotypage RhD, une étude multicentrique doit débuter prochainement. En cas de résultats favorables, une généralisation de ce génotypage en début de grossesse à toutes les patientes Rhésus négatif serait possible afin d'économiser à l'avenir de nombreuses injections inutiles d'immunoglobulines anti-D.

Mots-clefs : génotypage RhD fœtal, plasma maternel

I. L'ALLO-IMMUNISATION FOETO-MATERNELLE ANTI-D

I. 1. Définition

L'allo-immunisation fœto-maternelle Rhésus D (RhD) est la plus fréquente des allo-immunisations (tableau 1). Elle reste néanmoins une pathologie rare, mais pouvant être responsable d'anémies fœtales et néonatales sévères, ainsi que d'ictères néonataux graves.

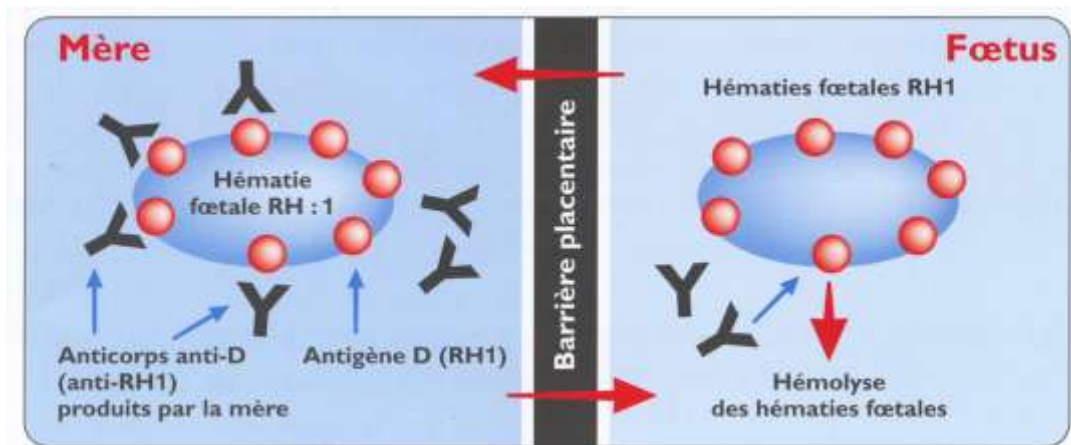
Elle représente 70 % des cas d'allo-immunisation dépistés à la naissance et 90 % de ceux nécessitant un traitement in utero [1].

Tableau 1 : Type d'allo-immunisation en pourcentage

ANTICORPS	POURCENTAGE (%)
Anti-D	79 %
Anti-Kell	13 %
Anti-c	4 %
Anti-E	2 %
Anti-e	2 %

Elle correspond, chez la femme RhD négatif, à la synthèse d'anticorps IgG anti-D en réponse au passage transplacentaire d'hématies fœtales RhD positif dans la circulation maternelle. Les anticorps maternels traversant le placenta vers la circulation fœtale provoquent une hémolyse au niveau du foie et de la rate du fœtus RhD positif. La destruction des globules rouges va entraîner une anémie, ainsi qu'une augmentation du produit de dégradation de l'hémoglobine, la bilirubine (figure 1).

Figure 1 : Suite à un passage d'hématies fœtales dans la circulation maternelle, une femme enceinte Rhésus négatif peut produire des anticorps dirigés contre l'antigène D présent sur les globules rouges fœtaux.



I. 2. Historique

La première description de maladie hémolytique périnatale remonte à 1609 [2]. Il s'agissait d'un cas de jumeaux dont l'un, décédé à la naissance, présentait un hydrops associé à une maladie hémolytique. Apparemment sain à la naissance, le second jumeau a présenté par la suite un ictère et est décédé quelques jours plus tard.

En 1932, l'association hydrops fœtal, ictère et anémie est pour la première fois décrite par Diamond [3], et dès 1938, Ruth Darrow émet alors une hypothèse immunologique.

L'année suivante, Levine et Stetson observent chez une patiente un anticorps agglutinant les érythrocytes du nouveau-né et du père, mais pas ceux de la mère : ils suggèrent alors que des antigènes fœtaux hérités du père peuvent déclencher une allo-immunisation lors d'un passage dans la circulation maternelle.

En 1940, Landsteiner et Weiner [4] découvrent le groupe Rhésus et ouvrent les voies de la compréhension de l'allo-immunisation : l'anticorps induit par l'hétéro-immunisation de

lapins par des érythrocytes de *Macaccus rhesus* entraîne une agglutination de sang chez 85% des sujets de type caucasien. Les sujets dont le sang s'agglutine sont alors définis comme « Rhésus positif » et les autres comme « Rhésus négatif ». par la suite, Levine démontre que les anticorps anti-D des femmes Rhésus négatif sont à l'origine de la maladie hémolytique périnatale.

Parallèlement à ces connaissances théoriques, la prévention de l'allo-immunisation, ainsi que la prise en charge diagnostique et thérapeutique des femmes sont mises en place.

La première exsanguino-transfusion postnatale a été réalisée en 1946 par Wallerstein. En 1961, Liley propose l'estimation du degré d'hémolyse, et donc du risque d'anémie fœtale grâce au dosage de la bilirubinamnie [5].

En 1963 est réalisée la première transfusion in utero par voie intrapéritonéale [6]. En 1981, Rodeck et ses collaborateurs réalisent la première transfusion intravasculaire in utero par foetoscopie [7]. Depuis 1983 et la technique décrite par Daffos, les transfusions intravasculaires fœtales sont actuellement réalisées sous échoguidage.

I. 3. Physiopathologie

L'immunisation fœto-maternelle nécessite un « contact » entre un antigène de groupe sanguin et une patiente « réactive » qui ne le possède pas. La seule possibilité pour une femme RhD négatif de rencontrer l'antigène RhD positif est donc la grossesse ou la transfusion de sang Rhésus incompatible [8].

I. 3. 1. Le passage des hématies fœtales à travers le placenta

L'allo-immunisation primaire gravidique (anti-D surtout) résulte d'hémorragies fœto-maternelles (HFM) : elles peuvent survenir dès le premier trimestre de grossesse chez près de 4 % des femmes enceintes [9]. Celles-ci peuvent, même après une HFM très faible (0,1 mL), développer un anticorps anti-D.

Le passage des hématies fœtales dans la circulation maternelle est bien connu [10]. La présence de ces cellules fœtales dans le sang maternel peut être mise en évidence par le test de Kleihauer (annexe 1) ou par des techniques de cytométrie de flux.

La fréquence de l'HFM dépend, en situation normale, de l'âge gestationnel : elle s'élève respectivement à 12 %, puis 45 % au cours des second et troisième trimestres de grossesse et jusqu'à 60 % au moment de l'accouchement.

Le volume de l'HFM devient plus important en fin de grossesse et au moment de l'accouchement [9] :

- 0,94 % des femmes ont une HFM supérieure à 2,5 mL de globules rouges entre les 30^{ème} et 39^{ème} semaines d'aménorrhée
- 3 % des accouchées ont une HFM supérieure à 3 mL
- 0,3 % des accouchées ont une HFM supérieure à 10 ml ou plus

I. 3. 2. L'allo-immunisation fœto-maternelle et le transfert transplacentaire des anticorps anti-D

L'allo-immunisation résulte chez une femme RhD négatif du passage dans l'organisme maternel des hématies fœtales possédant l'antigène RhD. La présence de cet

antigène a pu être mis en évidence dès la 7^{ème} semaine d'aménorrhée (SA) sur biopsie de trophoblaste [10].

L'érythropoïèse primitive mégaloblastique s'installe dans le sac vitellin à la 5^{ème} SA à la fin de laquelle les battements cardiaques apparaissent. Elle est relayée par l'érythropoïèse définitive, hépatique, amorcée à partir de 7-8 SA et qui devient prédominante une à deux semaines plus tard. La possibilité d'un transfert très précoce de cellules de la lignée érythroïde est attestée dès la 8^{ème} SA [11].

Par ailleurs, malgré ce transfert, il n'y a généralement pas d'immunisation décelable au cours de la gestation du premier enfant RhD positif car le volume de l'HFM est le plus souvent faible ($\leq 0,25$ ml). Lorsque le fœtus est ABO compatible, une immunisation vis-à-vis de l'antigène RhD est observée chez 1 % des primigestes, mais elle est habituellement extrêmement faible et tardive.

Dans les 6 mois qui suivent l'accouchement, le pourcentage de femmes immunisées s'élève entre 4 % et 9 % en fonction du volume de l'HFM au moment de l'accouchement. En l'absence de prévention, le pourcentage de femmes immunisées atteint 20 % dès la 2^{ème} grossesse incompatible (tableau 2).

Tableau 2 : Risques de développer une allo-immunisation chez la femme enceinte RhD négatif

Circonstance	Estimation du risque
Femme RhD négatif enceinte d'un fœtus RhD positif	- 1 % avant la naissance du 1^{er} enfant (immunisation le plus souvent au cours des deux derniers mois de grossesse) - 4 à 9 % chez les femmes ayant accouché d'un enfant RhD positif (immunisation dans les 6 mois suivant l'accouchement) - 20 % au cours de la 2^{ème} grossesse avec fœtus RhD positif (en l'absence de prophylaxie)

Pour des raisons encore mal élucidées, le phénotype Rhésus du fœtus semble jouer un rôle dans la fréquence d'immunisation observée.

Ainsi, les autres enfants de phénotype Rh D+C-E+c+e+ (également noté RH :1,-2,3,4,5 dans une autre nomenclature cf annexe 2) semblent provoquer davantage d'immunisation que les autres.

On sait également depuis longtemps qu'une situation d'incompatibilité ABO entre la mère et le fœtus diminue considérablement le risque d'immunisation contre l'antigène RhD : le risque est diminué de 90 % si l'enfant est de groupe A et la mère de groupe O, et de 55 % quand il est de groupe sanguin B (et O pour la mère) [9].

I. 3. 3. Développement de la réponse immunitaire : réponse primaire et secondaire après hémorragie fœto-maternelle

Les premiers anticorps maternels produits sont classiquement des immunoglobulines de type M (IgM), progressivement remplacés par des IgG (réponse immune primaire). La réponse primaire se développe lors de la grossesse en cas d'hémorragie fœto-maternelle ou suite à une transfusion sanguine. C'est un processus qui se développe lentement : les anticorps apparaissent exceptionnellement avant 4 semaines, habituellement à 8-9 semaines et parfois seulement 6 mois après le premier contact avec les antigènes étrangers.

La réponse secondaire a lieu lors d'une nouvelle exposition antigénique : elle est alors rapide et de type IgG, des expositions itératives augmentant à chaque fois la rapidité et la production d'anticorps. Une fois dans la circulation fœtale, ces anticorps se fixent sur les antigènes de membrane correspondants et la destruction des érythrocytes se fait principalement dans le système réticulo-endothélial (en particulier au niveau de la rate).

Même au cours d'une première grossesse, ce phénomène peut survenir, du fait de la répétition des hémorragies fœtales.

Les principales caractéristiques des réponses primaire et secondaire sont indiquées dans le tableau 3 [12].

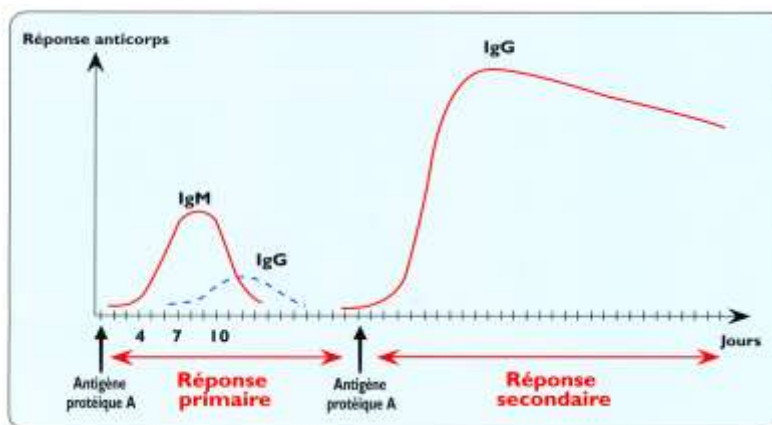
Tableau 3 : Principales caractéristiques des réponses primaire et secondaire

Propriétés	Réponse primaire	Réponse secondaire
Cellules B	« naïve »	mémoire
Période de latence	4-7 jours	1-3 jours
Amplitude et pic	7-10 jours	3-5 jours (100 à 1000 fois plus élevée que primaire)
Classe des Ac produits	IgM	IgG
Affinité Ac	faible	élevée

Une première injection d'antigène (Ag) protéique est suivie d'un temps de latence puis d'une élévation des titres d'IgM dans le sérum passant par un maximum, suivi d'une décroissance. De faibles quantités d'IgG peuvent être produites à la fin de cette période qui définit la réponse primaire.

Une deuxième injection du même Ag (ou d'un Ag présentant des épitopes communs) induit une réponse secondaire caractérisée par un temps de latence plus court, une montée des titres d'Ac beaucoup plus importante, une décroissance beaucoup plus lente et une prédominance des Ac de classe IgG et IgA (figure2).

Figure 2 : Modèle de cinétique des réponses anticorps primaires et secondaires



Le tableau 4 reprend la physiopathologie de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D en l'absence de traitement [13].

Tableau 4 : Physiopathologie de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D en l'absence de traitement

Physiopathologie de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D en l'absence de mise en oeuvre des mesures préventives		
Enfant RhD+ de rang 1 : contact GR fœtaux - sang maternel ↓	Enfant RhD+ de rang ≥ 2 ↓	
Production d'Ac maternels contre les Ag fœtaux (0,1 ml de sang fœtal suffit mais réponse lente : quelques semaines) ↓ Ac maternels se fixant sur les globules rouges fœtaux via le placenta ↓ GR fœtaux hémolysés dans le foie et la rate du fœtus ↓ Anémie fœtale. Hyperbilirubinémie épurée par l'organisme maternel	Grossesses ultérieures avec des fœtus RhD positif ↓ Le passage d'une quantité bien moindre de GR déclenche une réponse rapide et intense ↓ Les Ac maternels traversant le placenta en plus grande quantité et se fixant sur les GR fœtaux ↓ Hémolyse fœtale massive	
	Anémie fœtale sévère ↓ Anasarque fœto-placentaire ↓ Mort fœtale in utero ou décès à la naissance	Hyperbilirubinémie massive épurée par l'organisme maternel pendant la grossesse mais non éliminée par le nouveau né ↓ Ictère hémolytique ↓ Ictère nucléaire du nouveau-né ↓ Décès ou séquelles psychomotrices graves

I. 4. Épidémiologie

On estime le nombre de grossesses conçues chaque année en France entre 1 130 000 et 1 225 000 [14], incluant les naissances vivantes (830 900 en 2006), les fausses-couches spontanées, les grossesses extra-utérines, les interruptions volontaires et médicales de grossesse.

Environ 15 % de la population française étant de groupe Rhésus D négatif, on peut évaluer à 150 000 à 165 000 le nombre de femmes Rhésus D enceintes chaque année.

La fréquence du gène Rhésus D étant de 0,6 dans la population française, le nombre annuel de femmes Rhésus D négatif portant un fœtus Rhésus D positif, serait de l'ordre de 90000 (75 000 au delà de 28 semaines d'aménorrhée (SA)) [15].

Avant 1970, le nombre de femmes Rhésus D négatif immunisées contre l'antigène D était de 6 à 10 pour 1000 naissances. Depuis la généralisation de l'immunoprophylaxie dans les années 1970, ce taux a été réduit à 0,9 pour 1000 naissances dans la région Ile-de-France en 1995.

Il y a donc aujourd'hui en France, 700 à 750 allo-immunisations fœto-maternelles anti-D par an, dont 10 % seraient graves. Outre les 50 à 100 décès fœtaux par an, ces allo-immunisations entraînent des hospitalisations prolongées en pré ou en post-natal, pouvant nécessiter des transfusions fœtales et causer de grandes prématurités, consenties ou non.

I. 5. Circonstances d'immunisation

I. 5. 1. Hémorragies fœto-maternelles au cours de la grossesse

Les trois-quarts des allo-immunisations anti-D résultent d'une prévention oubliée ou inadaptée sur un événement sensibilisant (tableau 5).

Tableau 5 : Circonstances pouvant induire des hémorragies fœto-maternelles au cours de la grossesse

Risque modéré de passage d'hématies fœtales	Risque modéré de passage d'hématies fœtales	Risque important de passage d'hématies fœtales
- Toute fausse couche spontanée (FCS) ou menace de FCS du 1^{er} trimestre - Toute interruption de grossesse (IVG, IMG) quels que soient le terme et la méthode utilisée - Grossesse molaire - Grossesse extra-utérine - Métrorragies - Choriocentèse, amniocentèse - Réduction embryonnaire - Traumatisme abdominal - Cerclage cervical	- Amniocentèse simple - Métrorragies - Cerclage du col utérin - Menace d'accouchement prématuré nécessitant un traitement	- Interruption médicale de grossesse - FCS tardive - Mort fœtale in utero - Version par manœuvres externes - Traumatisme abdominal ou pelvien - Intervention chirurgicale ou pelvienne - Prélèvements ovulaires : cordocentèse, placentocentèse - Accouchement, quelle que soit la voie

I. 5. 2. Pas de facteur de risque identifiable

Le quart restant des allo-immunisations serait le fait d'une hémorragie fœto-maternelle sans facteur de risque identifiable, surtout au 3^{ème} trimestre et échappant donc à une prévention ciblée. En effet, un passage « spontané » d'hématies fœtales dans la circulation maternelle existe de façon progressivement croissante au cours de la grossesse : 4 % des cas au premier trimestre, 12 % au deuxième trimestre et 45 % au troisième trimestre [9].

I. 6. Prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle

Depuis 1970, la réduction de l'immunisation est effective en France grâce à l'injection d'immunoglobuline anti-D fabriquée à partir de plasmas issus de donneurs immunisés contre l'antigène RhD.

Cette prophylaxie initialement préconisée en post-partum, a ensuite été étendue aux avortements, puis aux situations anténatales à risque accru d'hémorragie fœto-maternelles.

Jusqu'en décembre 2005, il n'existait pas en France de recommandations professionnelles, mais une attitude consensuelle de prévention ciblée depuis 1970. Cette attitude a permis de réduire le risque d'allo-immunisation anti-D d'un facteur 10 en 30 ans, ce risque étant passé de 6 à 10/1000 naissances avant 1970 aux alentours de 0,9/1000 actuellement [16].

Malgré ce protocole, il persiste actuellement en France environ 730 à 750 cas estimés d'allo-immunisation. Trois causes, de fréquences sensiblement équivalentes, peuvent expliquer cette persistance :

- un oubli de prévention au cours de grossesses précédentes, notamment au cours du 1^{er} trimestre ou à l'accouchement
- une mauvaise mise en œuvre de la prophylaxie : administration trop tardive, posologie inadaptée
- des hémorragies fœto-maternelles spontanées passées inaperçues pendant la grossesse et donc non prévenues malgré une prévention ciblée bien conduite

En 2005, le Collège National des Gynécologues Obstétriciens Français (CNGOF), en collaboration avec la Société Française de Médecine Périnatale (SFMP) et le Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale (CNRHP) a rédigé des Recommandations pour la Pratique Clinique (RPC) qui ont été publiées dans un numéro spécial de la Revue de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction [17].

L'objectif de ces Recommandations pour la Pratique Clinique était triple :

- améliorer les pratiques existantes
- étudier l'opportunité d'une prévention systématique pendant la grossesse à la suite d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) nouvelle par le Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB)
- cibler les patientes RhD négatif porteuses d'un enfant RhD négatif

Ces recommandations ont été élaborées selon des principes méthodologiques définis par la Haute Autorité de Santé (HAS). Chacune de ces recommandations a été affectée d'un niveau de preuve fourni par une analyse de la littérature.

I. 6. 1. Les outils du dépistage

I. 6. 1. 1. Chez la mère

Le dépistage précoce de l'allo-immunisation érythrocytaire au cours de la grossesse est obligatoire et repose sur la détermination du statut immunologique de la mère (tableau 6).

Tableau 6 : Examens immuno-hématologiques obligatoires chez la femme enceinte [17,18]

	Terrain	Calendrier
Groupe ABO et phénotype Rhésus et Kell	- Toutes les primipares et multipares non testées	- Dès la consultation - 2 ^{ème} prélèvement pour 2 ^{ème} détermination ABO et Rh plus tard
Recherche d'Agglutinines Irrégulières (RAI)	- Toutes les femmes enceintes	- Dès la 1 ^{ère} visite prénatale (si <u>+</u> : identification et titrage)
	- Femmes RhD négatif en cas de prévention systématique à 28 SA - Femmes RhD négatif en l'absence de prévention systématique à 28 SA - Femme RH-1 avec passé transfusionnel	- Avant la fin du 3 ^{ème} mois - Au cours du 6 ^{ème} mois (idéalement entre 26 SA et 28 SA), moins de 1 semaine avant l'injection de Rophylac® - A l'admission pour l'accouchement pour la sécurité transfusionnelle - Dans les 8 semaines suivant l'accouchement - Avant la fin du 3 ^{ème} mois - Au cours du 6 ^{ème} mois - Au cours des 8 ^{ème} et 9 ^{ème} mois - Dans les 8 semaines suivant l'accouchement
	- Femmes RhD positif sans antécédent	- Au 6 ^{ème} mois
	- Femmes immunisées	RAI de façon régulière, titrage et dosage selon une fréquence fonction du type d'Ac, de sa concentration et du terme de la grossesse

En cas d'apparition d'allo-anticorps, tous les moyens de surveillance clinique et biologique du risque hémolytique fœtal doivent être mis en place afin de pouvoir appliquer à temps les thérapeutiques adaptées.

