

CNRHp

PREVENTION RHESUS ET GENOTYPAGE *RHD* FOETAL

Agnès Mailloux, Yves Brossard



INCOMPATIBILITES RHD FOETO-MATERNELLES EN FRANCE

	INCIDENCE estimée (pour 1000 naissances)	MORTALITE estimée & MORBIDITE SEVERE
<u>1966</u>	5 à 6 ‰ ↓ Prévention Rh ciblée Baisse de l'indice de fécondité ↓	≥ 12% des cas ↓ Dépistage biologique Médecine néonatale Échographie fœtale Transfusions fœtales IV ↓
<u>2006</u>	≈ 0,8 ‰	≈ 4% des cas

LE RISQUE D'ALLO-IMMUNISATION FM ANTI-D

- **EST PERMANENT**, lié à la survenue d'hémorragies foetomaternelles spontanées ou induites par une série d'évènements ou manœuvres obstétricales
- **CROIT** avec l'âge gestationnel : accroissement de fréquence et des volumes de saignements
- **DEPEND** de variables immunogénétiques individuelles encore mal identifiées (sujets hauts répondeurs et sujets réfractaires).

L'ACTION IMMUNOSUPPRESSIVE DES IgG ANTI-D

- **Concerne seulement la phase primaire de l'immunisation** : n'évite pas la réactivation d'une immunisation anti-D déjà présente
- **Persiste seulement quelques semaines après administration IV ou IM** :
 - 6 semaines si 100 µg**
 - 9 semaines si 200 µg ,**
 - 12 semaines si 300 µg d'IgG anti-D**

L'EFFICACITE IMMUNO-SUPPRESSIVE DES IgG ANTI-D

- **Dépend du délai d'administration** après introduction de l'antigène D
 - Maximale dans les 72 heures
 - Nulle après 1 mois
- **Est fonction du ratio $\mu\text{g IgG anti-D/ml GR}$**
 - \leq à 5 $\mu\text{g/ml GR}$: efficacité minime ou nulle
 - 10 à 17.4 $\mu\text{g/ml GR}$: efficacité sub-optimale
 - \geq à 20 $\mu\text{g/ml GR}$: efficacité 100%

CAUSES PROBABLES DES IMMUNISATIONS ANTI-D

(Registre national 1997 - 2001, base 470 cas)

- Immunisation survenue durant la 1^{ère} grossesse (109/414 inf.) **26 %**
- Oubli probable de prévention Rh à la précédente grossesse (119/322 inf.) **37 %**
- Origine incertaine (retard de traitement, défaut posologie, immunisation 2^{ème} trimestre) **≈ 37 %**

Méta-analyse de Chilcott: Immuno-prophylaxie Rh du troisième trimestre

Groupe	Schéma prophylaxie	Sélection des patientes	Références (Nb de patientes)	Taux d'immunisation			
				groupe traité		groupe témoin	
				%	(IC 95%)	%	(IC 95%)
Groupe 1	100µg x 2 28 et 34 SA	Primigestes	Huchet (461) Mayne (1425) Tovey (1238) Mac Kenzie (3320)	0,30%	(0,22-0,38)	0,89%	(0,21-1,56)
Groupe 2	300µg à 28SA	Non sélectionnées	Trolle (346) Bowman (1806) Bowman 9295	0,34%	(0,28-0,40)	1,60%	(0,37-2,83)

CAPACITE IMMUNOSUPPRESSIVE APRES UNE INJECTION DE 300 µg D'IgRH A 28 SA

Terme	28 SA	31SA	34 SA	37 SA	40 SA
Quantité anti-D disponible	300 µg	150 µg	75 µg	38 µg	19 µg
Concentration sérique ng/ml	45	22	11	6	3
Capacité de neutralisation ml d'HF RHD+	15	7,5	3,8	2	1

FREQUENCE et VOLUME DES HFM à deux périodes du troisième trimestre

	HFM	28-30 SA	30-39 SA
Bowman (Winnipeg-Canada)	>2,5 mL	11/5680 (0,2%)	45/1895 (0,94%)
	>5 mL	3/5680 (0,05%)	13/1895 (0,27%)
Huchet (Paris-France)	>0,5 mL	17/957 (1,8%)	18/957 (1,9%)
	>5 ml	1/957 (0,1%)	5/957 (0,5%)

AMELIORATION DE L'IMMUNOPROPHYLAXIE RHESUS

Généraliser et améliorer les tests de quantification de l'hémorragie fœto-maternelle.

Définir des procédures visant à éliminer les oublis.

Substituer les immunoglobulines Rh plasmatiques par des anti-D recombinants.

