

Validation du Génotypage *RHD* Foetal Non Invasif chez les Femmes *RHD*-Négatif Porteuses de l'Allèle *RHDPsi*

N.R. DA SILVA(1), C. ROUILLAC-LE SCIELLOUR(2), M. MENU(3), Y. COLIN(4), C. LE VAN KIM(4), J.P. CARTRON(4), Y. BROSSARD(1), A. CORTEY(1), B. CARBONNE(1), A. MAILLOUX(1)

(1) Centre National de Référence en Hémostase Périnatale (CNRHP), AP-HP St Antoine, PARIS, FRANCE ; (2) Laboratoire Central CHI Poissy-Saint Germain en Laye, POISSY, FRANCE ; (3) Institut Jacques Boy, REIMS, FRANCE ; (4) Institut National de la Transfusion Sanguine, PARIS, FRANCE

Introduction

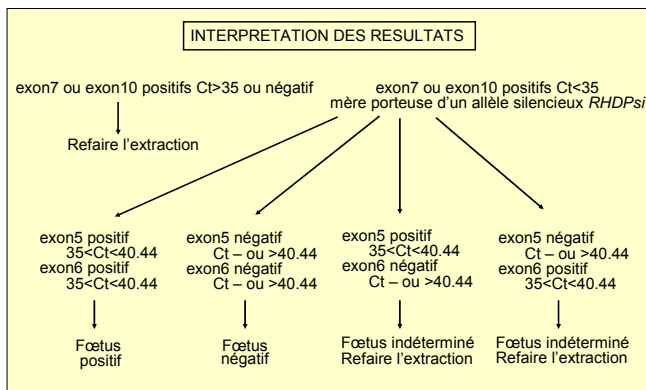
De nos jours, l'allo-immunisation anti-D reste la principale cause d'anémie hémolytique foetale. La détermination du génotype *RHD* foetal est actuellement possible à partir d'un simple prélèvement sanguin maternel. La technique repose sur l'amplification par *polymerase-chain-reaction* (PCR) du gène *RHD* contenu dans l'ADN foetal présent dans la circulation maternelle. Ce test permettrait de diminuer d'un tiers l'utilisation d'immunoglobulines chez les femmes RhD-négatif, pour la prévention de l'allo-immunisation anti-D. En cas d'allo-immunisation maternelle, il permet de n'appliquer une surveillance spécialisée qu'aux foetus de groupe RhD-positif. Cependant, cette analyse réalisée sur du plasma maternel avec le kit « Free DNA fetal kit RHD » (Rouillac-Le Sciellour et al., TCB, 2007 (14) : 572-7), n'est concluante que si les femmes RhD-négatif ne possèdent pas dans leur génome des séquences non exprimées du gène *RHD* venant interférer avec le test. Parmi ces allèles *RHD* silencieux, le plus fréquent est l'allèle *RHDPsi* : il est observé chez 66% environ des femmes RhD-négatif originaires d'Afrique noire.

Objectif

Valider une technique ainsi qu'une stratégie pour le génotypage *RHD* foetal à partir de sang maternel chez les femmes RhD-négatif porteuses de l'allèle silencieux *RHDPsi*, situation rencontrée dans 3% des demandes de génotypage foetal *RHD* faites au CNRHP.

Matériel et méthodes

Les ADN plasmatiques de 35 femmes enceintes RhD-négatif porteuses d'un allèle *RHDPsi* ont été extraits à partir de 500µl de plasma en utilisant le kit d'extraction QIAamp MinElute Virus Vaccum Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). L'ADN a été élué dans 35µl d'eau. Pour chaque patient, trois PCR en temps réel ont été réalisées : une amplification de l'exon 7 ou 10 avec le kit « Free DNA fetal kit RHD » comme marqueur d'extraction et une amplification des exons 5 et 6 spécifiques de l'allèle *RHD* sauvage (Finning et al., Transfusion, 2002 (42) : 1079-1085). Les résultats obtenus ont été interprétés selon l'arbre décisionnel ci-dessous et comparés au génotypage *RHD* foetal réalisé sur liquide amniotique et/ou au phénotype RhD de l'enfant à la naissance.



Arbre décisionnel du génotypage *RHD* foetal chez les mères RhD-négatif possédant un allèle *RHD* silencieux de type *RHDPsi*

Résultats et interprétation

| | Foetus RhD+ | Foetus RhD- | Total |
|-------------|-------------|-------------|-------|
| Test + | 28 | 0 | 28 |
| Test - | 0 | 5 | 5 |
| Indéterminé | 1 | 1 | 2 |
| Total | 29 | 6 | 35 |

Ct_{E7m}=31,30 (±1,90)
Ct_{E10m}=32,28 (±2,43)

⇒ Pourcentage d'indéterminé=5,7%

Reprise des indéterminés

| | Foetus RhD+ | Foetus RhD- | Total |
|-------------|-------------|-------------|-------|
| Test + | 0 | 0 | 0 |
| Test - | 0 | 1 | 1 |
| Indéterminé | 1 | 0 | 1 |
| Total | 1 | 1 | 2 |

⇒ Pourcentage d'indéterminé=2,9%

- Sensibilité du test=100%
- Spécificité du test=100%
- Valeur prédictive positive du test (aptitude à prévoir un phénotype foetal RhD positif) =100%
- Valeur prédictive négative du test (aptitude à prévoir un phénotype foetal RhD négatif) =100%

Conclusion

Les PCR *RHD* exons 5 et 6 entrent désormais, avec les PCR *RHD* exons 7 et 10, dans notre stratégie de génotypage foetal *RHD* qui devient maintenant accessible aux foetus dont la mère ou eux-mêmes sont porteurs du gène *RHDPsi*. La PCR *RHD* exon 5 est réalisée systématiquement avec les PCR *RHD* exon 7 et 10 chez toutes les patientes RhD-négatif, alors que la PCR exon 6 est réalisée uniquement chez les patientes RhD-négatif possédant un allèle *RHDPsi*.