Ce dépistage se fait grâce à un examen biologique clef, la recherche d'agglutinines irrégulières (RAI). Le tableau de cette surveillance est actuellement modifié chez les femmes RhD négatif par l'application de la prévention systématique.

La RAI a pour but de rechercher et d'identifier la présence d'anticorps anti-érythrocytaires irréguliers dans le sérum des patientes. Deux techniques sont actuellement disponibles : le test de Coombs indirect, et le dosage pondéral [19] (Annexe 3).

L'association de ces deux tests permet, à la condition que ces examens soient effectués par le même laboratoire, une meilleure appréciation du risque d'immuno-hémolyse in utero, car l'activité fonctionnelle d'un anticorps dépend de sa concentration et de son affinité.

Elle permet également de limiter les gestes invasifs, de mieux préciser le moment où il faudra les pratiquer et de détecter les réactivations (qui se produisent une fois sur deux environ, mais de façon imprévisible) [20].

En pratique, le dépistage prénatal des anticorps (RAI) est réalisé avant la fin du 3^{ème} mois de grossesse :

- Négatif, il sera répété au 6^{ème} mois (idéalement entre 26 et 28 SA), moins d'une semaine avant l'injection systématique d'Ig anti-RhD (Rhophylac®) réalisée vers 28 SA (27-29 SA). Lorsqu'une injection de 300 µg d'Ig anti-D a été réalisée, il n'est pas nécessaire de répéter par la suite des RAI en vue de dépister une immunisation anti-D, et ce jusqu'à

l'accouchement. Les RAI réalisées par la suite sont à visée exclusivement transfusionnelle. Il est donc recommandé de ne pas réaliser cet examen avant l'admission pour l'accouchement.

- Négatif et en cas d'absence de prévention systématique à 28 SA, il sera répété au cours du 6^{ème} mois, au cours des 8^{ème} et 9^{ème} mois et dans les 8 semaines qui suivent l'accouchement.

- Positif, il nécessite alors son titrage. Les valeurs de titre et de dosage pondéral sont à interpréter en fonction du terme de grossesse.

En cas de dépistage positif à la RAI, il faut procéder obligatoirement à l'épreuve d'identification des anticorps anti-érythrocytaires (sans attendre l'examen prénatal ultérieur).

Elle consiste à déterminer la spécificité du ou des anticorps présents et à vérifier l'absence a minima des antigènes correspondants.

La mise en évidence d'anticorps d'allo-immunisation chez une femme enceinte ne signifie pas pour autant que le fœtus soit atteint de la maladie hémolytique néo-natale. Il faut donc prouver que l'enfant possède l'antigène correspondant à l'anticorps maternel et préciser la gravité de la maladie hémolytique dont il est atteint.

Si l'antigène identifié est susceptible d'induire une maladie hémolytique, il convient alors de phénotyper les hématies du procréateur (ou détermination du phénotype du géniteur) à la recherche de l'antigène correspondant.

I. 6. 1. 2. Chez le père

La connaissance du phénotype du conjoint permet d'écarter le risque d'allo-immunisation fœto-maternelle RhD si le phénotype du conjoint est RhD négatif (deux déterminations sont nécessaires).

Une abstention de l'immuno-prophylaxie peut être envisagée si un document certifiant le groupe est fourni et après un entretien singulier avec la patiente abordant la certitude de la paternité [21].

I. 6. 2. Prévention primaire : la femme non immunisée

La prophylaxie n'est possible que pour la seule allo-immunisation anti-D. Elle consiste à injecter des immunoglobulines anti-D pour neutraliser les globules rouges Rhésus positif étrangers qui seraient passés dans l'organisme maternel avant toute mise en route du processus d'immunisation [19].

I. 6. 2. 1. L'information des patientes

Elle est essentielle. Les femmes doivent connaître leur statut immunologique et, en particulier, leur phénotype Rhésus. Les patientes qui sont RhD négatif et dont le partenaire est RhD positif doivent également être informées des situations à risque d'immunisation en cas de grossesse incompatible.

Outre l'accouchement en lui-même, il faut également rappeler l'ensemble des situations à risque accru de passage d'hématies fœtales dans le sang maternel (tableau 4). Cette connaissance permettra non seulement d'éviter certaines situations à risque mais aussi de consulter en cas de survenue de ces situations afin de pouvoir bénéficier d'une prophylaxie dans des délais utiles.

I. 6. 2. 2. Aspects pratiques de la prophylaxie

La prévention primaire a été bien codifiée par les Recommandations pour la Pratique Clinique publiées en décembre 2005 [17].

I. 6. 2. 2. 1. Mesures générales au cours de la grossesse

Une double détermination du groupe sanguin et du Rhésus, et une recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) doivent être obtenues dès le premier trimestre de la grossesse chez toutes les femmes.

Si la femme est RhD négatif, une information doit être délivrée sur l'immunisation anti-D : dépistage, suivi, prévention. A cette occasion, le groupe et le Rhésus du conjoint est à documenter.

Si la femme n'est pas immunisée contre l'antigène D, un contrôle de RAI doit être réalisé au cours du 6^{ème} mois de grossesse, idéalement entre 26 et 28 semaines d'aménorrhée, juste avant l'injection prophylactique si cette solution est adoptée.

Lorsque l'indication d'immunoprophylaxie se présente :

- si le conjoint est RhD négatif et la paternité certaine : la prophylaxie anti-D peut, voire doit être évitée
- si le conjoint est RhD positif ou inconnu : la prophylaxie anti-D doit être proposée ; elle peut cependant être refusée si la patiente a bien compris la balance bénéfice/risque [22].

Une information est alors donnée à la patiente et son consentement doit être obtenu avant toute administration d'immunoglobuline anti-D.

Avant toute décision d'administrer des immunoglobulines anti-D, on s'assurera de l'absence d'immunisation anti-D par une RAI de moins de une semaine. Dans les situations d'urgence, le résultat ne doit pas être attendu pour réaliser l'injection.

Lorsque le génotypage fœtal RhD sur sang maternel peut être réalisé, il est recommandé de l'appliquer afin de limiter la prophylaxie Rhésus aux seules femmes enceintes d'enfant RhD positif.

L'efficacité de l'immunoprophylaxie repose sur une posologie d'Ig anti-D adaptée et sur l'injection des immunoglobulines dans les 72 heures après un évènement potentiellement immunisant. Au-delà, un bénéfice peut être attendu jusqu'à 30 jours.

Lorsque la galénique des immunoglobulines anti-D autorise la voie intra-musculaire (IM) ou la voie intra-veineuse (IV), la voie IV sera toujours préférée pour la prophylaxie post-exposition. La voie IV est hautement recommandée lorsqu'on s'approche du délai de 72 heures ou en cas d'hémorragie fœto-maternelle identifiée.

Lorsqu'une nouvelle circonstance anténatale indiquant une immunoprophylaxie ciblée survient après une première administration d'anti-D, on peut s'abstenir de renouveler la prophylaxie dans un délai qui est fonction de la dose antérieurement reçue (9 semaines pour 200 µg, 12 semaines pour 300 µg). L'abstention s'applique dans tous les cas où il existe un risque modéré de passage d'hématies fœtales et seulement si le test de Kleihauer est négatif.

Lors de toute injection d'immunoglobuline, le nom du produit et le numéro de lot doivent être noté dans le dossier du patient.

I. 6. 2. 2. Prophylaxie au premier trimestre de la grossesse

Une injection unique de 200 µg d'immunoglobuline anti-D par voie intramusculaire ou intraveineuse est justifiée pour tous les évènements détaillés dans le tableau 4.

Il n'y a pas de limite inférieure d'âge gestationnel prouvé pour la réalisation de la prévention.

Un test de Kleihauer (quantification des hématies fœtale dans le sang maternel) n'est pas nécessaire avant l'injection d'immunoglobuline.

I. 6. 2. 2. 3. Prophylaxie au deuxième trimestre de la grossesse

Les circonstances conduisant à proposer une immunoprophylaxie anti-D sont listées dans le tableau 4.

Dans des circonstances pouvant entraîner un passage important d'hématies fœtales, la posologie sera guidée par un test de quantification des hématies fœtales (test de Kleihauer) selon les règles du tableau 7.

Tableau 7 : Adaptation de la dose d'immunoglobulines anti-D en fonction du volume d'hémorragie fœto-maternelle estimé par le test de Kleihauer (HF : Hématies Fœtales ; HA : Hématies Adultes)

KLEIHAUER (HF/10.000 HA)	Dose de 200 µg		Dose de 300 µG		Voie d'administration
	Doses	µg	Doses	µg	
0-4	1	200	1	300	IV directe
5-24	1	200	1	300	
25-44	2	400	1	300	
45-64	2	400	2	600	Perfusion sur 4 heures
65-84	3	600	2	600	
85-104	3	600	2	600	
105-124	4	800	3	900	
125-144	4	800	3	900	
145-164	5	1000	3	900	
165-184	5	1000	4	1200	
185-204	6	1200	4	1200	
205-224	6	1200	4	1200	
225-244	7	1400	5	1500	
245-264	7	1400	5	1500	
265-284	8	1600	5	1500	
285-304	8	1600	6	1800	

Pour toutes les autres circonstances, le test de quantification des hématies fœtales n'est pas nécessaire et une dose de 200 µg suffit.

I. 6. 2. 2. 4. Prophylaxie du troisième trimestre de la grossesse

Toute femme enceinte Rhésus D négatif, non immunisée contre l'antigène D et dont le fœtus est connu ou présumé RhD positif, se verra proposer une injection d'immunoglobuline anti-D de 300 µg par voie intramusculaire à 28 SA (+/- 1 semaine).

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

Si la patiente n'a pas reçue d'injection de 300 µg d'anti-D à 28 SA, elle peut être « rattrapée » jusqu'à 32-34 SA. Si l'injection n'est cependant pas effectuée, la RAI du 8^{ème} mois doit être maintenue, la prophylaxie ciblée est alors effectuée comme au cours du second trimestre (tableau 4).

I. 6. 2. 2. 5. Recommandations lors de l'accouchement

Le phénotype RhD de l'enfant doit être déterminé. Le prélèvement peut être réalisé sur sang prélevé au cordon ombilical.

Si l'enfant est RhD positif, un test de Keihauer sera effectué sur un échantillon de sang maternel prélevé dans les heures qui suivent l'accouchement et au minimum 30 minutes après la délivrance. La mère se verra alors proposer une injection d'immunoglobulines anti-D (le plus souvent de 200 µg). La posologie et la voie d'administration seront cependant à adapter en fonction du test de Kleihauer (tableau 7). Cette pratique nouvelle doit être connue des soignants (sages-femmes, internes, médecins) afin d'éviter les classiques et anciennes RAI de contrôle.

En cas d'oubli d'administration des immunoglobulines dans les premières 72 heures, l'injection peut toutefois être réalisée au delà de ce délai, et même jusqu'à 30 jours après l'accouchement.

I. 6. 3. Prévention secondaire : la femme déjà immunisée

Chez la femme déjà immunisée, les allo-immunisations ont tendance à s'aggraver au cours de la grossesse, d'où l'importance de bien connaître le déroulement des grossesses précédentes.

En pratique, on peut retrouver deux situations :

En cas de nouvelle grossesse, il faut s'intéresser aux circonstances de la première immunisation (absence ou échec de prévention ?) et aux détails de la prise en charge des grossesses précédentes soumises à cette allo-immunisation (surveillance et gestes effectués, devenir fœtal et néonatal).

En dehors de la situation de grossesse, il faut effectuer du « conseil prénatal » : informer la patiente des conséquences d'une nouvelle grossesse pour elle et son bébé. Il est en effet impératif qu'une patiente présentant une allo-immunisation potentiellement sévère, connaisse les impératifs du suivi, les éventuelles thérapeutiques qui lui seront proposées, ainsi que les risques encourus par le fœtus et l'enfant.

En cas de découverte d'agglutinines irrégulières, la première mesure à prendre est d'établir le phénotype du partenaire.

Si ce dernier ne porte pas l'antigène correspondant, le fœtus ne peut pas développer une maladie hémolytique. La présence d'anticorps maternels peut alors être attribuée à une ancienne immunisation. La surveillance à adopter est alors la même que pour une mère ne présentant pas d'anticorps.

Si le père porte l'antigène correspondant ou qu'il est inconnu, le génotypage RhD du fœtus à partir de sang maternel semble alors une bonne alternative.

En cas de résultat négatif, un second prélèvement est effectué quelques semaines plus tard.

En cas de RhD fœtal positif, le résultat peut être considéré comme acquis.

Si le fœtus est RhD négatif ou que le génotypage ne peut être réalisé, le suivi du titre d'anticorps (Coombs direct) permet de préciser l'attitude à adopter :

- si le titre est inférieur ou égal à 1 /16 et que la patiente ne présente aucun antécédent, le contrôle doit être mensuel jusqu'à 28 SA, puis bimensuel.

- si le titre est élevé d'emblée (supérieur ou égal à 1/32) ou augmente de façon significative, un dosage pondéral des anticorps est nécessaire. L'attitude à adopter dépend des données de l'échographie et de l'âge gestationnel (tableau 8).

Tableau 8 : Taux critiques des anticorps anti-D en fonction de l'âge gestationnel
(1 µg = 250 U CHP = 5 UI)

Semaines d'aménorrhées (SA)	18	24	28	32	36
Dosage pondéral des Ac anti-D	4µg/mL (1000 U CHP)	3µg/mL (750 U CHP)	2µg/mL (500 U CHP)	1µg/mL (250 U CHP)	0,7µg/mL (175 U CHP)

Un titrage régulier des anticorps maternels (intervalle de 1 à 4 semaines entre deux dosages selon le taux initial et l'âge gestationnel), ainsi que le dosage pondéral des anticorps anti-D doivent être réalisés même si l'immunisation initiale est modérée. En effet, le taux des anticorps peut s'élever de façon brutale, mettant en danger le fœtus, d'où la nécessité de le mesurer à intervalles réguliers. Cette surveillance du taux se fait en général sur une courbe d'évolution, avec alerte lors de la constatation d'une ascension rapide du taux des anticorps.

I. 7. Surveillance

La surveillance d'une grossesse avec incompatibilité foeto-maternelle comporte, outre le suivi habituel d'une femme enceinte, une surveillance spécifique qui a pour but d'apprécier le risque d'anémie fœtale. Elle repose en grande partie sur les tests immunologiques et un suivi échographique régulier.

I. 7. 1. Appréhension du risque

Désormais exceptionnellement rencontrée au cours de transfusions, l'allo-immunisation foeto-maternelle est généralement acquise au cours des grossesses précédentes. Il s'agit d'une pathologie rare mais non exceptionnelle, dont le pronostic a cependant été nettement amélioré tout d'abord par la recherche systématique des agglutinines irrégulières, et ce quelque soit le groupe sanguin de la mère, et par les mesures thérapeutiques disponibles (transfusions fœtales).

L'évaluation de l'importance de l'allo-immunisation par le taux d'anticorps et le titrage permet de catégoriser les patientes en fonction de leur risque faible, moyen ou majeur d'immunisation, le taux d'anticorps maternels étant bien corrélé au risque hémolytique, mais à interpréter en fonction du terme de la grossesse (tableau 8).

Il faut tout de même savoir que les valeurs de seuil varient selon les équipes, la méthode utilisée pour la titration (milieu albumineux ou salin, Coombs direct, dosage pondéral) et les laboratoires [23].

Enfin, la gravité des antécédents de maladie hémolytique oriente sur le niveau de risque de la grossesse en cours. En effet, la sévérité de la pathologie augmente avec le nombre de grossesses concernées par l'allo-immunisation.

I. 7. 2. La surveillance

I. 7. 2. 1. Les examens non invasifs

I. 7. 2. 1. 1. Le suivi immunologique maternel

Il s'agit, en fonction du statut immunologique de la patiente, du suivi décrit dans les paragraphes sur la prévention primaire ou secondaire.

I. 7. 2. 1. 2. L'échographie

Le développement de l'échographie a facilité les investigations et la prise en charge de l'allo-immunisation foeto-maternelle.

Le syndrome précoce de décompensation est caractérisé par la découverte d'un ou plusieurs éléments suivants :

- anses intestinales anormalement échogènes
- visualisation de la paroi intestinale
- lame d'ascite
- hépatomégalie
- image en double contour cutané au niveau du crâne
- épanchement péricardique

- excès de liquide amniotique
- augmentation de l'épaisseur du placenta
- augmentation du diamètre de la veine ombilicale dans son trajet intra ou extra-hépatique

Les signes d'anasarque débutant sont parfois difficiles à distinguer d'images physiologiques. Par contre, en cas d'anasarque franc, une anémie fœtale sévère est quasi-constante.

Il est habituel d'observer une grande tolérance à l'anémie des fœtus jeunes : à 22 SA, une anémie à 6-7 g/dL peut n'avoir aucune répercussion échographique. Inversement, l'apparition d'un épanchement des séreuses à ce terme est très évocateur d'une anémie profonde.

Au fur et à mesure que le terme de la grossesse avance, le fœtus voit ses besoins en oxygène augmenter, et sa tolérance à l'anémie devient moins bonne. Une décompensation pour des chiffres d'hémoglobine plus élevés (7-8 g/dL) peut alors s'observer.

L'échographie manquant de sensibilité, le moindre signe doit par conséquent être pris en compte. Ces signes prennent d'autant plus de valeur que l'immunisation maternelle est importante. L'aggravation de l'anémie hémolytique pouvant être rapide, les examens échographiques doivent être rapprochés, à la recherche du moindre épanchement péricardique ou d'une ascite.

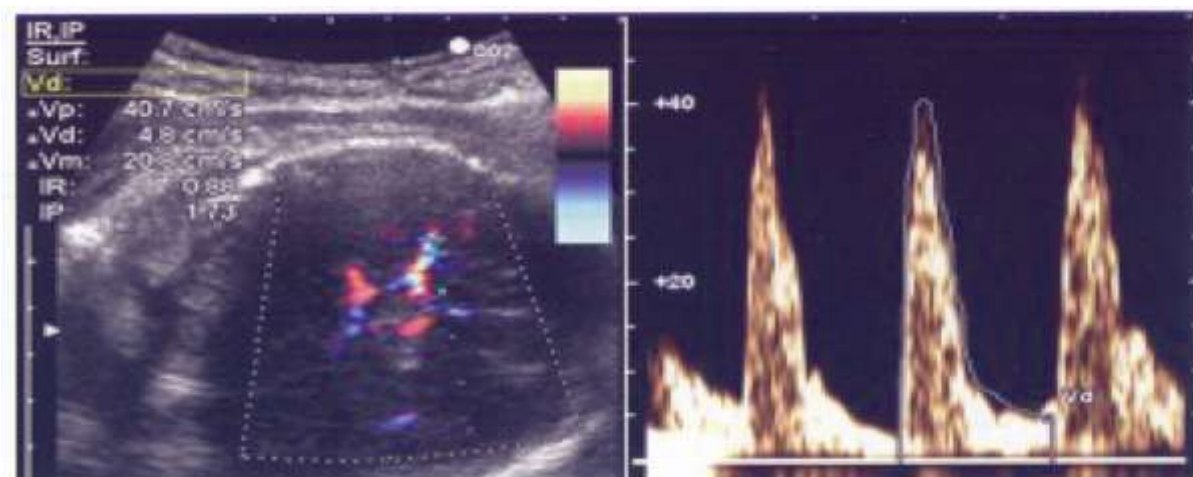
I. 7. 2. 1. 3. La vélocimétrie Doppler

L'examen doppler des flux sanguins est un moyen non invasif indispensable pour la recherche et la surveillance d'une anémie fœtale.

En effet, de nombreuses études ont montré l'intérêt majeur de l'étude du pic de vitesse systolique au niveau de l'artère cérébrale moyenne pour prédire le degré d'anémie fœtale [24–29].

La mesure de ce pic de vitesse systolique est relativement simple à réaliser à condition d'en connaître les principaux écueils. Elle apparaît alors comme le meilleur moyen de diagnostic, reproductible et non invasif, des anémies fœtales (figure 3).

Figure 3 : Mesure du pic de vitesse systolique au niveau de l'artère cérébrale moyenne



Des tables de référence ont été publiées par Mari et al, permettant à partir de cette mesure, de prévoir avec une sensibilité de 100 % (et un taux de faux positif modéré à environ 12 %) le risque d'anémie modérée et sévère, et donc éventuellement d'indiquer une transfusion fœtale [24] (tableau 9).

Tableau 9 : Evaluation du degré d'anémie fœtale à partir du pic systolique mesuré au niveau de l'artère cérébrale moyenne (en cm/sec), en fonction de l'âge gestationnel (d'après Mari et al. [23]).