**COUPLER LE GENOTYPAGE *RHD* FOETAL NON INVASIF
A L'IMMUNOPROPHYLAXIE IgRH ANTENATALE**

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL

LE COMPLEXE Rh

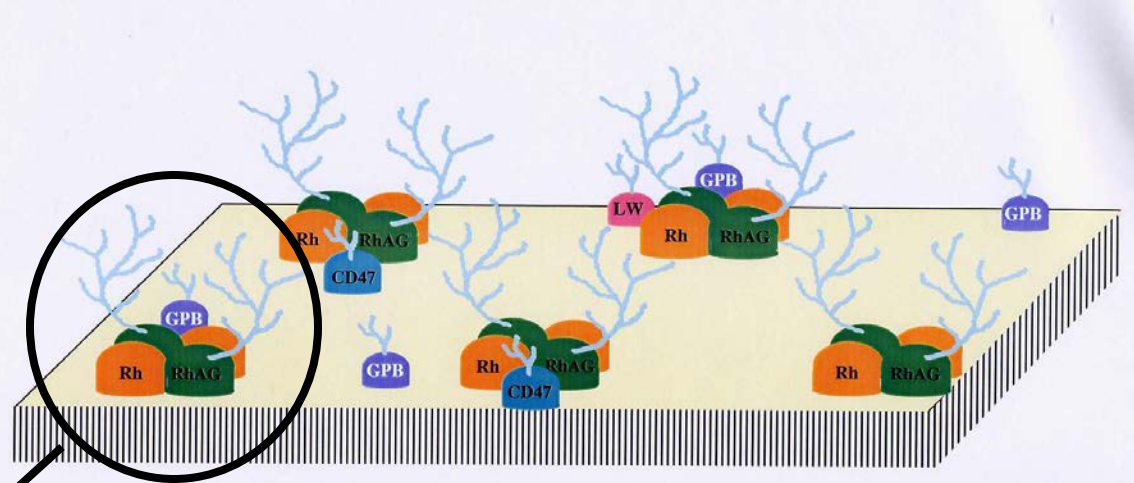
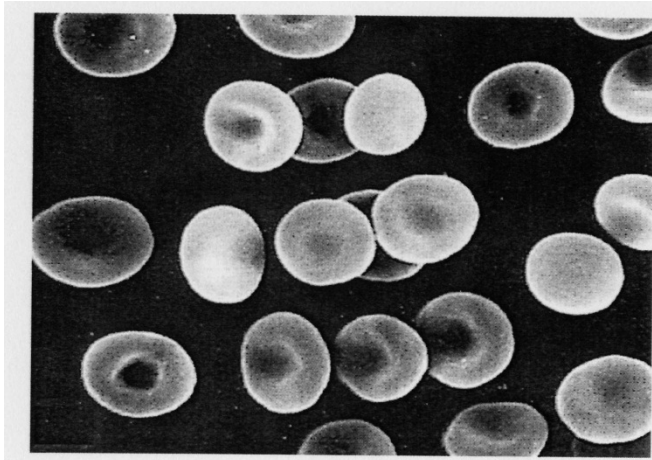


Figure 23 : Modèle du complexe Rh à la surface érythrocytaire. Les antigènes Rh forment dans la membrane du globule rouge un complexe dont le cœur serait un tétramère, composé de deux molécules Rh et de deux molécules RhAG, auquel les protéines accessoires CD47, LW et GPB sont attachées par des liaisons non covalentes.