Semaines de gestation	Multiples de la médiane (MoM)			
	1	1,29	1,50	1,55
18	23.2	29.9	34.8	36.0
20	25.5	32.8	38.2	39.5
22	27.9	36.0	41.9	43.3
24	30.7	39.5	46.0	47.5
26	33.6	43.3	50.4	52.1
28	36.9	47.6	55.4	57.2
30	40.5	52.2	60.7	62.8
32	44.4	57.3	66.6	68.9
34	48.7	62.9	73.1	75.6
36	53.5	69.0	80.2	82.9
38	58.7	75.7	88.0	91.0
40	64.4	83.0	96.6	99.8

La valeur de cette mesure du pic de vitesse systolique au niveau de l'artère cérébrale moyenne a été comparée à celle de l'amniocentèse pour prédire l'anémie fœtale. Les différents auteurs concluent soit à une valeur identique [28], soit à une supériorité du Doppler [27]. Oepkes trouve une sensibilité de 88 % et une spécificité de 82 % pour le Doppler pour détecter une anémie sévère *versus* 76 % et 77 % pour l'amniocentèse, à partir d'une série de 165 fœtus, dont 74 présentaient une anémie sévère [29].

Une étude prospective récente de Carbonne et al. confirme ces bons résultats avec une valeur prédictive négative du Doppler de 97,8 %, une sensibilité de 86,7 %, avec un taux de faux positifs de 12,2 % [30]. L'aire sous leur courbe ROC est de 0,85 témoignant d'une excellente valeur diagnostique. Cette étude pourrait également faire évoluer, dans le futur, le seuil d'intervention de 1,5 MoM à 1,6 permettant d'améliorer la spécificité et la valeur prédictive positive du test, sans perte de sensibilité, ni de valeur prédictive négative.

Le rythme de surveillance échographique préconisé par certains auteurs est hebdomadaire, mais pourrait être bi-hebdomadaire [31,32]. La valeur de cet examen a également été évalué pour déterminer le risque de réapparition d'une anémie fœtale après transfusion in utero [33].

I. 7. 2. 1. 4. L'enregistrement du rythme cardiaque fœtal

L'enregistrement du rythme cardiaque fœtal (ERCF) est possible à partir de 24-25 SA et permet de contrôler l'altération du bien être fœtal : rythme cardiaque micro-oscillant, tachychardie, ou rythme sinusoïdal pathognomonique d'une anémie très sévère.

I. 7. 2. 2. Les examens invasifs

Les explorations qui mettent en œuvre des procédures obstétricales invasives exposent à des complications fœtales, obstétricales et peuvent aggraver l'immunisation.

Elles ne sont utilisées que dans des situations bien définies, prenant en compte un ensemble de paramètres : antécédents, taux d'anticorps, évolution de ce taux, terme de la grossesse, données de l'échographie, enregistrement du rythme cardiaque fœtal, l'examen de référence restant la vélocimétrie Doppler au niveau de l'artère cérébrale moyenne corrélée à la biologie.

I. 7. 2. 2. 1. L'amniocentèse

Elle permet le génotypage RhD fœtal par PCR sur le liquide amniotique [34]. La sensibilité de ce génotypage profite de l'abondance de l'ADN fœtal dans le liquide amniotique et de la présence du gène homologue RhCE utilisé comme témoin interne. La possibilité de faux négatifs est donc pratiquement nulle, sauf choix inapproprié des amorces d'amplification [35,36].

Elle permet également la mesure de la bilirubinamnie : la présence de bilirubine dans le liquide amniotique se traduit par une augmentation de la densité optique, lorsque l'examen est pratiqué à la longueur d'onde de 450 nm.

Le liquide amniotique doit être gardé dans l'obscurité car la bilirubine s'oxyde à la lumière, ce qui modifie ses caractéristiques spectrophotométriques.

Après centrifugation et filtration, l'étude de la densité optique est faite de 10 nm en 10 nm entre 350 et 700 nm. Cette mesure aux différentes longueurs d'onde permet de déterminer la présence d'une contamination par d'autres éléments tels que du vieux sang (pic à 403 nm), du sang frais (pic à 413 nm) ou du méconium (pic à 450 nm).

La courbe semi-logarithmique ainsi obtenue a en abscisse la longueur d'onde, et en ordonnée la densité optique.

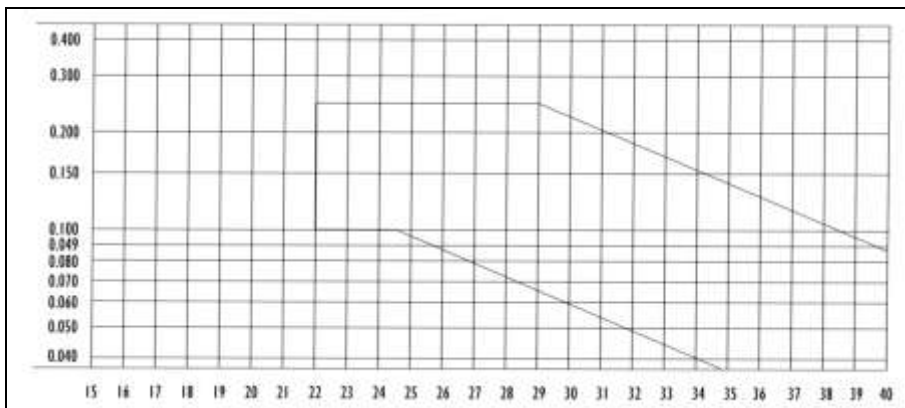
En l'absence de pigment, la courbe est pratiquement droite : elle constitue la ligne de référence qui permet de mesurer la hauteur de la dénivellation à 450 nm, correspondant à l'indice de Liley.

Le diagramme de Liley est établi en reportant les semaines de gestation en abscisse et l'indice de Liley en ordonnée. Trois zones y sont dessinées : inférieure, moyenne et supérieure correspondant respectivement à une atteinte légère, modérée et sévère (figure 4).

Figure 4 : Diagramme de Liley

Interprétation :

- indice au dessus de la ligne supérieure : anémie fœtale sévère très probable
- indice au dessous de la ligne inférieure : absence d'anémie fœtale
- indice dans la zone intermédiaire :
 - moitié basse : absence d'anémie sévère
 - moitié haute : une anémie fœtale, rarement sévère, est probablement présente



I. 7. 2. 2. La ponction de sang fœtal

L'accès direct à la circulation sanguine par la réalisation d'une ponction de sang fœtal (PSF) permet le dosage de l'hémoglobine fœtale et offre également la possibilité d'avoir un accès direct à la circulation fœtale afin d'effectuer une transfusion ou une exsanguino-transfusion. Avant 18 SA, l'abord sanguin fœtal est techniquement difficile. La PSF est donc principalement réalisée entre 18 et 34 SA, terme à partir duquel la tendance est généralement de faire naître l'enfant.

I. 8. Prise en charge fœtale et néonatale

I. 8. 1. Conséquences biologiques et cliniques de l'immunisation maternelle sur le fœtus

L'hémolyse fœtale (ou destruction des globules rouges) est responsable d'une anémie et d'une augmentation d'un produit de dégradation de l'hémoglobine, la bilirubine.

Lorsque l'anémie fœtale est sévère, elle aboutit à une anasarque (œdème généralisé) fœto-placentaire avec infiltration hydrique du fœtus et des annexes. En l'absence de prise en charge, ce tableau peut évoluer vers la mort in utero ou périnatale.

L'hyperbilirubinémie a beaucoup moins d'impact au cours de la vie intra-utérine car l'organisme maternel se charge de l'éliminer. En revanche, en période néonatale, elle peut évoluer vers un ictère qualifié « d'hémolytique » en raison de son étiologie. Celui-ci apparaît lorsque la capacité de glycuco-conjugaison de la bilirubine par le foie et d'excrétion du conjugué par la bile sont dépassées, entraînant une accumulation de la bilirubine non conjuguée (ou libre). Le transport de la bilirubine libre, assuré par l'albumine plasmatique, est en effet saturable : lorsque les capacités de liaison à l'albumine sont à leur tour dépassées, la bilirubine libre peut diffuser dans le milieu extra-vasculaire, notamment dans le cerveau où elle exerce une toxicité irréversible au niveaux des noyaux gris centraux (on parle alors « d'ictère nucléaire »).

L'ictère nucléaire néonatal fait suite à un ictère hémolytique néonatal caractérisé par sa précocité (identifiable dès le 1^{er} jour de vie, alors que l'ictère physiologique du nouveau né n'est observé que vers le 3^{ème} jour) et par la fréquence élevée des hyperbilirubinémies dépassant 200 mg/l (340 µmol/l, seuil de toxicité de la bilirubine chez le nouveau-né à terme).

L'encéphalopathie bilirubinique touche principalement les noyaux du thalamus, du tronc cérébral et du cervelet avec pour conséquence le décès ou des séquelles motrices et sensorielles. Il s'agit d'une complication exclusivement néonatale, la bilirubine fœtale étant épurée chez la mère via le placenta [37].

L'immunisation maternelle a généralement peu d'incidence sur le premier enfant RhD positif. En revanche, elle aura des conséquences sur les enfants ultérieurs RhD positif, avec une gravité des atteintes qui augmente avec le rang de l'enfant.

L'évolution naturelle de l'immunisation maternelle est la suivante : 45 à 50 % des enfants n'ont pas d'anémie significative à la naissance (simple ictère néonatal accentué) ; 25 à 30 % présentent une anémie modérée avec un risque important d'ictère nucléaire. Dans ce groupe, la mortalité sans traitement est de 90 %, alors que, chez les survivants, un handicap sévère (retard mental, surdité) est la règle. Enfin, 20 à 25 % développent un hydrops avec mort in utero, survenant une fois sur deux avant la 30^{ème} semaine de grossesse.

I. 8. 2. Thérapeutique in utero

I. 8. 2. 1. La ponction de sang fœtal

La ponction de sang fœtal (PSF) permet non seulement d'analyser le sang fœtal, mais est également utilisée pour les éventuelles transfusions.

Le sang transfusé doit satisfaire à un certain nombre de conditions : groupe O Rhésus négatif (et phéno-identique à la mère dans les systèmes antigéniques les plus immunogènes),

frais (de moins de 7 jours), déleucocyté et irradié, avec un hémocrite élevé pour limiter le volume transfusé et enfin, testé pour le VHB/VHC, CMV, VIH et la syphilis.

Selon les circonstances, une anémie fœtale (moins de 7g/dl d'hémoglobine au cours du 2^{ème} trimestre et moins de 8 g/dl au cours du 3^{ème} trimestre) est susceptible d'être traitée sous contrôle échographique (et surveillance des anomalies du rythme cardiaque du fœtus) jusque vers la 34^{ème} SA. Une première intervention peut être nécessaire dès le 4^{ème} mois de grossesse et ensuite renouvelée toutes les 2 à 4 semaines jusque vers 34 semaines.

I. 8. 2. 2. Autres techniques de transfusion

Il a été décrit des transfusions directes de l'enfant par abord intravasculaire ou par voie intrapéritonéale si l'abord vasculaire était difficile. Ces deux méthodes comportent des risques vasculaires (hémorragie cordonale, thrombose), obstétricaux (contractions utérines, rupture prématurée des membranes), infectieux et d'immunisation post-transfusionnelle chez la mère mais permettent d'obtenir un taux de survie aux alentours de 85 % en l'absence d'anasarque et de 65 % en cas d'anasarque fœto-placentaire.

Les transfusions intrapéritonéales sont des techniques anciennes, pouvant être réservées à un sauvetage fœtal très précoce avec anasarque [38, 39].

D'autres alternatives de transfusion sont parfois possibles dans les situations difficiles, comme par exemple la ponction de la veine ombilicale intrahépatique ou la ponction intra-cardiaque. Cette dernière technique n'est utilisée que par certaines équipes et n'est pas sans danger.

I. 8. 2. 3. L'exsanguino-transfusion

L'exsanguino-transfusion (EST) in utero consiste à remplacer le sang fœtal par du sang exogène conditionné pour la circonstance. Il s'agit d'une technique dont la mise en œuvre est plus longue (20 minutes environ) que la transfusion classique mais qui présente l'avantage d'un échange plus complet du sang du fœtus et surtout un risque de surcharge cardio-vasculaire moindre. Le rythme des transfusions dépend du taux d'hémoglobine initial et du taux d'hémoglobine atteint à la fin de la transfusion.

La perte moyenne quotidienne d'hémoglobine est aux alentours de 0,03 g/dl. La fréquence des transfusions est à adapter en fonction du suivi de l'évolution du taux d'hémoglobine de l'enfant et du Doppler au niveau de l'artère cérébrale moyenne. En moyenne, ces transfusions itératives sont réalisées toutes les 2 à 4 semaines jusqu'à ce que l'on décide de faire naître l'enfant.

I. 8. 2. 4. L'accouchement

L'accouchement prématuré est réalisé avant 34 SA en cas de souffrance fœtale ou d'échec de la transfusion fœtale. Le terme minimal d'extraction fœtal dépend des équipes et doit être commenté avec les parents.

Il est nécessaire, si le principe d'extraction fœtale prématurée est envisagé, de réaliser en routine, une corticothérapie de maturation pulmonaire. Ce traitement sera envisagé dès que le risque paraît imminent.

Après 34 SA, une naissance sera très facilement envisagée si le risque fœtal est élevé. Le mode de naissance (déclenchement ou césarienne) dépendra du degré de gravité supposé

de l'allo-immunisation, des signes de mauvaise tolérance fœtale et des conditions cervicales. Un accouchement par césarienne est souvent la résultante d'un fœtus fragilisé et de conditions cervicales immatures.

Dans tous les cas, il faut prévoir la naissance dans un centre spécialisé dont le niveau de soins est adapté à la pathologie de l'enfant.

I. 8. 3. Traitement post-natal et prise en charge en réanimation pédiatrique

La prévention de l'ictère nucléaire est l'objectif principal des 5 premiers jours. En effet, l'immaturation fonctionnelle hépatique du nouveau-né ne lui permet pas d'éliminer la grande quantité de bilirubine non conjuguée et son albumine plasmatique, vite saturée, ne peut retenir la bilirubine dans le secteur vasculaire. Si un traitement n'est pas rapidement entrepris, le risque est que la bilirubine traverse la barrière hémato-encéphalique. Le dosage de bilirubine dans le sang de cordon, puis les dosages sanguins quotidiens permettent de suivre la cinétique de l'hyperbilirubinémie que l'on s'efforce de maintenir en dessous de 200 mg/l (340 μ mol) [37].

La photothérapie conventionnelle constitue le traitement de première intention de l'ictère néonatal : elle consiste à soumettre le nouveau-né ictérique à l'action de rayonnements ultra-violets oxydant la bilirubine libre en produit atoxique. Si besoin, on peut avoir recours à la photothérapie intensive continue (irradiation supérieure à 2 mW/cm² sur 360°).

L'exsanguino-transfusion néonatale sur sang total de 2 à 3 masses sanguines n'est mise en œuvre qu'en cas d'hyperbilirubinémie massive car, malgré sa grande efficacité

(diminution de plus de 90 % de la bilirubine libre), une mortalité de l'ordre de 1 % reste toujours à déplorer [13].

La prise en charge de ces enfants prématurés fragiles, anémiés, voire insuffisants cardiaques, nécessite un milieu de réanimation pédiatrique (centre de niveau 3) avec une équipe pluridisciplinaire. La surveillance doit être particulièrement intensive et ce, même quand plusieurs semaines se sont écoulées : le risque d'anémie persiste jusqu'à l'élimination des anticorps maternels (1 à 4 mois), et il est accentué par la dépression physiologique post-natale de l'érythropoïèse. Une anémie sévère peut parfois se constituer au cours des 2 premières semaines chez des nouveau-né peu ou pas symptomatiques lors des premiers jours.

II – LE RHESUS D

Le groupe Rhésus a été découvert par Karl Lansteiner et Alexander Wiener en 1940 à partir de travaux sur des macaques Rhésus qui ont servi à fabriquer le premier sérum-test permettant de tester les groupes Rhésus.

Dans la pratique médicale courante, on distingue les individus « Rh négatif » qui ne portent pas l'antigène D sur la surface de leurs hématies et qui développent une réaction immunitaire hémolytique lorsque cet antigène D leur est présenté.

Au contraire, les individus « Rh positif » présentent l'antigène D et ne rejettent pas les hématies qui proviennent d'individus Rh négatif. Ces problèmes d'histocompatibilité ont, jusqu'à il y a encore quelques années, provoqué des problèmes de mortalité dans la période périnatale pour les enfants Rhésus positif portés par des mères Rhésus négatif déjà immunisées contre l'antigène D.

Or environ 15% de la population française d'origine caucasienne est de phénotype Rhésus négatif. De 150 000 à 165 000 femmes RhD négatif sont donc enceintes chaque année en France, dont environ deux tiers sont enceintes d'un fœtus Rh positif et c'est seulement ces dernières qui sont à risque de développer une immunisation anti-RhD.

II. 1. Le gène Rhésus

Le gène Rhésus, situé sur le bras court du chromosome 1 en position 34-36 (1p34-36), a été séquencé en 1991 par Y Colin et ses collaborateurs [40].

Le locus Rhésus est en fait constitué de 2 gènes D et CE correspondant à trois marqueurs membranaires : D ou rien (noté d), C ou c, et E ou e. Du fait de leur proximité sur

le chromosome, ces trois gènes seraient transmis comme s'ils étaient liés. Par commodité, on parle plus régulièrement d'un « gène Rhésus » pour désigner l'ensemble de ces deux gènes.

Pour le gène CE, chaque individu possède deux polymorphismes : un marqueur membranaire C ou c, et un marqueur membranaire E ou e. Ces allèles Cc et Ee seraient des allèles codominants.

Pour le gène D, les polymorphismes sont beaucoup plus nombreux. L'allèle D correspond à la présence d'un marqueur, et l'allèle d à son absence.

Dans notre exposé, nous employons la nomenclature composée de lettres, plus commune. Mais la nomenclature recommandée est en principe composée de chiffres. Les équivalences sont décrites en annexe 2.

II. 2. L'antigène et la protéine Rhésus D

L'antigène RhD est une véritable mosaïque d'épitopes. Il est par conséquent très immunogène du fait de ses épitopes multiples distribués sur les domaines extra-cellulaires de la protéine RhD, protéine transmembranaire du globule rouge.

Cette protéine RhD est absente des globules rouges des patients RhD négatif. Par contre, on peut en retrouver 15 000 exemplaires par globule rouge de patients RhD positif. Les sujets RhD partiels sont Rhésus D positif, mais n'expriment pas l'ensemble des épitopes antigéniques.

Cet antigène RhD est présent chez environ 85% des personnes originaires d'Europe occidentale, et l'on observe un gradient croissant de fréquence vers le Sud (environ 95% des personnes originaires d'Afrique Noire sont RhD positif), mais aussi vers l'Est (plus de 99% des personnes originaires du Sud-Est Asiatique sont RhD positif).

II. 3. Les antigènes C et E et la protéine Rhésus CE

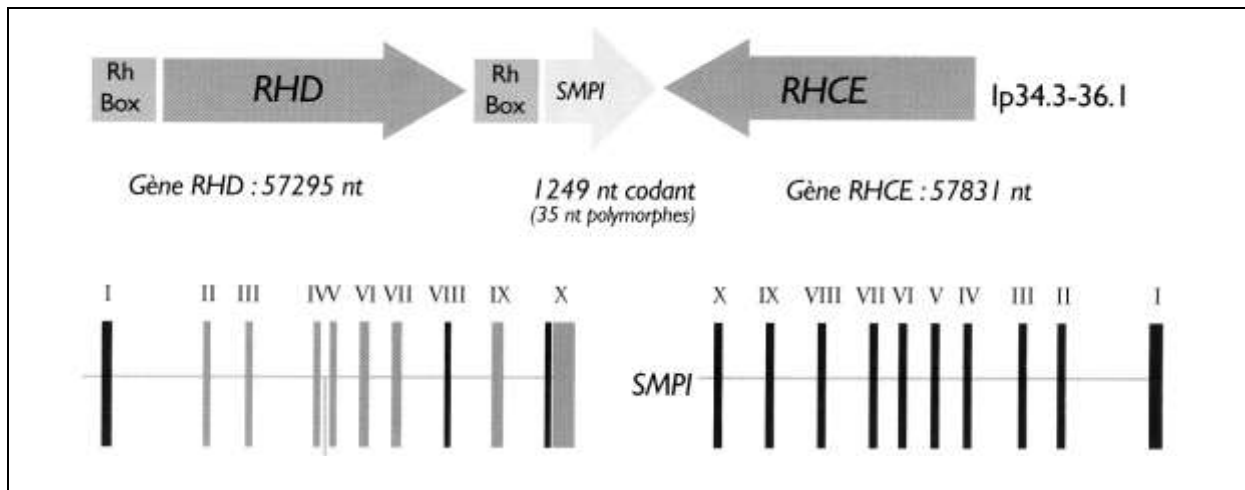
Les autres antigènes courant du système Rhésus (C, c, E et e) sont exprimés sur la protéine érythrocytaire RhCE qui est présente chez tous les sujets RhD positifs et négatifs. Elle est le produit du gène RhCE, situé sur le même locus que le gène RhD, et issu d'un même gène ancestral, expliquant la forte homologie de séquences nucléotidiques entre les deux gènes.

II. 4. Le locus Rhésus

Les deux protéines Rhésus D et CE sont donc codées par deux gènes homologues RhD et RhCE, situés « tête-bêche » sur le bras court du chromosome 1. Les deux gènes sont orientés de manière opposée, les deux parties terminales 3' se faisant face, et sont séparés par une courte région d'ADN comprenant le gène SMP1.

Les deux gènes de 75 kb chacun partagent une même organisation génomique avec 10 exons chacun dont la partie codante de 1249 paires de bases (bp) diffère seulement de 35 bp au niveau de 8 des 10 exons. Ces différences entraînent l'expression de l'antigène RhD et de tous ces épitopes (figure 5).

Figure 5 : Le locus Rhésus



II. 5. Les variants du gène RhD

II. 5. 1. Les gènes RhD partiels ou atténués

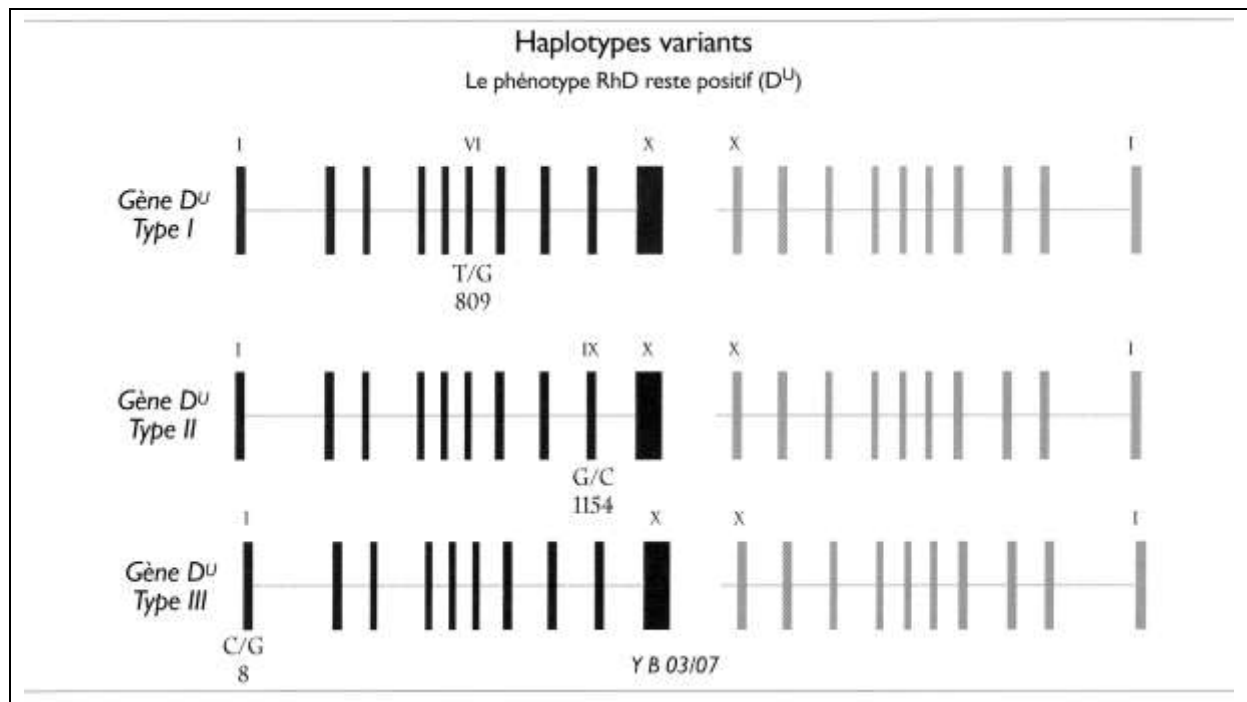
Les polymorphismes peuvent conduire à une expression partielle de l'antigène D (D partiels) ou bien à un affaiblissement quantitatif de son expression sur le globule rouge (D atténué ou D^u). Cette modification d'expression du gène RhD peut être liée à différentes causes :

- une mutation nucléotidique ponctuelle
- une substitution de séquence du gène RhD par des séquences équivalentes du gène RhCE
- une insertion de nucléotides supplémentaire

La cause moléculaire de ces variants partiels ou atténués reste inconnue, mais le séquençage des dix exons du gène RhD a permis de retrouver au moins 16 types de variants atténués différents [2]. Les mutations se situent principalement sur 4 régions de la protéine RhD (mutations sur les acides nucléiques en position de 2 à 13, autour de la position 149, en

position 179 à 225, et 267 à 397). Une mutation simple d'un nucléotide correspond à un acide aminé différent situé en intra-cellulaire ou en trans-membranaire, venant ainsi perturber la configuration de la protéine et donc l'antigénicité de la protéine D. Le phénotype RhD reste néanmoins positif (figure 6).

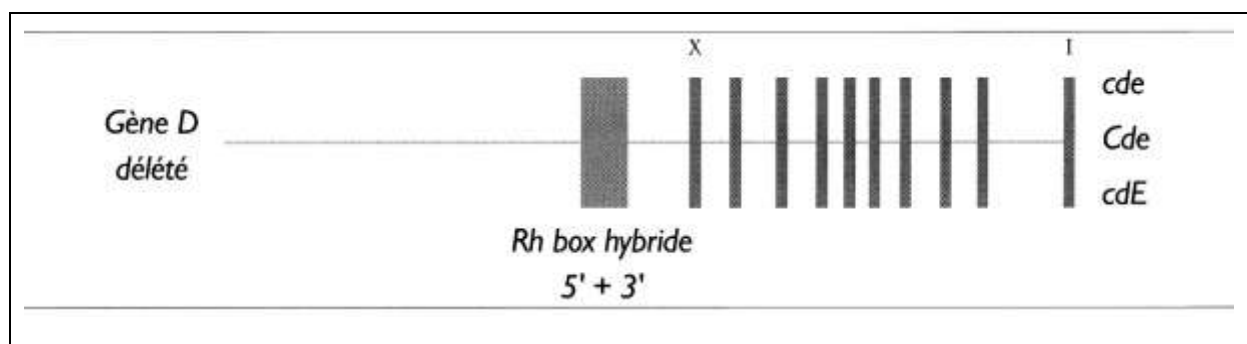
Figure 6 : Quelques exemples de gènes RhD atténués (D^u)



II. 5. 2. Le gène RhD délété

Le phénotype peut devenir négatif : c'est en général le cas lié à une délétion complète du gène D, où il ne reste plus alors que le gène CE (figure 7). C'est ce mécanisme qui est retrouvé dans plus de 99 % des patients RhD négatif d'origine caucasienne.

Figure 7 : Délétion complète du gène D



II. 5. 3. Le pseudogène RhD ψ et le gène hybride D-CE-D

D'autres mécanismes sont possibles, donnant des cas de Rhésus négatif, comme chez certaines patientes africaines où l'on peut retrouver la présence du pseudogène RhD ψ . Ce pseudogène contient une insertion de 37 paires de bases au niveau de l'exon 4, introduisant un codon « stop » en position 210 [3]. Il n'y a donc pas de traduction du gène en protéine RhD et ce pseudogène est donc non fonctionnel (figure 9, haut).

Il peut par ailleurs y avoir une conversion CE étendue sur le gène RhD aboutissant à un gène hybride, sans expression protéique à la surface du globule rouge. Le mécanisme aboutissant à ce gène hybride a été suggéré par Wagner et al. [4]. A partir de la structure initiale des gènes RhD et RhCE (figure 7 et figure 8-A), il propose un crossing-over inégal des «Rhesus box », possible du fait de leur forte homologie (figure 8-B). Il en résulte alors la formation d'un gène hybride D-CE-D (figure 9, bas).

Figure 8 : Mécanisme pouvant expliquer la formation du gène hybride D-CE-D

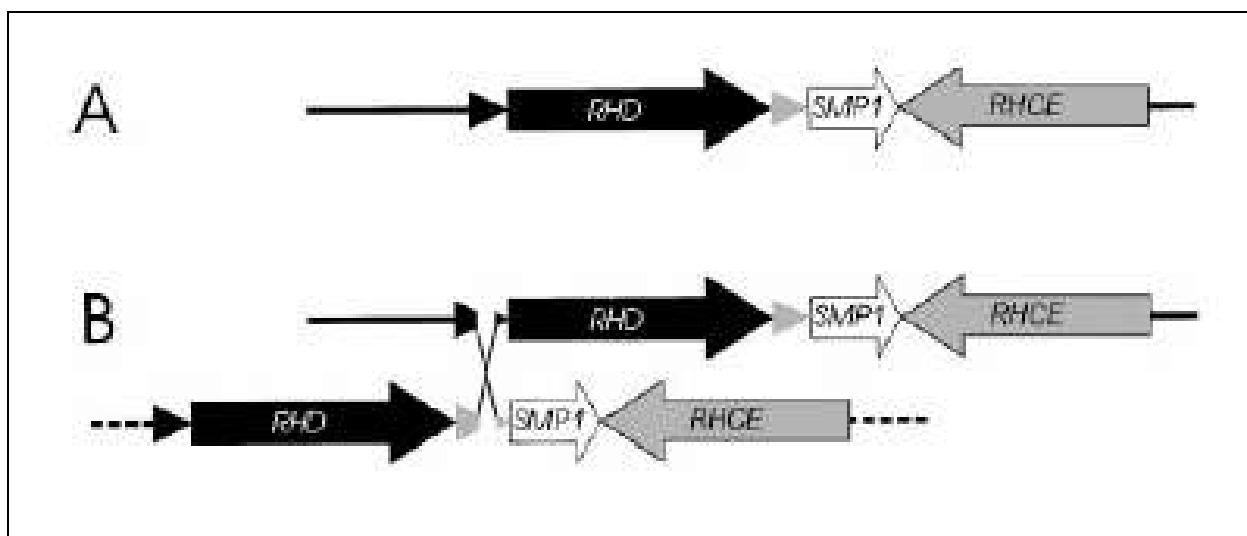
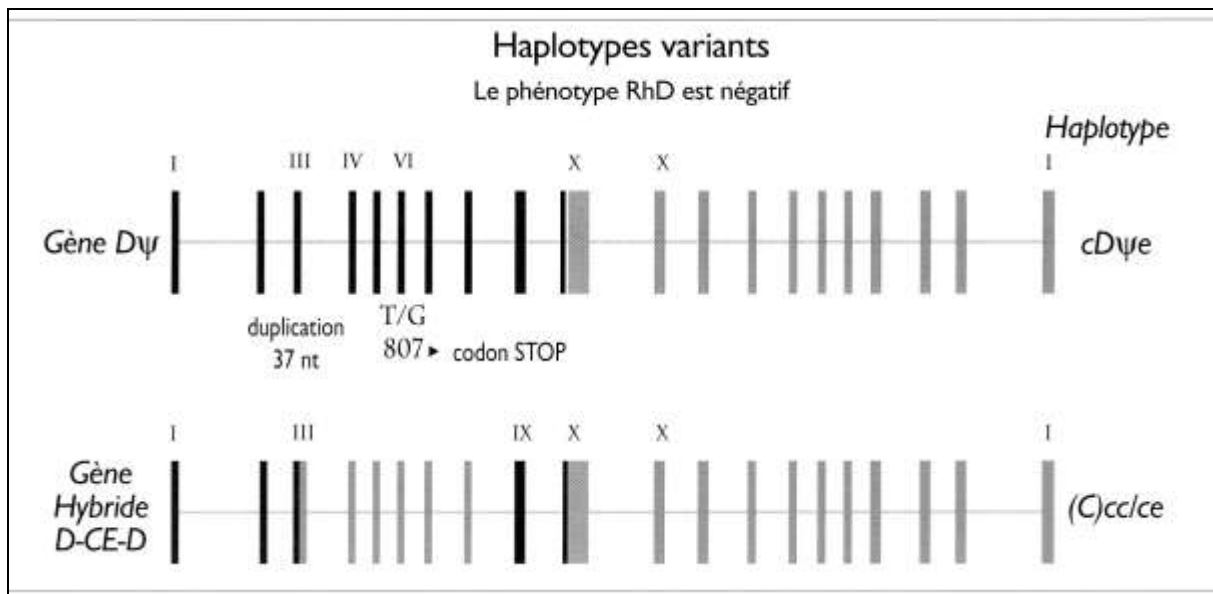


Figure 9 : Pseudogène RhD ψ (haut) et gène hybride D-CE-D (bas)



II. 6. Répartition génotypique des personnes RhD négatif

Les caucasiens, dont la prévalence des femmes Rhésus négatif est de 15 % ont pour plus de 99 % un gène RhD délété, facilitant le génotypage.

Par contre, environ 1 % d'entre-elles possèdent un gène muté non fonctionnel ou hybride D-CE-D.

Dans la population africaine, la fréquence des femmes Rhésus D négatif est plus faible (environ 3 à 5 %), mais la situation est bien différente : dans 25 % des cas au maximum, il s'agit d'un gène RhD délété ; dans 60 à 70 % des cas, il s'agit de gènes mutés non fonctionnels ; et dans 10 à 20 % des cas, il s'agit de gènes hybrides (tableau 10).

Tableau 10 : Profil génotypique des personnes RhD négatif

	CAUCASIENS RhD négatifs (15 %)	NOIRS AFRICAINS RhD négatifs (3 à 5 %)
Gène(s) hybride(s) D-CE-D	< 1 %	10-20 %
Gène(s) muté(s) non fonctionnels	< 1 %	60-70 %
Gène D délété	> 99 %	10-25 %

III. L'ADN FOETAL

C'est en 1972 avec le développement de l'amniocentèse, puis en 1974 avec l'apparition de l'échographie, que le diagnostic prénatal a vraiment débuter, offrant alors aux couples la possibilité de mieux suivre le développement de leur fœtus.

La recherche dans ce domaine n'a alors cessé de progresser, permettant l'amélioration de techniques existantes et la mise au point de nouvelles, plus performantes ou complémentaires.

Concernant la détermination du Rhésus D fœtal, les techniques alors utilisables étaient et restent encore aujourd'hui invasives. Que se soit la biopsie du trophoblaste, l'amniocentèse ou la cordocentèse, toutes présentent des risques de perte fœtale, incitant depuis longtemps à la recherche de moyens non invasifs de diagnostic prénatal.

III. 1. Les sources de matériel génétique :

Pendant de nombreuses années, il a été supposé que la barrière placentaire était semi-perméable, ne permettant que le passage des nutriments de la mère au fœtus. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence un trafic bidirectionnel entre la mère et l'enfant [44] et l'existence de matériel génétique fœtal dans le sang maternel [45,46]. La découverte de ce matériel biologique fœtal a depuis fait l'objet de nombreux travaux ayant pour but de mettre au point des tests diagnostics non invasifs, sans danger pour la mère ou l'enfant, plus précoces que les techniques existantes et aussi fiables que les méthodes invasives actuelles.

III. 1. 1. Les cellules fœtales

Dès 1893, des cellules supposées fœtales ont été observées dans le sang maternel : Schmorl avait identifié des cellules trophoblastiques dans les poumons de femmes décédées d'éclampsie.

D'autres chercheurs firent des observations similaires, mais la preuve définitive de l'origine fœtale de ces cellules ne fut apportée qu'en 1969, lorsque Walknowska mit en évidence la présence de séquences spécifiques du chromosome Y sur des lymphocytes extraits du sang maternel [46].

Par la suite, la seule grande étude réalisée par Bianchi a conduit à la conclusion que cette approche ne pouvait pas être proposée actuellement [47]. Malgré d'autres développements récents d'enrichissement et de détection de ces cellules, son utilisation clinique à court terme semble donc peu probable [48]. De même, l'alternative des cellules fœtales isolées à partir de lavage cervical ou utérin n'a pas encore fait la preuve de son efficacité et n'est donc pas utilisable [49].

III. 1. 2. L'ADN fœtal libre circulant

III. 1. 2. 1. Découverte

III. 1. 2. 1. 1. Dans le sang maternel

S'inspirant de l'existence d'ADN d'origine néoplasique dans le sang de patients atteints d'un cancer [50], et des points communs entre les tumeurs et la gestation (présence d'un corps « étranger », vascularisation partagée avec l'hôte), YM Dennis Lo et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence d'acide nucléique fœtal libre dans le sang maternel pour la première fois en 1997 [45]. Ceci a été réalisé par extraction de l'ADN total à partir du sang d'une mère portant un fœtus de sexe masculin, suivi de l'amplification d'une séquence spécifique du chromosome Y.

La présence de cet ADN fœtal libre circulant dans le sang maternel a été rapidement confirmée par d'autres études [51,52].

Onze ans après sa découverte, l'analyse de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel commence à faire partie des outils du diagnostic prénatal même si ces tests sont encore réservés à de rares laboratoires spécialisés. La possibilité offerte de déterminer le sexe et le génotype Rhésus du fœtus est une réalité qui peut modifier la prise en charge de certaines pathologies fœtales.

III. 1. 2. 1. 1. 1. Origine

L'origine tissulaire et cellulaire de l'ADN fœtal dans le sang maternel est très certainement multiple. Il existe un turn-over extrêmement rapide qui laisse penser que

d'importantes quantités sont libérées continuellement dans la circulation sanguine maternelle. Zhong a démontré que l'apoptose d'érythroblastes fœtaux circulant dans le sang maternel ne peut pas être la source cellulaire essentielle de l'ADN fœtal plasmatique [53].

De plus, l'observation d'une augmentation croissante tout au long de la grossesse de la concentration en ADN fœtal suggère une origine placentaire [54]. La mise en évidence d'une corrélation entre le taux de bêta-hCG sérique maternel et la quantité d'ADN fœtal circulant conforte cette hypothèse [55].

En 2004, Flori apporte la preuve que l'ADN fœtal libre circulant est bien issu des cellules cytotrophoblastiques et syncytio-trophoblastiques [56]. Le mécanisme par lequel cet ADN fœtal est relargué dans la circulation maternelle est en revanche mal connu ; la capture et la dégradation au niveau des capillaires pulmonaires de très nombreuses cellules trophoblastiques libérées dans la circulation sanguine utérine pourraient expliquer la présence en grande quantité de cet ADN fœtal dans le sérum maternel. Le relarguage actif d'ADN fœtal à partir des villosités chorales est également une hypothèse plausible.

III. 1. 2. 1. 1. 2. Cinétique

L'apparition de l'ADN fœtal dans la circulation sanguine maternelle est très précoce. Lo a montré qu'il est possible d'en détecter la présence dès 6 semaines de grossesse [54]. Guibert a complété ces données par une étude après transfert d'embryon chez des patientes ayant eu recours à une fécondation in vitro [57]. Il apparaît que l'ADN fœtal est détectable dès le 18^{ème} jour pour certaines patientes et au moins au 34^{ème} jours de grossesse pour toutes les patientes testées.

La quantité d'ADN fœtal fluctue et augmente ensuite tout au long de la grossesse [58]. Elle est estimée à 3,4 % (25 équivalents génome fœtal/ml de plasma maternel) et à 6,2 %

(100 équivalents génome fœtal/ml de plasma maternel) de l'ADN plasmatique total maternel aux 1^{er} et 3^e trimestres de grossesse respectivement [54].

Concernant l'élimination de l'ADN fœtal du sérum maternel, Lo a démontré que l'ADN fœtal libre est totalement éliminé de la circulation maternelle moins de 48 heures après l'accouchement [59].

Mais certains auteurs ont néanmoins rapporté la détection d'ADN fœtal dans le plasma de patientes en dehors d'un contexte de grossesse [60]. L'hypothèse d'une éventuelle persistance d'ADN fœtal libre n'est pas en accord avec les résultats obtenus par différentes équipes [61-64] et cette hypothèse est aujourd'hui rejetée par plusieurs études [65,66]. L'ADN fœtal libre ne persiste donc pas dans la circulation maternelle contrairement à certaines cellules fœtales, et son analyse n'est donc pas faussée par des grossesses antérieures.

Par ailleurs, la stabilité de l'ADN fœtal dans le plasma maternel laisse supposer que celui-ci ne circule pas sous une forme « nue » car il serait dégradé par des nucléases plasmatiques, ce qui ne semble pas être le cas [67]. Il est donc probable que l'ADN fœtal circule associé à des protéines au sein de nucléosomes, forme ultime du processus d'apoptose cellulaire. Il a tout de même été démontré par hybridation in situ, qu'une fraction au moins de cet ADN plasmatique circule au sein d'éléments corpusculaires apoptotiques [68]. De plus, l'étude de stabilité montre que l'ADN fœtal plasmatique stocké à -20°C n'était toujours pas dégradé après 4 ans de conservation [69].

III. 1. 2. 1. 2. Dans les urines maternelles

Suite à la découverte d'ADN libre fœtal circulant dans le sang maternel, Botezatu, en 2000, s'interroge sur un éventuel passage de ces molécules d'ADN à travers la barrière rénale,

son excrétion dans les urines et son utilisation potentielle en tant qu'outil diagnostique dans le diagnostic ante-natal non invasif [70].