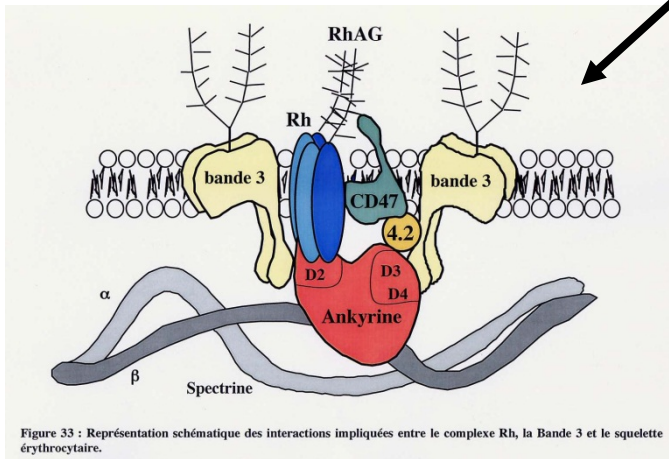


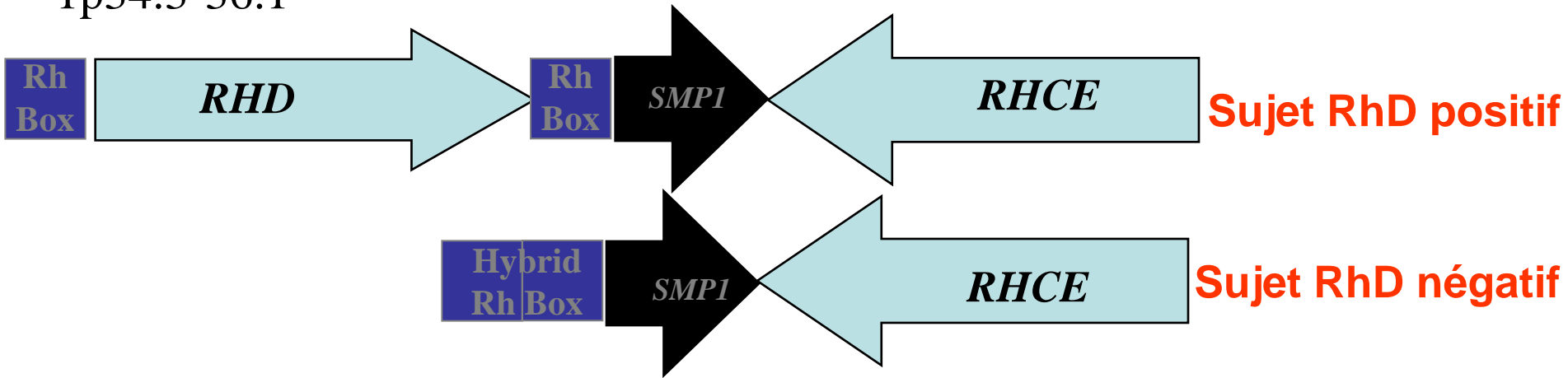
Figure 33 : Représentation schématique des interactions impliquées entre le complexe Rh, la Bande 3 et le squelette érythrocytaire.

Protéine RhD :
protéine transmembranaire du Globule Rouge
15000 sites par GR RhD+

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL

LE LOCUS *RH*

1p34.3-36.1



Isolement et séquençage du gène *RHD* par l'équipe française INSERM U76,
Y. Colin et al. Genetic Basis of the RhD-Positive and RhD-Negative Blood Group Polymorphism as determined by Southern Analysis . Blood 1991 ; 28 : 2747-52

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL NON INVASIF

ADN fœtal dans le plasma maternel

Suite à la découverte de la présence d'ADN fœtal dans le plasma des femmes enceintes (1 à 6 % d'ADN d'origine fœtale sous forme acellulaire)

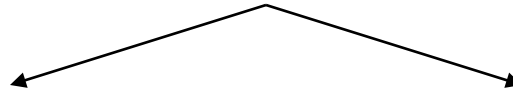
LO Y.M. et al. Am J Hum Genet, 1998, 62 : 768-775.

	Quantité de Génomes (copies par ml de plasma maternel)	Isolement	Persistance <i>in vivo</i>
ADN fœtal dans le plasma	25 (3 à 70) à 15 S.A. 290 (77 à 769) à terme	Rapide, simple	Demi-vie < 1 heure

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL NON INVASIF

PRINCIPE

Amplification par PCR de séquences du gène *RHD* sur un extrait d'ADN de plasma maternel



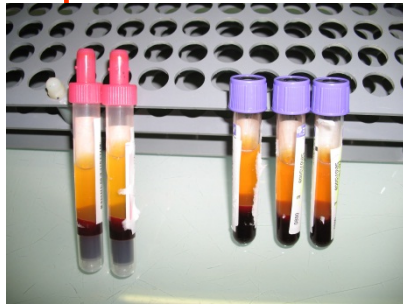
Amplification positive
FŒTUS RHESUS D POSITIF
Car : ABSENCE DE
SEQUENCE DU GENE *RHD*
CHEZ LA MERE

Amplification négative
FŒTUS RHESUS D NEGATIF
(*diagnostic par défaut*)
Ou concentration très faible
d'ADN fœtal
Ou amplification défectueuse

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL EN PRATIQUE

Sang maternel collecté sur EDTA (5 à 7 ml)

72h max entre prélèvement et réception au laboratoire



1

Centrifugation puis décantation plasma

Extraction de l'ADN plasmatique



2



3

Amplification par PCR
des séquences
spécifiques du gène
RHD

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL

SERIES DE LA LITTERATURE

Equipes	Génotypages réalisés	Concordance Génotype RhD - Phénotype
Fass et coll. (1998)	31	31
Lo et Coll. (1998)	57	55
Finning et Coll. (2004)	359	347
Rouillac et Coll. (2004)	851	842
Van der Schott et Coll. (2004)	1257	1249
Gautier et Coll. (2005)	283	283
		97,4%