Des séquences spécifiques d'ADN du génome humain mâle ont pu être mise en évidence dans l'urine de femmes enceintes de fœtus de sexe masculin, ou de femmes transfusées par du sang d'un donneur mâle. De même, la présence de la mutation K-ras dans l'urine de patients atteintes d'un cancer du colon a pu être détectée, ce qui laisse supposer que la barrière rénale est perméable à des molécules d'ADN suffisamment longues pour permettre une analyse génétique.

Cette détection de séquences spécifiques du chromosome Y dans les urines de femmes enceintes a été confirmée par PCR imbriquée, mais avec une sensibilité de 38% seulement [71]. Une amélioration de la technique est donc nécessaire pour envisager son utilisation dans le diagnostic pré-natal.

Bien que réfutée par certains, la présence d'ADN fœtal dans les urines maternelles semble maintenant établie. Des études plus poussées ont montré que l'ADN présent dans les urines est plus court que celui retrouvé dans le plasma maternel et que les quantités présentes sont bien moins importantes [69].

III. 1. 2. 2. Technique d'extraction de l'ADN libre circulant dans le sang maternel

L'analyse de l'ADN fœtal dans le sang maternel peut s'affranchir des étapes d'enrichissement et d'isolement nécessaires lorsque l'on étudie les cellules fœtales.

Elle ne nécessite qu'une extraction de l'ADN à partir du plasma maternel par une technique simple et assez rapide. Cependant, la quantité d'ADN fœtal circulant étant faible (environ 5 à 10 % de l'ADN total), il est nécessaire d'utiliser des méthodes d'analyse très sensibles et très fiables.

L'extraction a pour objectif d'extraire et de purifier les acides nucléiques libres à partir d'échantillons de plasma maternel. Le plasma d'une femme enceinte contient des concentrations d'ADN fœtal faibles mais croissantes avec l'âge gestationnel. Cet ADN équivaut à quelques copies jusqu'à plusieurs centaines de copies de génome fœtal par mL de plasma.

A la fin de la manipulation, on obtient alors un extrait contenant 90 à 95 % d'ADN maternel et 5 à 10 % d'ADN fœtal. Les femmes enceintes RhD négatif ne possèdent pas le gène Rhésus D. Par contre, il est possible d'identifier ce gène dans leur plasma si leur fœtus est RHD positif.

Pour chaque génotypage, l'ADN est extrait à partir de 500 µl de plasma maternel dans lequel a été ajouté de l'ADN traceur (dans notre cas, il s'agit d'ADN de maïs, utilisé comme témoin interne validant une bonne extraction). La manipulation est réalisée à l'aide du kit QIAamp DSP Virus kit (Qiagen, Les Ulis, France).

Après une étape de lyse des protéines, le mélange réactionnel est déposé sur une colonne sur laquelle se fixe l'ADN. Après plusieurs lavages, l'ADN est élué dans un volume final de 30 µl afin de concentrer au maximum l'ADN fœtal.

Dans chaque série d'extraction, en plus des échantillons des patientes, sont inclus un contrôle positif (plasma de patient RhD positif), un contrôle négatif (plasma de patient RhD négatif) et un contrôle blanc (500 µl d'eau remplacent le plasma).

III. 1. 2. 3. L'analyse par PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel est une technique sensible et spécifique capable de quantifier les produits de PCR par détection de fluorescence. Les amplifications géniques sont réalisées dans un thermocycleur capable de détecter les émissions de fluorescence afin de répondre au mieux aux exigences de non-contamination, de rapidité et de fiabilité des analyses de biologie moléculaire.

La PCR est réalisée à partir des ADN obtenus en utilisant le *Light Cycler 480* sur plaques opaques de 96 puits dans un volume réactionnel de 15µL. Cinq µl de l'éluat contenant l'ADN fœtal plasmatique est utilisé par PCR. Il est réalisé 3 PCR différentes pour chaque échantillon : une PCR réalisée avec les amorces et la sonde Taqman spécifiques de l'exon 7, une PCR réalisée avec les amorces et la sonde Taqman spécifiques de l'exon 10 et une PCR réalisée avec les amorces et la sonde Taqman spécifiques de l'ADN de maïs.

Les séquences nucléotidiques de ces couples d'amorces sens [F] et anti-sens [R] utilisées sont indiquées dans le tableau 11.

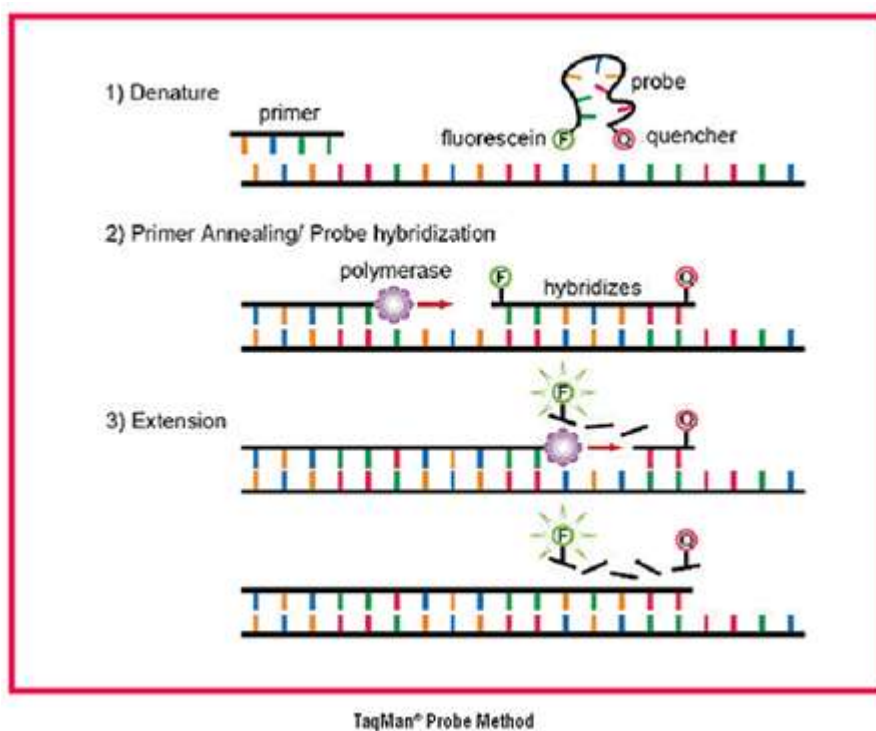
Tableau 11 : Séquences nucléotidiques des couples d'amorces utilisés

NOM	Amorce Sens [F]	Amorce Anti-sens [R]
Exon 7	GGGTGTTTGTAACCGAGTGCTG	CCGGCTCCGACGGTATC
Exon 10	CCTCTCACTGTTGCCTGCATT	AGTGCCTGCGCGAACATT

La méthode utilisée se fait par hybridation de sondes fluorescentes : liaison d'une sonde oligonucléotidique complémentaire de la séquence d'ADN à amplifier. Cette sonde est composée d'un fluorochrome et d'un quencher qui inhibe l'émission de fluorescence. Au

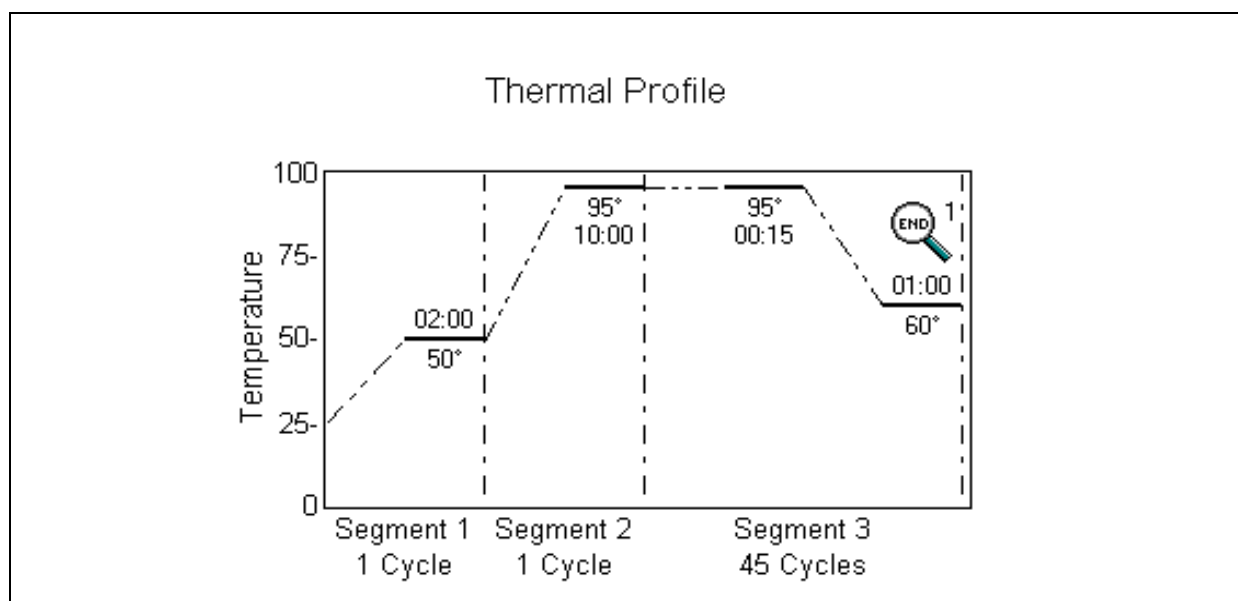
cours de la synthèse du produit de PCR, la polymérase va dégrader la sonde oligonucléotidique séparant le fluorochrome de son quencher, induisant l'émission de fluorescence (figure 10).

Figure 10 : Principe de la PCR quantitative en temps réel par hybridation de sondes fluorescentes



Après une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 minutes, le cycle d'hybridation/synthèse (15 secondes à 95°C, puis une minute à 60 °C) est répété 50 fois. C'est lors de la phase de 1 minute à 60°C qu'il y a accrochage des amorces et de la sonde sur le brin complémentaire, puis synthèse du brin et libération du fluorochrome (figure 11).

Figure 11 : Programme des cycles de qPCR



L'appareil enregistre la quantification de la fluorescence à la fin de chaque cycle d'amplification. Ceci est une mesure en temps réel de la quantité d'ADN amplifiée et donc de la quantité de l'ADN reconnu spécifiquement par les amorces sens et anti-sens.

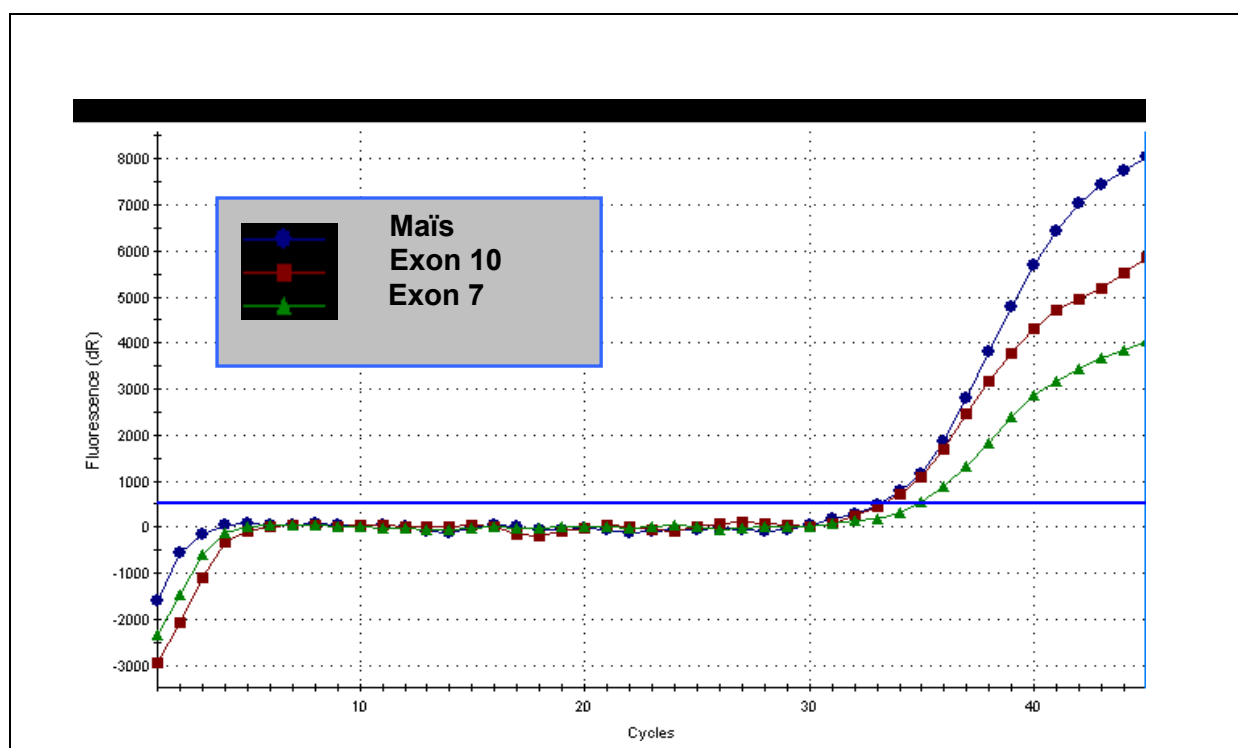
III. 2. Recherche du gène RhD

La présence du gène RhD fœtal dans l'ADN plasmatique est détectée par l'amplification génique (PCR) de deux régions distinctes spécifiques du gène RhD : l'exon 7, très spécifique, mais pouvant être absent chez certains sujets D partiels, et l'exon 10 qui est l'exon le mieux conservé du gène RhD. Ceci est réalisé afin de détecter un maximum de variants du système Rhésus.

La qualité de l'extraction est validée par la PCR de l'ADN de maïs, dont le seuil d'émission de la fluorescence [CT = Cycle Threshold « (cycle de seuil) », mais aussi parfois CP = Crossing Point (« point de croisement »)] se situe aux alentours de 34-35 cycles.

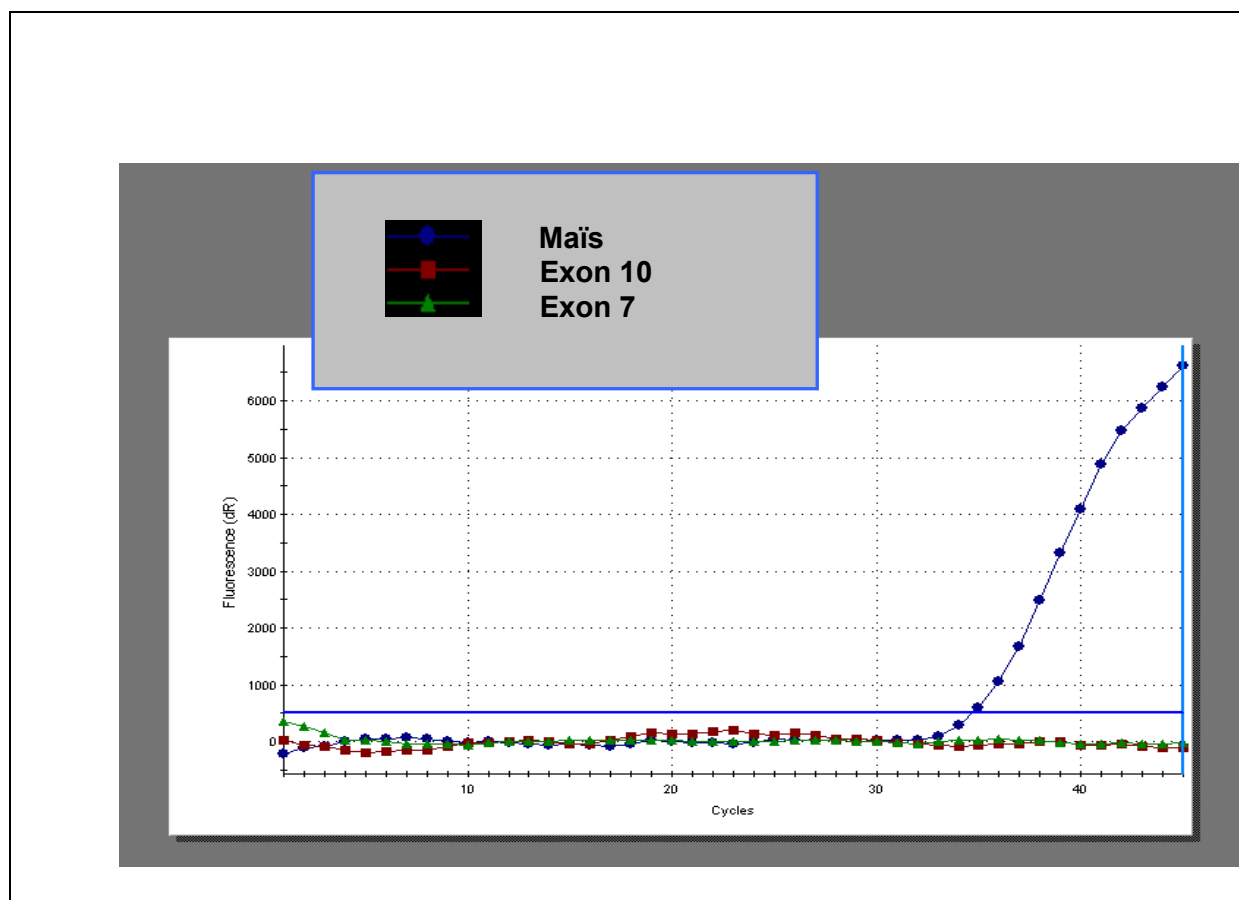
Un fœtus est génotypé RhD positif quand les deux PCR sont positives pour les exons 7 et 10, avec un Ct légèrement supérieur à celui du maïs (figure 12).

Figure 12 : Fœtus RhD positif (résultat avec Stratagène MX 3000)



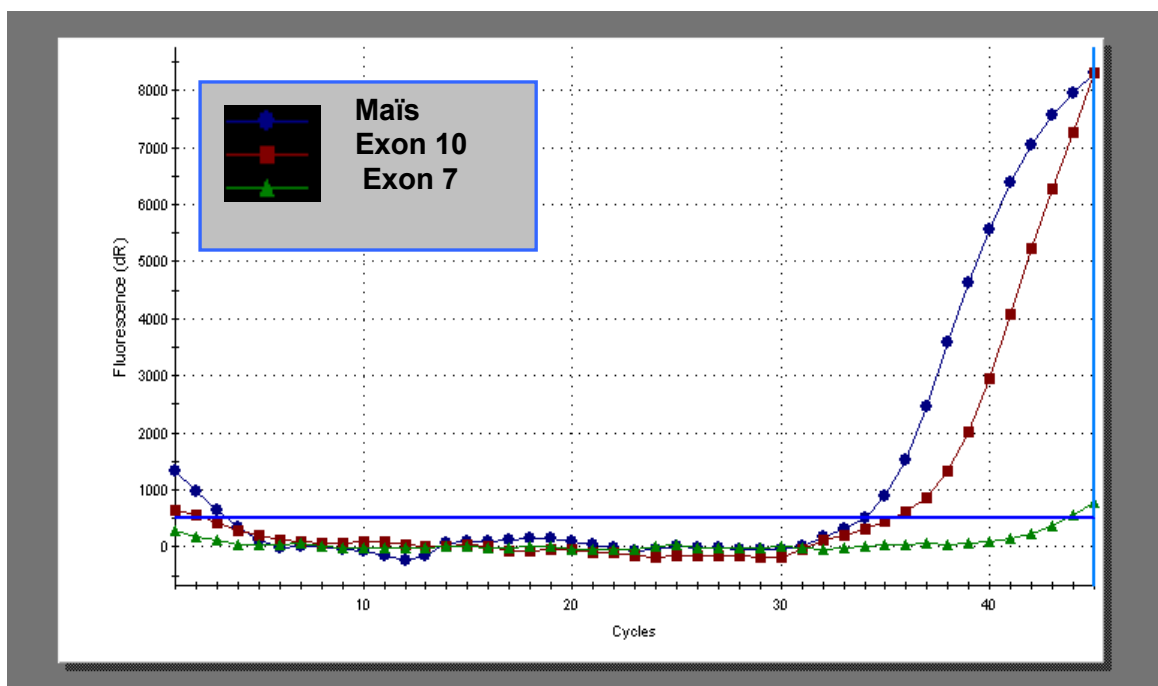
Un fœtus est génotypé RhD négatif quand aucun signal n'est détecté pour les PCR des exons 7 et 10. En revanche, l'émission de fluorescence pour l'ADN de maïs aux alentours de 34 cycles confirme la bonne qualité de l'extraction (figure 13).

Figure 13 : Fœtus RhD négatif (résultat avec Stratagène MX 3000)



Lorsque les résultats sont discordants (un signal est détecté pour un seul exon), la présence d'un variant Rhésus est très fortement suspectée (figure 14).

Figure 14 : Génotype RhD fœtal indéterminé (résultat avec Stratagène MX 3000)



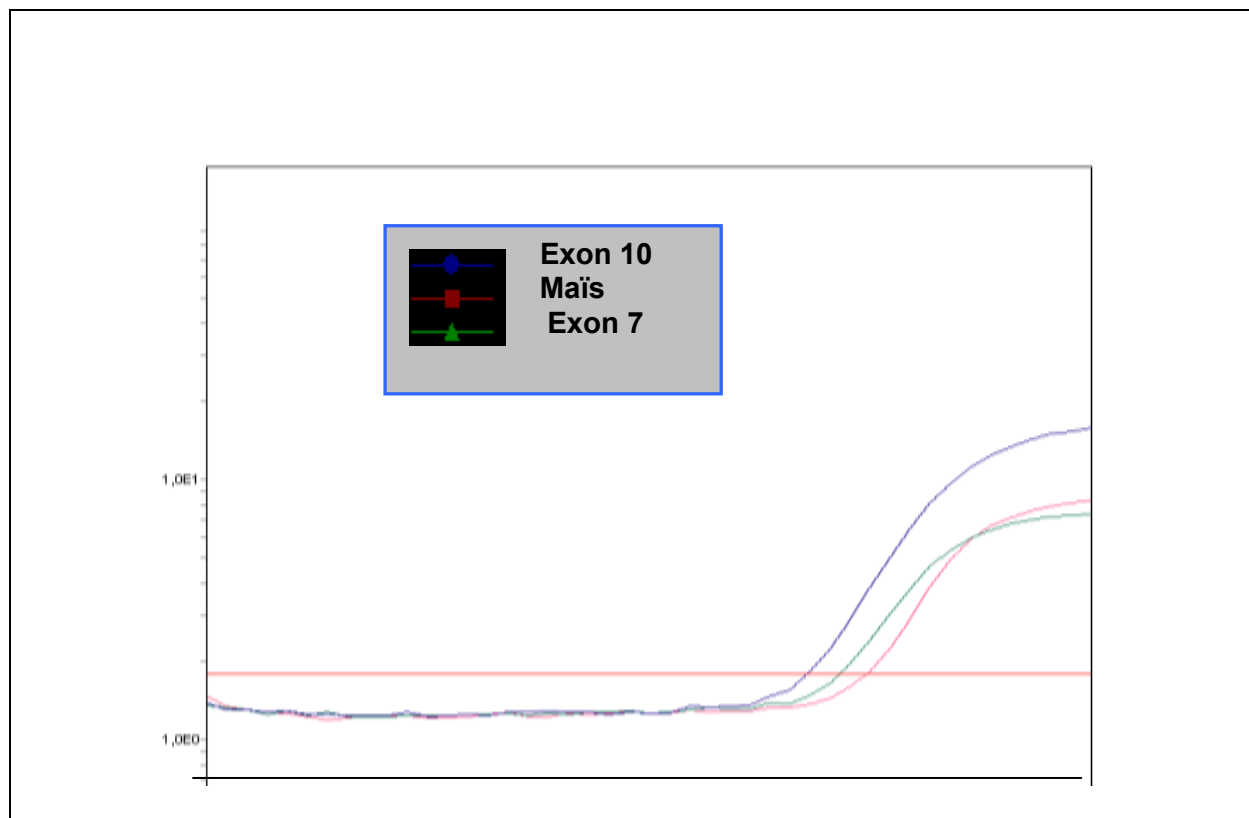
Il n'y a actuellement pas de contrôle interne universel permettant d'assurer que le fœtus est bien RhD négatif lorsque la réaction PCR est négative. Toutefois, on peut réduire considérablement le risque de faux négatif par différents moyens :

- en n'effectuant le test que sur des échantillons sanguins prélevés au delà de 12 SA (quantité d'ADN fœtal circulant suffisante)
- en incluant un témoin interne d'extraction constitué d'ADN étranger, végétal (ici, l'ADN de maïs)
- en répétant le test sur un nouvel échantillon de sang prélevé à distance dans le cas de négativité du résultat.

Le test n'est pas applicable lorsque le génome maternel contient un gène D silencieux interférant avec les PCR des exons 7 et 10.

Sa présence est suspectée lorsque l'amplification génique des deux exons du gène RhD débute précocement (environ 10 cycles) par rapport au témoin positif. Cette situation concerne environ 1% des femmes rhésus négatif caucasiennes et jusqu'à 50% des femmes rhésus négatif d'Afrique Noire. Le génotype fœtal Rhésus est alors indéterminé (figure 15).

Figure 15 : Génotype RhD fœtal indéterminé (résultat avec Light Cycler 480)



Le tableau 12 nous montre comment interpréter les résultats de la qPCR en fonction des seuils d'émission de fluorescence des exons 7 et 10 ;

Tableau 12 : Interprétation des résultats

Résultats		Interprétation RhD	Conclusions
Exon 7	Exon 10		
+	+	Génotype RhD positif	Génotype fœtal RhD positif
-	-	Génotype RhD négatif	Génotype fœtal RhD négatif
-	+	Génotype RhD incertain Variant possible de type Cde, Cde ^s (RhD négatif), DIVb, DBT(RhD positif)	Génotype fœtal RhD indéterminé
+	avec un Cp précoce	Mère RhD négatif ayant un haplotype Cde ^s ou Cde avec exon 10	Génotype RhD fœtal positif
-	avec un Cp précoce	Mère RhD négatif ayant un haplotype Cde ^s ou Cde avec exon 10	Génotype RhD fœtal indéterminé
avec un Cp précoce	avec un Cp précoce	Gène D maternel silencieux si phénotype RhD négatif	Génotype fœtal RhD indéterminé

IV. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE SUR NANTES

IV. 1. Matériels et méthodes utilisés

Le kit servant au génotypage du Rhésus fœtal est commercialisé par la société Jacques Boy. Avant de débiter notre étude préliminaire, ce kit a été évalué dans le laboratoire de Biologie Moléculaire du CHU de Nantes, à l'aide de sérums témoins. La technique d'extraction était identique à celle précédemment décrite et l'évaluation a été réalisée par PCR quantitative en temps réel sur un appareil de qPCR *Stratagène MX 3000*, puis sur l'appareil ayant été utilisé pour notre étude, le *Light Cycler 480*.

IV. 2. Résultats

Sur les 30 plasmas fournis par le Dr Brossard du Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale (CNRHP) à Paris, 17 ont été analysés dans le laboratoire de Biologie Moléculaire du CHU de Nantes.

Sur ces 17 échantillons, il a été réalisé une extraction de l'ADN, puis une PCR quantitative en temps réel. Une fois les manipulations terminées, nos résultats étaient comparés à ceux de l'équipe parisienne.

Les résultats sont exposés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Résultats obtenus sur les échantillons témoins

Initiales patientes	Terme (SA)	Résultats Paris	MX3000			LC480			Résultats laboratoire Nantes
			CT MAIS	CT EX7	CT EX10	CT MAIS	CT EX7	CT EX10	
PF	23	rhd+	33,36	36,49	42,49	33,85	39,78	41,09	RHD+
DA	30	rhd+	32,69	34,36	40,98	34,44	34,3	36,54	RHD+
EC	22	rhd+	33,44	36,89	42,67	35,29	37	38,81	RHD+
GAS	33	rhd+	33,09	36,89	41,51	34,82	38,08	39,58	RHD+
PA	24	rhd- R'R-	34,49	0	34,77	35,47	0	33,9	RHD uncertain
KM	25	rhd+	33,07	36,57	42,71	34,49	40,87	42,21	RHD+
HV	15	rhd-	33,7	0	0				RHD-
HM	16	rhd-	33,24	0	0				RHD-
HC	20	rhd-	34	0	0				RHD-
HL	12	D silen.	33,76	31,72	36,99	32,59?	34,11	35,48	D silencieux
VC	34	rhd+	34,31	35,76	42,18				RHD+
VM	28	rhd+	33,84	37,74	42,74	34,8	38,66	42,52	RHD+
SG	23	rhd-	34,75	0	0				RHD-
PS	14	rhd+	36,33	40,86	42,62	36	39,64	39,84	RHD+
VI	17	rhd-	34,56	0	0	35,2	0	0	RHD-
BF	17	rhd+	33,97	35,28	43,76	35,51	39,39	40,96	RHD+
AO	19	rhd-	33,61	0	0				RHD-

Sur nos 17 patientes, nous avons retrouvé 9 génotypes RhD positifs, 6 génotypes RhD négatifs, 1 gène D silencieux et un résultat ininterprétable (RhD- R'R-).

Ces résultats étaient concordants avec ceux de l'équipe du Dr Brossard, ceci nous rassurant quant à la qualité de nos extractions et de la non-contamination de nos qPCR sur les deux appareils.

V. LES PROTOCOLES

V. 1. Le STIC multicentrique

Les Recommandations de Pratique Clinique sur l'Immunoprophylaxie Rhésus de décembre 2005 proposent d'appliquer le génotypage fœtal rhésus D non invasif à toutes les femmes enceintes Rhésus négatif (15% des femmes enceintes en France) de sorte à éviter l'administration des immunoglobulines Rh aux 40% d'entre-elles enceintes d'enfant Rhésus négatif. Ce projet prospectif et multicentrique se propose de franchir une étape vers cet objectif :

- en permettant à plusieurs laboratoires en France, familiers du diagnostic anténatal, d'appliquer la méthode validée de détermination non invasive du génotype fœtal Rhésus D, systématiquement à une population de 500 à 1000 femmes enceintes Rhésus négatif par an et par site.
- en encourageant les améliorations de productivité et de qualité de la technique en particulier par l'automatisation de l'extraction de l'ADN plasmatique.
- en comparant les variantes technologiques de la méthode validée sur des plateformes différentes par les laboratoires experts.

Le kit « Free DNA Fetal Kit® RhD » servant au génotypage est commercialisé par l'Institut de Biotechnologies Jacques Boy (Reims) et a obtenu le marquage CE en juin 2007.

Pour l'étude, il est prévu d'évaluer :

- 1 - les conditions d'accès au test et les limites de faisabilité dans le cadre de réseaux périnataux existants

2 - le bilan qualité du test : robustesse, spécificité, sensibilité, fréquences des indéterminés et des variants géniques silencieux

3 - la prise en compte du résultat du test dans le suivi biologique et les indications potentielles de l'immunoprophylaxie Rhésus

4 - le coût du génotypage (prix de revient du test, coûts induits et évités...) incluant les aspects pré et post-analytiques

Au total, 3625 patientes par an pourraient bénéficier de l'analyse au sein des différents sites participants avec respectivement :

- Lille : 675 femmes
- Marseille : 900 femmes
- Nantes : 600 femmes
- Paris : 850 femmes
- Poissy : 600 femmes

V. 2. Notre protocole

En préliminaire de cette étude multicentrique, nous avons voulu évaluer au CHU de Nantes les conditions d'accès à ce test et sa faisabilité pour nos patientes, ainsi que les qualités de notre dépistage en évaluant la concordance entre les résultats des génotypes RhD fœtal obtenus sur sang maternel par PCR quantitative en temps réel et les résultats des phénotypes sérologiques RhD des nouveaux-nés.

V. 2. 1. Patientes et échantillons

Dans le cadre de cette étude préliminaire, vingt femmes enceintes Rh D négatif ont été prélevées en cours de grossesse.

Les patientes ont été informées du protocole lors d'une consultation au CHU de Nantes pour un autre motif : échographie de 12 SA, entretien du 4^{ème} mois, consultation mensuelle programmée, consultation aux urgences gynécologiques...En cas d'accord pour participer à l'étude, elles étaient alors vues en entretien d'une dizaine de minute avec un des investigateurs principaux de l'étude (le même investigateur a réalisé les 20 entretiens).

Les patientes étaient ensuite invitées à signer un consentement de participation, et le premier prélèvement était alors réalisé : deux tubes EDTA sous vide de 4.5 ml sont prélevés chez chaque patiente et sont adressés en moins de 24h au laboratoire de Biologie Moléculaire du CHU de Nantes.

L'échantillon est traité selon la technique décrite au chapitre 4 et le résultat nous est fourni en quelques jours.

La patiente, ainsi que la personne suivant la grossesse étaient ensuite informés soit par téléphone, soit directement du résultat du génotypage, ce dernier ne modifiant en rien la prise en charge de la grossesse.

En cas de génotype Rhésus D positif ou indéterminé, le fœtus est alors considéré comme RhD positif, et aucun autre prélèvement n'est nécessaire.

En cas de génotype Rhésus D négatif, un second prélèvement est alors réalisé environ 15 jours plus tard, afin de confirmer le premier résultat. Si le second prélèvement retrouve également un génotype Rhésus D négatif, le fœtus est considéré comme RhD négatif.

Si les deux prélèvements sont discordants, le fœtus est alors considéré comme RhD positif.

En cas de résultat ininterprétable, un nouveau prélèvement peut être réalisé.

La confirmation de notre génotypage sur sang maternel est réalisée par prélèvement de sang de cordon à la naissance et réalisation du groupe Rhésus fœtal du nouveau-né selon les recommandations.

V. 2. 2. Résultats

Le prélèvement a toujours été réalisé entre 12 SA et 26 SA et il s'agit toujours de grossesse monofoetale.

Un fœtus était considéré comme porteur du gène RhD lorsqu'une amplification concomitante des deux exons 7 et 10 était observée.

Au moment de l'impression de la thèse, seulement 17 patientes sur les 20 incluses ont accouché. Pour ces 17 grossesses unifœtales, le génotypage prédisait la présence de 12 fœtus Rh D positif et 5 fœtus Rh D négatif.

Ces patientes ont accouché respectivement de 12 nouveaux-nés antigène Rh D positif et 5 nouveaux-nés antigène Rh D négatif.

7 nouveaux-nés étaient de sexe féminin et 5 de sexe masculin.

Le terme moyen d'accouchement des femmes est de 39 SA.

Le poids moyen de naissance des nouveau-nés est de 3300 grammes.

Tableau 14 : Résultats de notre étude préliminaire

N°	Initiales	Terme prévu	Rh fœtal 1^{er} plvt	Rh fœtal 2nd plvt	Rh fœtal sur sang de cordon	Concordance
01	BN	01/04/2008	RhD +		RhD +	oui
02	BS	23/05/2008	RhD -	RhD -	RhD -	oui
03	GM	15/03/2008	RhD -	RhD -	RhD -	oui
04	BC	22/04/2008	RhD +		RhD +	oui
05	BK	09/03/2008	RhD -	RhD -	RhD -	oui
06	TN	19/03/2008	RhD +		RhD +	oui
07	BV	08/03/2008	RhD +		RhD +	oui
08	DC	25/03/2008	RhD +		RhD +	oui
09	LA	03/05/2008	RhD +		RhD +	oui
10	RM	28/03/2008	RhD +		RhD +	oui
11	LN	04/05/2008	RhD +		RhD +	oui
12	GV	25/04/2008	RhD +		RhD +	oui
13	TA	20/03/2008	RhD +		RhD +	oui
14	TS	04/06/2008	RhD +		?	?
15	CE	17/04/2008	RhD +		RhD +	oui
16	LA	30/05/2008	RhD +		?	?
17	DA	20/04/2008	RhD -	RhD -	RhD -	oui
18	MK	26/05/2008	RhD -	RhD -	RhD -	oui
19	BC	09/05/2008	RhD +		RhD +	oui
20	DM	16/06/2008	RhD +		?	?

A partir des résultats obtenus sur l'ensemble des amplifications, la sensibilité pour les exons 7 et 10 était de 100 %.

Aucun faux négatif, défini par l'absence d'amplification des deux exons, n'a été trouvé chez les enfants Rh D positif.

Toutes les mères dont les enfants étaient RhD positif (n = 12) avaient eu un génotypage sur leur plasma révélant la présence du gène RhD.

La spécificité de l'amplification des exons 7 et 10 est de 100 %. Aucune amplification n'a été observée chez les 5 mères dont l'enfant était Rh D négatif.

Nous obtenons donc une concordance de 100 % entre les résultats des génotypes RhD fœtal obtenus sur sang maternel et les résultats des phénotypes sérologiques RhD des nouveaux-nés.

VI. DISCUSSION

VI. 1. Généralités

Les Recommandations de Pratique Clinique (RPC) sur l'immunoprophylaxie Rhésus D de décembre 2005 proposent l'injection systématique d'immunoglobulines Rh anti-D (IgRh) à 28 semaines d'aménorrhée chez toutes les femmes enceintes Rhésus D négatif [72].

Ces recommandations proposent également l'utilisation systématique du génotypage fœtal Rhésus D non invasif chez les femmes enceintes Rhésus D négatif pour leur éviter, si leur fœtus est également Rhésus négatif, les injections d'immunoglobulines anti-D, qu'elles soient d'indication ciblée ou systématique.

En 2004, en France, 163 000 doses d'immunoglobulines anti-D ont été vendues, concernant environ 140 000 femmes Rhésus négatif (du fait qu'une patiente peut bénéficier de plusieurs injections) [15].

Environ un tiers des femmes RhD négatif étant enceintes d'enfants eux-mêmes RhD négatif, on peut aisément calculer que près de 45 000 injections d'immunoglobulines anti-D étaient inutiles. Par le génotypage du Rhésus fœtal dans le sang maternel, le nombre d'injections d'IgRh pourrait donc être diminué d'autant, sans diminuer l'efficacité de la prévention.

En France, plusieurs laboratoires spécialisés disposent d'une technique de génotypage fœtal sur sang maternel. Les éléments qui freinent encore son utilisation à large échelle sont l'absence de standardisation des techniques, l'absence de kit commercial pour la diffusion en dehors de ces centres spécialisés et encore l'absence de remboursement du test.

L'étude multicentrique qui doit débiter cette année (projet STIC pour « Soutien aux Techniques Innovantes et Coûteuses) consiste à évaluer la faisabilité médico-économique du génotypage RhD fœtal sur sang maternel.

L'objectif est de diminuer les injections d'immunoglobulines anti-D inutiles, de diminuer le nombre de RAI et d'améliorer la compliance des patientes, que la prophylaxie soit ciblée ou systématique.

Nous ne doutons point des bons résultats prévisibles de l'étude quant à la concordance des génotypes et des phénotypes des nouveaux-nés du fait de l'expérience et de la compétence des équipes impliquées dans le projet. De plus, les résultats préliminaires et les publications sur le sujet sont favorables.

Par contre, sur le plan économique, la faisabilité du test à toutes les patientes RhD négatif en début de grossesse reste à évaluer. Une équipe suisse a essayé de modéliser un tel projet [73] : les recommandations étant sensiblement les mêmes qu'en France, les mères Rhésus négatif bénéficient d'une première dose de 300 µg de Rhophylac® entre la 28^{ème} et la 30^{ème} semaine de grossesse. En cas de suspicion d'hémorragie fœto-maternelle, une administration prophylactique d'anti-D 200 µg est réalisée dans les 72 heures. Puis une dernière injection de 200 µg est réalisée en post-partum si le nouveau-né est Rhésus D positif.

Le quotient coût-bénéfice d'un diagnostic prénatal non invasif du statut Rhésus fœtal au niveau national se base sur le prix d'un flacon de Rhophylac® 300 µg à 166,50 Francs Suisses. En prenant le nombre de naissances en Suisse en 2005 (n = 74 811), avec 15 % environ de femmes enceintes Rhésus D négatif, deux injections (une en pré-partum, une en post-partum) sont nécessaires chez 60 % des femmes. Une seule injection est nécessaire en pré-partum chez les autres 40 %, car leur enfant sera lui aussi Rhésus D négatif à l'examen du groupe sanguin en post-partum.

Les coûts totaux se montent à 2 987 263 Francs Suisses par an avec les injections de Rhophylac® dans toute la Suisse.

Les coûts d'un diagnostic prénatal non invasif du statut Rhésus fœtal se montent à 15 Francs Suisse par examen (sans les charges salariales). Les coûts totaux du matériel nécessaire pour déterminer dans toute la Suisse le statut Rhésus D fœtal chez des femmes enceintes Rhésus négatif se montent à 168 315 Francs Suisse par an (sans les charges salariales). Les économies annuelles potentielles atteignent donc 2 818 948 Francs Suisse. De plus, du fait que cet examen puisse être fortement automatisé, les charges salariales peuvent être encore diminuées.

Cette modélisation n'est bien évidemment pas applicable en France, mais avec un flacon de Rhophylac® 200 µg à 61,57 €, un flacon de Rhophylac® 300 µg à 85,16 € et des recommandations semblables dans une population caucasienne avec les mêmes caractéristiques, la question d'une économie de santé potentielle se doit d'être posée.

Concernant nos résultats préliminaires, le pourcentage de 75 % de génotype fœtal RhD positif prévu (15 fœtus RhD positif prévu sur 20 patientes incluses) n'est pas tout à fait en rapport avec la probabilité de 61 % de porter un enfant Rh D positif pour une mère Rh D négatif, caucasienne, dont le groupe du géniteur est inconnu [74]. Cette surévaluation est probablement due au faible effectif de notre étude préliminaire (20 patientes), ne permettant pas de vraiment interpréter ce pourcentage.

Par contre, notre étude confirme la haute concordance entre les résultats obtenus sur plasma maternel par PCR quantitative en temps réel et ceux obtenus par prélèvement de sang au cordon chez le nouveau-né (concordance génotype RhD – phénotype de 100 %).

Ceci est important car le principal danger du génotypage RhD prénatal est de prédire un fœtus Rhésus D négatif alors qu'au final il est D positif [75], et ainsi de ne pas appliquer correctement les Recommandations pour la Pratique Clinique.