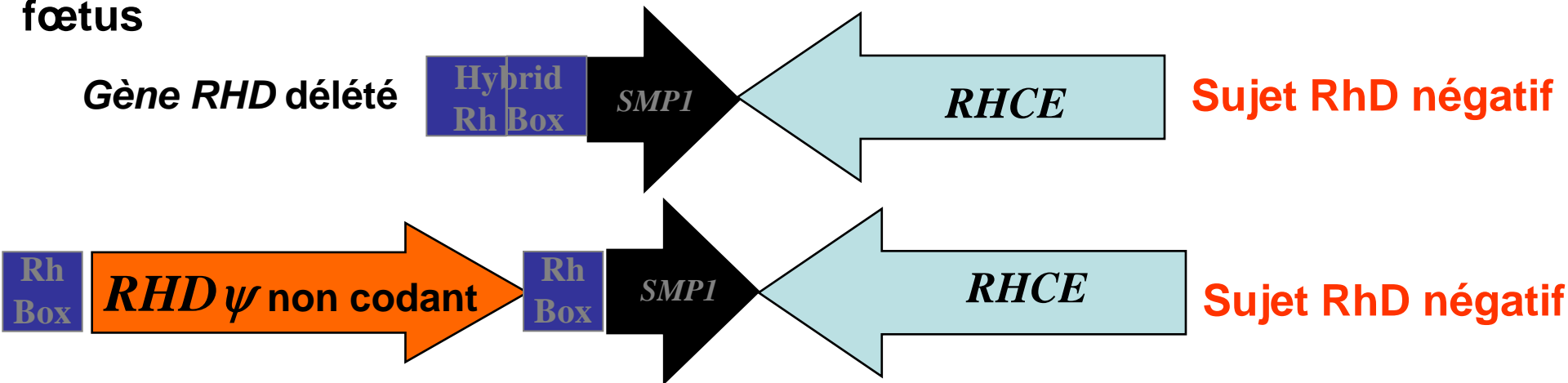
LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL

PROBLEMES

FAUX- POSITIFS

Spécificité du test en tant que facteur prédictif du phénotype n'est pas parfaite :

Présence de variants silencieux du gène *RHD* chez la mère et chez le fœtus



Fréquence : 1 % dans la population caucasienne

60 % dans la population Africaine RhD négatif

Solutions : - identifier ces gènes chez la mère

- appliquer des PCR *RHD* ne reconnaissant pas ces gènes

(exemple : PCR exon 5 non Dpsi)

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL

PROBLEMES

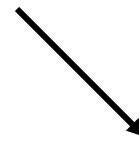
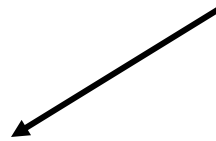
PREVENTION DES FAUX- NEGATIFS

- 1) Inclusion d'un ADN traceur déposé dans le plasma (témoin d'extraction de l'ADN et de non-inhibition de la PCR)
- 2) Recherches d'ADN fœtal « témoin ».
- 3) **REPETER LE TEST SUR UN SECOND PRELEVEMENT (>> à 12SA) POUR ECARTER LE RISQUE « LOURD » DE FAUX NEGATIF**
 - 1) Concentration plus élevée d'ADN fœtal
 - 2) Rattraper une erreur d'étiquetage
 - 3) Rattraper un croisement pré ou per-analytique des échantillons

LE GENOTYPAGE *RHD* FŒTAL

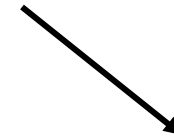
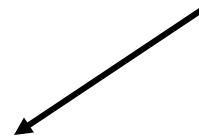
INTERET

FEMME ENCEINTE RHESUS D NEGATIF



**FEMME IMMUNISEE
PERMET DE LEGITIMER OU
NON UNE SURVEILLANCE
ANTENATALE**

FEMME NON IMMUNISEE



AMNIOCENTESE

SYSTEMATIQUE ?

**PERMET D'EVITER INJECTION
D'IgRHD SI LE GENOTYPE *RHD*
FOETAL EST NEGATIF**

**DEVRAIT PERMETTRE D'EVITER
INJECTION D'IgRHD SI LE
GENOTYPE *RHD* FOETAL EST
NEGATIF (40%)**

LE GENOTYPAGE RHD FŒTAL SYSTEMATIQUE ?

ETUDE GENIFERH EN COURS

Projet STIC 2009-2010 : Génotypage *RHD* foetal non invasif systématique à l'aide d'un kit marqué CE (Institut Jacques Boy)
Paris / Marseille / Lille / Poissy / Nantes

Objectif principal

Évaluer le rapport coût-efficacité (4000 patientes) de l'application systématique du génotypage *RHD* foetal non invasif

Objectifs secondaires

Faisabilité de la stratégie de génotypage *RHD* foetal systématique
Analyser les génotypes « indéterminés » et les discordances génotypes phénotypes
Aide à la décision publique de diffusion du génotypage *RHD* foetal non invasif au sein du réseau français de soin en obstétrique et du tarif de remboursement du test.