C'est le cas de certaines études dans lesquelles les auteurs décrivent une absence d'amplification de certains exons en qPCR, chez certaines patientes porteuses d'un fœtus Rhésus D positif. Ceci évoque la possibilité d'une sensibilité limite avec certains échantillons, probablement liée à une quantité trop faible ou même une absence d'ADN fœtal dans certains échantillons.

L'absence d'amplification peut dépendre aussi des amorces utilisées. Pour cette raison, il est réalisé une amplification concomitante d'au moins deux régions du gène RhD, en l'occurrence les exons 7 et 10 dans notre étude afin de détecter un maximum de variants du gène RhD et de limiter les erreurs dues au grand polymorphisme de ce gène. Certaines équipes utilisent même l'amplification multiplex de trois exons différents (exons 4 et 5, très spécifiques du gène RhD, mais pas du pseudogène RhD ψ , ni du gène RHCE ; et exon 10 le mieux conservé du gène RhD) afin d'augmenter encore leur sensibilité [76,77].

Le manque d'expression de l'antigène RhD est, en dehors d'une délétion complète du gène RhD, le résultat d'anomalies structurelles du gène dont certaines séquences restent amplifiables. La fréquence du pseudogène RhD ψ , non fonctionnel, dans la population RhD négatif est estimée à 66 % en Afrique du Sud, 19 % chez les noirs africains [42]. Chez les donneurs de sang d'Afrique du Sud de phénotype RhC positif, approximativement 40 % portent le gène variant RhD avec expression de l'antigène C [78].

Il est ainsi essentiel d'être informé de l'origine ethnique des patientes et d'utiliser plusieurs couples d'amorces et sondes afin d'éviter des discordances entre le phénotype et le génotype du fœtus.

VI. 2. Revue de la littérature

Le génotypage RhD prénatal présente, dans le cadre de notre étude, un risque majeur : prédire un fœtus Rhésus D négatif alors qu'à l'accouchement il est Rhésus D positif.

Le taux de faux-négatif doit donc être le plus bas possible, et la prévention de ces cas se fait par la réalisation du test après 12 SA (quantité d'ADN fœtal suffisante), l'inclusion de l'ADN traceur dans les échantillons de plasmas (ADN de maïs dans notre cas), et la répétition du test sur un deuxième, prélèvement maternel (ou liquide amniotique si l'indication se présente) lorsque le premier test est négatif.

Certaines équipes utilisent également des séquences témoins, comme SRY (Sex determining Region Y chromosome) mais ce marqueur reste limité à 50 % des grossesses ; ou des marqueurs comme des séquences « publiques » d'ADN, telle que RASSF1A, séquence hyper-méthylée dans le placenta, et hypo-méthylée dans les cellules sanguines fœtales, prouvant alors de l'origine fœtale de l'ADN [79].

L'autre objectif du test est bien sûr d'obtenir le moins de faux-positifs possibles. Leur présence est tout de même moins préjudiciable, car il s'agit de considérer un fœtus comme RhD positif alors que ce dernier est RhD négatif. La conséquence directe est une prévention systématique de l'allo-immunisation par immunoglobulines anti-D à 28 SA, et certains cas de prévention ciblée. L'administration de ces immunoglobulines peut poser de nos jours un problème éthique. En effet, un risque viral existe. Ce dernier demeure néanmoins extrêmement faible du fait des traitements utilisés.

La prévention de faux-positifs d'origine maternelle peut se faire par une PCR sur les globules rouges maternels, d'emblée, ou dans un deuxième temps, si l'amplification de l'ADN plasmatique est trop précoce.

La prévention de faux-positifs d'origine fœtale est plus difficile et nécessite de développer des PCR évitant d'amplifier certains pseudo-gènes, en particulier dans les populations africaines.

Dans la littérature, les concordances génotype RhD – phénotype sont excellentes, avec un taux global de 98 % (tableau 15).

Tableau 15 : Concordances génotype RhD – phénotype dans la littérature

EQUIPES	Nb de génotypages	Nb de cas concordants	% de cas concordants
Fass et al. (1998)	31	31	100 %
Lo et al. (1998)	57	55	96.5 %
Rouillac et al. (2004)	851	842	98.9 %
Gautier et al. (2004)	283	283	100 %
Zhou et al. (2005)	98	92	93.9 %
Brojer et al. (2005)	230	229	99.6 %
Van der Schoot et al. (2006)	1257	1249	99.4 %
Minon et al. (2008)	581	580	99.8 %
Finning et al. (2008)	1869	1788	95.7 %
TOTAL	5255	5149	98 %

VI. 3. Cas particulier des grossesses gémellaires

Dans les cas de grossesses gémellaires, la valeur prédictive du génotypage RhD peut également nous orienter dans le suivi à accorder aux mères RhD négatif. En cas de présence du gène RhD dans le sang maternel, une immunoprophylaxie anti-D semble indispensable, sans cependant nous préciser si les deux fœtus sont RhD positif ou uniquement un seul positif en cas de grossesse dizygote [80].

VI. 4. Perspectives

Les immunoglobulines polyclonales anti-RhD sont utilisées avec succès depuis plus de trente ans pour prévenir l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D. Cependant, la préparation de ces immunoglobulines anti-D pose au moins deux problèmes :

- L'approvisionnement en plasmas hyperimmuns anti-D n'est plus assuré en Europe depuis plusieurs années en raison de l'arrêt des protocoles d'immunisation de sujets volontaires sains Rhésus négatif. Les industriels sont donc obligés d'importer des plasmas en provenance d'Amérique du Nord.
- Des soucis d'ordre éthique liés à l'immunisation de sujets volontaires sains et rémunérés de fait.

Pour répondre à ces différentes limites et réserves, plusieurs équipes tentent de substituer les immunoglobulines polyclonales anti-D par des anticorps monoclonaux humains anti-D [81-83].

La préparation des anticorps monoclonaux humains recombinants anti-D est assez complexe et est résumée en annexe 4.

Actuellement, il est reconnu que quatre anticorps monoclonaux anti-D recombinants ont été évalués en clinique.

- Un anticorps développé en Russie, produit par une lignée lymphoblastoïde EBV, mais pratiquement aucune information n'est disponible sur cet anticorps et sur son utilisation thérapeutique.

- Une équipe britannique a sélectionné deux anticorps anti-D : l'anticorps BRAD-3 qui est une IgG3 et l'anticorps BRAD-5 qui est une IgG1. Les études cliniques réalisées avec ces anticorps ont permis de montrer qu'ils étaient capables d'induire une immunosuppression chez des sujets Rhésus négatif ayant reçu des hématies Rhésus positif. En revanche, la clairance des hématies observée avec ces anticorps est moins rapide qu'avec des Ig polyclonales anti-D de référence [82-83].

- L'Institut d'Immunologie de Berne a également sélectionné un anti-D recombinant MonoRh0. Cet anticorps testé chez le volontaire Rhésus négatif a montré une efficacité de prévention d'immunisation, bien que la clairance d'hématies Rhésus positif injectées chez des sujets Rhésus négatif soit beaucoup plus faible qu'avec l'anticorps polyclonal Rhophylac® testé comme contrôle positif [83].

La faible efficacité des deux anticorps cités ci-dessus à induire la clairance d'hématies Rhésus positif pourrait être une limite à une utilisation à grande échelle pour la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle. En effet, les Ig polyclonales anti-D sont capables d'induire l'élimination de plusieurs millilitres d'hématies Rhésus positif en moins de

72 heures après leur injection par voie IV. Toutefois, la relation entre clairance et immunosuppression est encore mal connue.

En France, le LFB (Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies) a sélectionné un anticorps monoclonal humain recombinant sur la base de son activité fonctionnelle. Cet anticorps humain recombinant présente une forte liaison aux récepteurs Fc γ RIII (CD16) des IgG et est capable d'induire une activation des cellules effectrices NK avec comme conséquence la lyse des hématies Rhésus positif.

Une étude de la spécificité de cet anticorps monoclonal humain anti-D a été réalisée en comparaison avec un réactif de groupage de référence sur plus de 100 000 prélèvements de donneurs de sang bénévoles. Les résultats montrent une reconnaissance des hématies Rhésus positif similaire au réactif de groupage anti-D à l'exception de quelques hématies de catégorie Rhésus D partiel, faiblement représentées dans la population étudiée.

Une première étude clinique réalisée chez des sujets volontaires Rhésus positif a montré que la clairance d'hématies Rhésus positif induite par l'anticorps monoclonal anti-D LFB est au moins aussi rapide et complète que celle obtenue avec l'Ig polyclonale anti-D Rhophylac® testée en parallèle et comme contrôle positif.

Une étude clinique chez le sujet volontaire Rhésus négatif est en cours de préparation afin d'étudier les capacités de clairance et d'immunosuppression de cet anticorps.

Ainsi, une nouvelle génération d'anticorps monoclonaux humains anti-D a été mise au point et les résultats cliniques obtenus permettent d'envisager qu'il prendront bientôt place à côté des immunoglobulines polyclonales dans l'immunoprophylaxie Rhésus de la femme enceinte. On ne pourra cependant juger de cette place qu'après une évaluation à grande

échelle de ces nouveaux produits (efficacité comparée, résistances éventuelles...) sur le long terme.

VI. 5. Autres applications du génotypage

Les nombreuses études menées depuis la découverte de la présence d'ADN fœtal dans le sang maternel ont permis la mise en place de tests diagnostiques dont les premiers ont été le sexage fœtal et le génotypage Rhésus.

Le développement d'autres applications potentielles en diagnostic prénatal non invasif par analyse du matériel biologique fœtal circulant dans le sang maternel a fait l'objet de nombreuses études. Il existe actuellement deux grands axes de recherche :

- le diagnostic de maladies génétiques par détection de la mutation
- le dosage des concentrations en matériel fœtal en tant que marqueur de risque d'atteinte d'une maladie

VI. 5. 1. Le sexage fœtal

Le sexe fœtal peut être déterminé de manière non invasive et fiable par échographie fœtale. Toutefois cette détermination n'est généralement effectuée qu'à partir du deuxième trimestre de la grossesse puisque l'échographie n'est pas encore suffisamment fiable au premier trimestre malgré les progrès récents [84-85]. Or, le diagnostic prénatal de maladies génétiques liées au chromosome X (hémophilie, myopathie de Duchenne, hyperplasie congénitale des surrénales...) nécessite une connaissance précoce du sexe fœtal.

La biopsie de villosités choriales était jusqu'à présent la seule technique permettant de déterminer précocement, à partir de la 10^{ème} semaine d'aménorrhée, le sexe du fœtus par

analyse chromosomique et d'entreprendre une analyse de génétique moléculaire en cas de fœtus mâle. Les inconvénients liés à cette procédure invasive (taux de fausse couche induit, échec de prélèvement...) sont dommageables en cas de fœtus de sexe féminin qui ne sera pas atteint de la maladie. La détermination non invasive et précoce du sexe fœtal a donc un intérêt évident dans cette prise en charge.

Plusieurs études ont montré qu'il était possible de connaître le sexe fœtal par la mise en évidence dans le sérum maternel de séquences géniques spécifiques du chromosome Y. La séquence cible la plus utilisée est le gène du déterminisme du sexe (Sex determining Region Y chromosome ou SRY).

Ces dernières années, plusieurs séries ciblées sur le premier trimestre de la grossesse ont été publiées et ont conclu à la possibilité de déterminer le sexe fœtal avec une grande fiabilité (tableau 16).

Tableau 16 : Etudes rapportant la sensibilité et la spécificité des techniques de sexage à partir d'ADN foetal libre extrait du plasma maternel

Auteurs	Nombre de cas	Age gestationnel (Semaines)	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Lo et al. (1997)	43	12-40	80	100
Smid et al. (1999)	16	7-32	100	91
Zhong et al. (2000)	9	16	100	100
Honda et al. (2001)	61	10-17	87	100
Al-Yamata et al. (2001)	80	7-40	96	88
Lo et al. (1998)	50	11-17	100	100
Costa et al. (2001)	121	8-14	100	100
Rijnders et al. (2001)	45	8-17	96	100
Sekizawa et al. (2001)	302	7-16	97	100
Hromadnikova et al. (2002)	37	15-22	92	100
Rijnders et al. (2003)	13	5-10	100	100
Guibert et al. (2003)	22	4-9	100	100

Dès lors, une nouvelle stratégie de prise en charge du diagnostic prénatal des maladies liées au chromosome X peut être définie. Cette stratégie repose sur la détermination non invasive et précoce (entre 10 et 12 SA) du sexe foetal par analyse de l'ADN foetal du sérum maternel. Si le foetus est de sexe féminin, seule une surveillance échographique est réalisée et une biopsie de villosités choriales n'est proposée qu'aux seuls foetus mâles à risque d'être atteints. Cette nouvelle stratégie est maintenant adoptée par un très grand nombre de centres de génétique [86].

Enfin, la possibilité de déterminer le sexe du fœtus très précocement va permettre de simplifier la prise en charge d'autres pathologies fœtales telles que l'hyperplasie congénitale des surrénales [87,88].

VI. 5. 1. Les autres applications potentielles

VI. 5. 1. 1. Par analyse génétique du matériel fœtal

L'ADN peut idéalement permettre le diagnostic prénatal non invasif de toutes les maladies génétiques par détection PCR de la mutation. Cependant, la mise au point de méthodes applicables en clinique nécessite de développer des méthodes fiables et sexe-indépendante. De nombreuses études ont été ou sont en cours pour la mise au point de tels diagnostics et diverses maladies ont d'ores et déjà été analysées (tableau 16).

Tableau 16 : Maladies génétiques ayant fait l'objet d'études pour le développement d'un diagnostic prénatal non invasif par analyse du matériel génétique fœtal circulant dans le sang maternel

Maladie	Observations	Auteurs
Dystrophie myotonique de Steinert	- Diagnostic sur l'ADN fœtal circulant par détection de la mutation si héritée du père	- Ammicucci et al. (2000)
Achondroplasie	- Diagnostic d'un cas d'achondroplasie par analyse PCR de la mutation. N'est applicable qu'à la détection de mutations d'origine paternelle - ADN fœtal enrichi par séparation de taille. Permet une analyse plus précise de l'ADN fœtal	- Saito et al. (2000) - Li et al (2004)
Béta-thalassémie	- Analyse par PCR du codon muté. Nécessite un couple informatif - Enrichissement préalable de l'ADN fœtal par séparation de taille. Analyse par PCR théoriquement possible même si le couple n'est pas informatif.	- Chiu et al. (2002) - Li et al. (2005)
Hyperplasie congénitale des surrénales	- Détermination du sexe fœtal. Limitation des traitements aux fœtus féminins. - Diagnostic par PCR par détection de la mutation héritée du père.	- Rijnders et al. (2001) - Chiu et al. (2002)
Mucoviscidose	- Analyse PCR de la mutation héritée du père. Diagnostic réussi d'un cas à 15 SA.	- Gonzalez Gonzalez et al. (2002)

Pour le moment, une des limitations majeures dans le diagnostic des maladies génétiques héréditaires est le manque de différenciation entre l'ADN maternel et l'ADN fœtal, ne permettant ainsi que le développement de diagnostics concernant les maladies à transmission dominante héritée du père.

VI. 5. 1. 2. Par dosage dans le sang : le matériel génétique fœtal comme marqueur de risque

Certaines maladies ne peuvent être diagnostiquées par analyse PCR : soit parce que la mutation n'a pas encore été identifiée, soit parce que l'origine de la maladie est inconnue, ou bien parce que la maladie est causée non pas par un défaut au niveau du gène, mais par une aberration chromosomique.

Pour certaines de ces maladies, des équipes ont observé une variation dans les concentrations en ADN libre fœtal et/ou cellules fœtales circulantes dans le sang maternel. L'utilisation potentielle de ces variations en tant que marqueur de maladies, en association avec d'autres marqueurs existants (exemple de la trisomie 21 et du triple test) ou en association avec des facteurs de risque (exemple de la pré-éclampsie) a alors été étudiée (tableau 17).

Tableau 17: Maladies ayant fait l'objet d'études pour le développement d'un marqueur de risque par analyse du matériel génétique fœtal circulant dans le sang maternel

Maladie	Observations	Auteurs
Trisomie 21	- Augmentation de la concentration en ADN fœtal libre (x 2-3) dans le sang maternel. Utilisation potentielle comme marqueur associé au triple test.	- Lo et al. (1999) ; Zhong et al. (2000) ; Farina et al. (2003)
Trisomie 13 et 18	- Augmentation de la concentration en ADN fœtal libre dans les cas de trisomie 13, mais pas de trisomie 18.	- Wtaganara et al. (2003)
Pré-éclampsie et éclampsie	- Augmentation de la concentration en ADN libre circulant (x 25) dans le sang maternel. Utilisation potentielle de cette variation comme marqueur. - Augmentation de la concentration en cellules fœtales circulant dans le sang maternel. Utilisation potentielle de cette variation comme marqueur. - Augmentation de la concentration en ADN fœtal libre en 2 étapes.	- Lo et al. (1999) - Al-Mufti et al (2000) ; Holzgreve et al. (2001) - Levine et al. (2004)
Vomissements gravidiques incoercibles (Hyperemesis gravidarum)	- Augmentation de la concentration en ADN fœtal circulant dans le sang maternel. Existence d'une corrélation avec la gravité de l'hyperemesis gravidarum.	Sekizawa et al. (2001) ; Sugito et al. (2003)
Polyhydramnios idiopathique	- Augmentation de la concentration en érythrocytes (x 45) et en ADN fœtal (x2) circulant dans le sang maternel.	- Zhong et al. (2000)
Retard de croissance intra-utérin	- Augmentation de la concentration en cellules fœtales circulant dans le sang maternel, mais pas en ADN libre fœtal.	- Sekizawa et al. (2003)
Placenta praevia et placenta accreta	- Augmentation de la concentration en ADN fœtal circulant dans le sang maternel. Utilisation potentielle comme marqueur associé à d'autres facteurs de risque.	- Sekizawa et al.(2002)

VII. CONCLUSION

La mise en place préliminaire de cette nouvelle technique non invasive de diagnostic prénatal semble tout à fait réalisable au sein du CHU de Nantes, et du fait de ces résultats très encourageants, pourrait modifier radicalement à moyen terme notre prise en charge des patientes Rh-D négatif.

Toute patiente enceinte Rh-D négatif pourrait être prélevée dès 12 SA, en combinant cette prise de sang à un bilan biologique du suivi de la grossesse, ou au bilan de dépistage de la trisomie 21 avec le risque intégré associant clarté nucale et marqueurs du premier trimestre.

En cas de génotype fœtal RhD négatif, le suivi de grossesse serait allégé et identique aux patientes RhD positif.

En cas de fœtus RhD positif, le suivi obstétrical serait identique à celui pratiqué de nos jours selon les Recommandations pour la Pratique, clinique de 2005 (justifiant alors l'utilisation des gamma-globulines anti-D en prévention ciblée ou systématique).

La réalisation du génotypage Rhésus D fœtal sur sang maternel suppose néanmoins une bonne connaissance du système Rhésus, phénotypique et génotypique, et une maîtrise de la PCR quantitative en temps réel, tant dans les conditions de sa réalisation que dans le choix des amorces et sondes pour le système étudié.

La découverte de la présence d'ADN fœtal libre dans le sang maternel il y a maintenant 10 ans est une avancée biotechnologique majeure, ouvrant de nombreuses perspectives en terme de diagnostic prénatal, et pourquoi pas un jour à de la thérapie génique ante-natale...

ANNEXES

Annexe 1 : Test de Kleihauer

Principe du test

Ce test permet de rechercher et de quantifier les hématies fœtales dans le sang maternel.

Le principe du test de Kleihauer repose sur l'insolubilité en milieu acide de l'hémoglobine fœtale (Hb F) et ce, contrairement à ce qui est observé pour l'hémoglobine adulte (Hb A) qui elle, est soluble en milieu acide. La réalisation de ce test est rapide et ne demande que 20 à 30 minutes de manipulation.

Le test de Kleihauer est réalisé à partir d'un échantillon de sang total prélevé sur tube avec anticoagulant (EDTA ou citaté) et ce, au plus tôt une heure après l'accouchement. Les frottis sanguins, après avoir été soigneusement séchés et fixés à l'alcool, sont immergés dans une solution tampon acide (à préparer ou commercialisée prête à l'emploi) avec un pH entre 3,2 et 3,4. Ceci permet de dissoudre l'hémoglobine adulte alors que l'hémoglobine fœtale, résistante aux acides, reste à l'intérieur des cellules. Un contre-colorant, l'éosine, est utilisé afin de pouvoir plus facilement mettre en évidence les hématies fœtales.

La lecture se fait au microscope optique en balayant l'ensemble de la surface de la lame : les hématies fœtales apparaissent en rouge-rose foncé alors que les hématies maternelles sont décolorées avec un centre légèrement foncé (« fantômes d'hématies »). Les hématies fœtales sont alors comptées, puis leur nombre rapporté à 10 000 hématies maternelles : une hématie fœtale pour 10 000 hématies maternelles correspond au passage de 0,25 ml d'hématies fœtales, soit 0,5 ml de sang total.

En pratique, on peut utiliser la formule suivante :

$$V \text{ (ml)} = 2\,500 \times n / 10\,000$$

V = Volume d'hématies fœtales dans la circulation maternelle

N = nombre d'hématies fœtales

Intérêt du test

En mettant en évidence la présence d'hématies fœtales dans le sang maternel, le test de Kleihauer permet de confirmer le passage du sang fœtal dans la circulation maternelle. La présence de cellules fœtales dans le sang de la mère peut être objectivée par ce test dès la 10 ou 11^{ème} semaine de grossesse.

Ce test permet également de quantifier le nombre d'hématies fœtales afin d'adapter la dose supplémentaire d'immunoglobuline humaine anti-D à injecter chez les femmes RhD négatif.

Si l'hémorragie fœto-maternelle est importante (test de Kleihauer > 4 hématies fœtales / 10 000 hématies maternelle), des doses complémentaires d'immunoglobuline anti-D (à raison de 20 µg / 100 UI ml d'hématies fœtales) doivent être administrées.

Une RAI de contrôle 6 mois plus tard est recommandée : elle permet de rechercher l'apparition éventuelle d'anticorps anti-érythrocytaires.

Annexe 2 : Nomenclature des groupes sanguins

Pour l'appellation du phénotype, le symbole du système de groupe sanguin est suivi par deux points, et les nombres représentant les spécificités sont séparés par des virgules.

Un résultat positif n'est pas indiqué, un résultat négatif est indiqué en faisant précéder le nombre du signe « moins » (-). Il n'y a pas d'espace entre chaque nombre (tableau A).

Tableau A : Correspondance des nomenclatures

ANTIGENES DU SYSTEME RHESUS	
D	RH1
C	RH2
E	RH3
c	RH4
e	RH5

Par exemple, le phénotype « Rh D+C+E-c+e+ » s'écrit « RH : 1,2,-3,4,5 ».

Pour les anticorps, il faut inclure le mot « anti », suivi d'un tiret, suivi du symbole alphabétique du système et du numéro de l'antigène, sans espace entre chaque signe.

Par exemple, l'anticorps anti-E s'écrit « anti-RH3 ».

Pour les gènes et haplotypes, les caractères sont en italique.

Annexe 3 : Le test de Coombs indirect, et le dosage pondéral des anticorps

Le titre en Coombs indirect ou titrage par technique indirecte à l'antiglobuline consiste à mettre en présence des dilutions en progression géométrique du sérum à titrer et des hématies à la température de 37°C et à force ionique physiologique.

Les hématies sont ensuite lavées et enfin centrifugées dans une solution d'anti-IgG humaine (antiglobuline). Après resuspension des hématies, on observe si celles-ci sont agglutinées.

Le titre correspond alors à la plus forte dilution de sérum capable d'entraîner une agglutination. Le titre d'un l'anticorps dépend de la concentration de l'anticorps et de son affinité physiologique pour l'antigène.

Cet examen qui doit être pratiqué dès la 12^{ème} SA dépend de nombreux paramètres comme les concentrations en anticorps et en antigènes, les réactifs et la méthode de lecture et surtout la constante d'affinité de l'anticorps. Il est peu reproductible d'un laboratoire à un autre, c'est pourquoi l'évolution du titre doit être estimée dans des conditions très rigoureuses, par rapport à un standard anti-RhD de titre et concentration connus, en parallèle avec l'échantillon de sang maternel précédent.

Le dosage pondéral permet de déterminer la concentration en anticorps anti-RhD (en mg/ml) de l'immunoglobuline anti-D.

La méthode la plus utilisée est celle du dosage comparatif des complexes immuns, en faisant intervenir une gamme-étalon de concentration connue en anticorps. Les résultats sont donnés en deux temps : le premier temps T1 , l'utilisation des hématies faiblement traitées par une solution de broméline introduite dans le circuit d'agglutination permet d'obtenir la

destruction des anticorps IgG3 anti-Rhd ; le second temps T2 utilise des hématies fortement bromélinées.

Le taux nécessitant une surveillance plus stricte est en moyenne de 1 µg soit 250 unités CHP (Centre d'Hémiobiologie Périnatale) en T1 et T2 pour l'allo-immunisation anti-D. Il est réalisé dès la 12^{ème} SA afin de permettre une approche de la concentration réelle en IgG anti-RhD dans le sérum maternel.

Il s'agit d'une technique d'agglutination automatisée et donc reproductible, où la constant d'affinité intervient peu. La fréquence des recherches est fonction du taux initial et à intervalle maximal de 1 à 4 semaines.

Annexe 4 : Préparation des anticorps monoclonaux humains recombinants anti-D

Elle peut se résumer en deux étapes :

L'objectif de la première étape est de sélectionner des lymphocytes B producteurs d'anticorps humains anti-D. A partir de prélèvements collectés chez des sujets Rhésus négatif immunisés avec des hématies Rhésus positif, les lymphocytes B sont soit immortalisés avec l'EBV, soit directement fusionnés avec des cellules de myélomes. Les clones producteurs d'anti-D sont sélectionnés sur la base de la spécificité et de l'activité fonctionnelle des anticorps sécrétés. Les clones retenus sont congelés dans l'azote liquide.

La deuxième étape permet d'obtenir des anticorps humains recombinants. Le matériel génétique spécifique codant pour les chaînes H et L d'un anticorps anti-D humain est isolé des clones de lymphocytes B sélectionnés et est ensuite inséré dans un vecteur d'expression contenant les éléments de régulation nécessaires à la sécrétion d'anticorps. Ce vecteur est utilisé pour transfecter différentes lignées cellulaires pour la production d'anticorps monoclonaux humains recombinants anti-D.

Lorsqu'une lignée cellulaire a été sélectionnée pour ses capacités à produire de façon stable un anti-D recombinant, les conditions de production en milieu sans sérum et en bioréacteur sont définies. Des banques cellulaires sont préparées pour assurer une production toujours homogène d'un médicament. Afin de permettre l'obtention d'un anticorps avec un degré de pureté de l'ordre de 99,9 %, un procédé de purification est mis au point qui fait appel à plusieurs étapes de chromatographie incluant des étapes d'inactivation et d'élimination virales.

REFERENCES

- 1- Parnet-Mathieu F, Gaillard G. Immunisation sanguine foeto-maternelle : dépistage, prévention. Rev Prat 1996;46:629-36.
- 2- Bowman JM. Haemolytic disease of the newborn. In : Bowman JM, ed. Baillière's clinical Immunology and allergy. London, Baillière Tindall, 1987:391-425.
- 3- Diamond L, Blackfan D, Baty J. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus neonatorum and anemia in the newborn. J Pediatr 1932;1:269-309.
- 4- Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. Proc Soc Exp Biol Med. 1940;43:223.
- 5- Liley AW. Liquor amnii analysis in the management of the pregnancy complicated by rhesus sensitization. Am J Obstet Gynecol 1961;82:1359-70.
- 6- Liley AW. Intrauterine transfusion of foetus in haemolytic disease. Br Med J. 1963;2:1107-1109.
- 7- Rodeck CH, Kemp JR, Holman CA et al. Direct intravascular fetal blood transfusion by fetoscopy in severe Rhesus isoimmunisation. Lancet. 1981;1:625-7.
- 8- D'Ercole C, Robert V. Incompatibilités érythrocytaires fœto-maternelles. Gérard Sébahouhn. Hématologie clinique et biologique. Arnette, Paris 2005..
- 9- Mannessier L, Alie-Daram S, Roubinet F et al. Prévention de la maladie hémolytique du nouveau-né : il faut agir ! J Gynecol Obstet Biol Reprod. 2000;29:441-4.
- 10- D'Ercole C, Boubli L, Chagnon C et al. Fetomaternal hemorrhage: diagnostic problems. Three case reports. Fetal Diagn Ther. 1995;10:48-51.
- 11- Cortey A, Brossard Y, Beliard R et al. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D fœto-maternelle. Perspectives. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 2006;35:1S119-1S122.

12- Immunologie, Révillard 4ème édition, p204.

13- Ratzimbazafy V, Alba J, Cohen J. L'allo-immunisation foeto-maternelle anti-D. Gyn Obs 2002;450:1-6.

14- INSEE. INSEE Première n°118 – Janvier 2007

15- Branger B, Winer N. Epidémiologie de l'allo-immunisation anti-D pendant la grossesse. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 2006;35:1S87-1S92.

16- Parant O. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D foeto-maternelle. Comparaison de l'efficacité des différentes formes de prévention de l'allo-immunisation anti-D au cours de la grossesse : prévention ciblée limitée aux situations à risque ou associée à une prévention systématique au 3^e trimestre. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 2006;35:1S93-1S103.

17- Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D foeto-maternelle. Texte des recommandations. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 2006;35:1S131-1S135.

18- Décret n°92-143 du 14 février 1992, J.O. du 18 février 1992 relatif aux examens obligatoires prénuptial, pré et post-natal. <http://admi.net/jo/19920216/SANP9102747D.html>

19- Poissonnier MH. Immunisation sanguine foeto-maternelle : dépistage, prévention. Rev Prat 2000;50:1029-34.

20- Mannessier L, Valat AS. Incompatibilités foeto-maternelles érythrocytaires non ABO et suivi immunohématologique des femmes enceintes. Cahier Pratique. Gazette de la Transfusion 2001;169.

21- Cortay A, Brossard Y. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D foeto-maternelle. Aspects pratiques. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 2006;35:1S123-1S130.

22- National Institute for Clinical Excellence. Technology appraisal guidance 41. Guidance on the use of routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative women. London : NICE, 2002.

- 23- Hohlfeld P, Wirthner D, Tissot JD. Maladie hémolytique périnatale – Prévention et prise en charge. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 1998;27:265-76.
- 24- Mari G, Deter RL, Carpenter RL et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. N Engl J Med 2000;342:9-14.
- 25- Mari G, Detti L, Oz U et al. Accurate prediction of fetal hemoglobin by Doppler ultrasonography. Obstet Gynecol. 2002;99:589-93.
- 26- Scheier M, Hernandez-Andrade E, Carmo A et al. Prediction of fetal anemia in rhesus disease by measurement of fetal middle cerebral artery peak systolic velocity. Ultrasound Obstet Gynecol. 2004;23:432-6.
- 27- Mari G. Middle cerebral artery peak systolic velocity: is it the standard of care for the diagnosis of fetal anemia? J Ultrasound Med. 2005;24:697-702.
- 28- Bullock R, Martin WL, Coomarasamy A et al. Prediction of fetal anemia in pregnancies with red-cell alloimmunization: comparison of middle cerebral artery peak systolic velocity and amniotic fluid OD450. Ultrasound Obstet Gynecol. 2005;25:331-4.
- 29- Oepkes D, Seaward PG, Vandenbussche Fp et al. ; DIAMOND Study Group. Doppler ultrasonography versus amniocentesis to predict fetal anemia. N Engl J Med. 2006 13;355:156-64.
- 30- Carbonne B, Castaigne-Meary V, Cynober E et al. Intérêt pratique du pic systolique de vélocité à l'artère cérébrale moyenne dans la prise en charge des anémies fœtales par allo-immunisation érythrocytaire. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 2008;37:163-169.
- 31- Bartha JL, Abdel-Fattah SA, Hunter A et al. Optimal interval between middle cerebral artery velocity measurements when monitoring pregnancies complicated by red cell alloimmunization. Fetal Diagn Ther. 2006;21:22-5.

- 32- Zimmerman R, Carpenter RJ Jr, Durig P, Mari G. Longitudinal measurement of peak systolic velocity in the fetal middle cerebral artery for monitoring pregnancies complicated by red cell alloimmunisation: a prospective multicentre trial with intention-to-treat. *BJOG*. 2002;109:746-52.
- 33- Mari G, Zimmermann R, Moise KJ Jr, Deter RL. Correlation between middle cerebral artery peak systolic velocity and fetal hemoglobin after 2 previous intrauterine transfusions. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193:1117-20.
- 34- Bennett PR, Le Van Kim C, Colin Y et al. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *N Engl J Med* 1993;329:607-10.
- 35- Aubin J, Le Van Kim C, Mouro I et al. Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. *Br J Haematol* 1997;98:356-64.
- 36- Lo YMD, Hejelm NM, Fidier C et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998;339:1734-8.
- 37- Brossard Y. Cytopénies immunes néonatales. *Rev Prat* 2001;51:1571-76.
- 38- Watts DH, Luthy DA, Benedetti TJ et al. Intraperitoneal fetal transfusion under direct ultrasound guidance. *Obstet Gynecol* 1988;71:84-8.
- 39- Barss VA, Benacerraf BR, Frigoletto FD et al. Management of isoimmunized pregnancy by use of intravascular techniques. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:932-7.
- 40- Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C et al. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 1991;78:2747-52.
- 41- Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93:385-93.

- 42- Singleton BK, Green CA, Avent ND et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 2000;95:12-8.
- 43- Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 2000 15;95:3662-8.
- 44- Lo YM, Lo ES, Watson N et al. Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood* 1996;88:4390-5.
- 45- Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-7.
- 46- Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1969;1:1119-22.
- 47- Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn* 2002;22:609-15.
- 48- Vona G, Breoud C, Benachi A, et al. Enrichment, immunological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood. *Am J Pathol* 2002;160:51-8.
- 49- Daryani YP, Barker GH, Penna LK, Patton MA. Transcervical sampling as a means of detection of fetal cells during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:752-4.
- 50- Stroun M, Anker P, Maurice P et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989;46:318-22.
- 51- Smid M, Lagona F, de Benassuti L et al. Evaluation of different approaches for fetal DNA analysis from maternal plasma and nucleated blood cells. *Clin Chem* 1999;45:1570-2.

- 52- Houfflin-Debarge V, O'Donnell H, Overton T et al. High sensitivity of fetal DNA in plasma compared to serum and nucleated cells using unnested PCR in maternal blood. *Fetal Diagn Ther* 2000;15:102-7
- 53- Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts. *Mol Hum Reprod* 2002;8:864-70.
- 54- Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, et al. Quantitative analysis of foetal DNA in maternal plasma and serum: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768-75.
- 55- Ohashi Y, Miharuru N, Honda H et al. Correlation of fetal DNA and human chorionic gonadotropin concentrations in second-trimester maternal serum. *Clin Chem* 2002;48:386-8.
- 56- Flori E, Doray B, Gautier E, et al. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum likely originates from cyto- and syncytiotrophoblastic cells. *Hum Reprod* 2004;19:723-4.
- 57- Guibert J, Benachi A, Gréville AG et al. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real-time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18:1733-6.
- 58- Smid M, Lagona F, Papasergio N et al.. Influence of gestational age on fetal deoxyribonucleic acid retrieval in maternal peripheral blood. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:517-22.
- 59- Lo YMD, Zhang J, Leung TN et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218-24.
- 60- Invernizzi P, Biondi ML, Battezzati PM, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Hum Genet* 2002;110:587-91.
- 61- Sekizawa A, Kondo T, Iwasaki M et al. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2001;47:1856-8.

- 62- Costa JM, Benachi A, Gautier E et al. First trimester fetal sex determination in maternal serum using a real-time PCR. *Prenat Diagn* 2001;21:1070–4.
- 63- Finning KM, Martin PG, Soothill PW, et al. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new non-invasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002;42:1079–85.
- 64- Costa JM, Giovangrandi Y, Ernault P, et al. Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol* 2002;119:255–60.
- 65- Smid M, Galbiati S, Vassalo A, et al. No evidence of fetal DNA persistence in maternal plasma after pregnancy. *Hum Genet* 2003;112:617–8.
- 66- A. Benachi, J. Steffann, E. Gautier et al. Fetal DNA in maternal serum: does it persist after pregnancy? *Hum Genet* 2003;113:76-9.
- 67- Angert RM, Leshane ES, Lo YM, et al. Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 34 hours after collection: analysis of first and third-trimester samples. *Clin Chem* 2003;49:195–8.
- 68- Van Wijk IJ, de Hoon AC, Jurhawan R, et al. Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women. *Clin Chem* 2000;46:729–31.
- 69- Koide K, Sekizawa A, Iwasaki M et al. Fragmentation of cell-free fetal DNA in plasma and urine of pregnant women. *Prenat Diagn* 2005;25:604-7.
- 70- Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G et al. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin Chem*. 2000;46:1078-84.
- 71- Al-Yatama MK, Mustafa AS, Ali S et al. Detection of Y chromosome-specific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* 2001;21:399-402.

- 72- Collège des gynécologues et obstétriciens Français : Prévention de l'alloimmunisation Rhésus-D fœto-maternelle : recommandations pour la pratique clinique. J Gynecol Obstet Biol Reprod 2005;35:1S81-1S135.
- 73- Lapaire O, Hösli I, Tercanli S, Holzgreve W. Détermination du facteur Rhésus du fœtus dans le sang de la mère: diagnostic génétique non invasif avec conséquence pour la pratique? Forum Med Suisse 2008;8:17–18.
- 74- Wirthner D, Hohlfeld P, Tissot JD. Maladie hémolytique périnatale 1^{re} partie : physiopathologie. J Gynecol Obstet Biol Reprod 1998;27:135-43.
- 75- Van der Schoot E, Tax M, Rijnders R et al. Prenatal typing of the Rh and Kell blood group system Antigens: the edge of a watershed. Transf Med Rev 2003;17:31-44.
- 76- Minon JM, Gerard C, Senterre JM et al. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. Transfusion 2008;48:373-81.
- 77- Zhou I, Thorson J, Nugent C et al. Noninvasive prenatal genotyping by real-time polymerase chain reaction using plasma from D-negative pregnant women . Am J Obst Gynecol 2005;193:1966-71.
- 78- Tax M, van Der Schoot E, van Doorn R et al. RHC and RHc genotyping in different ethnic groups. Transfusion 2002;42:634-44.
- 79- Chan KC, Ding C, Gerovassili A et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. Clin Chem 2006;52:2211-8.
- 80- Minon JM, Schaaps JP, Retz MC et al. Utilisation en routine clinique du génotypage fœtal RhD sur plasma maternel : bilan de deux ans d'activité. J Gynecol Obstet Biol Reprod 2005;34:448-53.
- 81- Kumpel B. In vivo studies of monoclonal anti-D and the mechanism of immune suppression. Transfus Clin Biol 2002;9:9-14.

- 82- Kumpel BM, De Haas M, Koene HR et al. Clearance of red cells by monoclonal IgG3 anti-D in vivo is affected by the VF polymorphism of Fc gamma RIIa (CD16). Clin Exp Immunol 2003;132:81-6.
- 83- Miescher S, Spycher MO, Amstutz H et al. A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIIA genes. Blood 2004;103:4028-35.
- 84- Mielke G, Kiesel L, Backsch C et al. Fetal sex determination by high resolution in early pregnancy. Eur J Ultrasound 1998;7:109–14.
- 85- Efrat Z, Akinfenwa OO, Nicolaides KH. First-trimester determination of fetal gender by ultrasound. Ultrasound Obstet Gynecol 1999;13:305–7.
- 86- Costa JM, Benachi A, Gautier E. A new strategy of prenatal diagnosis in X-linked disorders. N Eng J Med 2002;346:1502.
- 87- Rijnders RJ, van der Schoot CE, Bossers B et al. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. Obstet Gynecol 2001; 98:374–8.
- 88- Bartha JL, Finning K, Soothill PW. Fetal sex determination from maternal blood at six weeks of gestation when at risk for 21-hydroxylase deficiency. Obstet Gynecol 2003;101:1135–6.

NOM : PAPE

Prénom : Olivier

Titre de la thèse : MISE EN PLACE PRELIMINAIRE D'UNE METHODE DE DETERMINATION NON INVASIVE DU RHESUS D FŒTAL PAR ANALYSE DE L'ADN FŒTAL CIRCULANT DANS LE SANG MATERNEL AU SEIN DU RESEAU SECURITE NAISSANCE DES PAYS DE LA LOIRE

RESUME

L'allo-immunisation fœto-maternelle Rhésus D est une pathologie rare, mais responsable d'une morbidité périnatale évitable (décès in utero, anasarque, anémies fœtales et néonatales sévères, prématurité et ictères néonataux graves.). Les recommandations nationales récentes incitent à la prophylaxie systématique au troisième trimestre de grossesse.

L'avènement récent du génotypage RhD fœtal sur plasma maternel permet de rechercher la présence du gène RhD du fœtus chez les mères Rhésus négatif, sans nécessité de prélèvement invasif. Cette reconnaissance prénatale non invasive permet une moindre prescription des immunoglobulines anti-D.

Nous avons testé un nouveau kit de génotypage sur 20 patientes enceintes Rhésus négatif du CHU de Nantes, et comparé nos résultats avec les phénotypes sérologiques RhD des nouveaux-nés prélevés au cordon.

Nos résultats préliminaires sont excellents avec une concordance de 100 %.

Dans le but d'évaluer ce kit, et de pouvoir recourir à l'échelon national au génotypage RhD, une étude multicentrique doit débuter prochainement. En cas de résultats favorables, une généralisation de ce génotypage en début de grossesse à toutes les patientes Rhésus négatif serait possible afin d'économiser à l'avenir de nombreuses injections inutiles d'immunoglobulines anti-D.

MOTS-CLES : génotypage RhD fœtal, plasma maternel