

EXAMENS COMPLÉMENTAIRES

Génotypage RhD fœtal non invasif sur sang maternel : vers une utilisation chez toutes les femmes enceintes RhD négatif

Non invasive fetal RhD genotyping: Time for use in all RhD negative pregnant women

B. Carbonne*, A. Cortey, C. Rouillac-Le Sciellour, Y. Brossard

Service de gynécologie-obstétrique, centre national de référence en hémobiochimie périnatale (CNRHP), hôpital Saint-Antoine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), 184, rue du Faubourg-Saint-Antoine, 75012 Paris, France

Reçu le 19 septembre 2007 ; accepté le 5 novembre 2007

Résumé

La détermination du génotype *RHD* fœtal 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 fœtal présent dans la circulation maternelle. Ce test, réalisé dans quelques laboratoires seulement, 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 permettrait de n'appliquer une surveillance spécialisée qu'aux fœtus de groupe RhD positif. La généralisation de ce test implique la validation et la diffusion d'un kit commercial de génotypage, utilisable par de nombreux laboratoires non spécialisés ainsi que son évaluation économique.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Non invasive fetal RhD genotyping, based on polymerase-chain-reaction (PCR), is an accurate and validated technique. It allows a reduction by one-third of anti-D immunoglobulin injections to prevent RhD allo-immunization. In case of maternal anti-D immunization, fetal RhD genotyping allows to focus on RhD positive fetuses only the biologic and sonographic follow-up. The wide use of this technique implies the validation and economic evaluation of a commercial RhD genotyping kit, ready for use in non specialized laboratories.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Allo-immunisation ; Rhésus D ; Génotypage non invasif ; Fœtus ; Diagnostic prénatal

Keywords : Allo-immunization; Rhesus D; Non-invasive genotyping; Fetus; Prenatal diagnosis

I. INTRODUCTION

L'allo-immunisation anti-RhD est devenue une pathologie rare, mais dont les conséquences périnatales restent particu-

lièrement graves : risque d'anémie fœtale grave pouvant se compliquer d'anasarque, de mort fœtale in utero (spontanée ou parfois secondaire au traitement par transfusion in utero), d'ictère et d'anémie néonataux graves nécessitant une prise en charge spécialisée. Elle correspond, chez la femme enceinte 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 anti-D maternels traversant le

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : bruno.carbonne@sat.aphp.fr (B. Carbonne).

placenta vers la circulation foetale provoquent en retour une hémolyse et une anémie chez le fœtus RhD positif.

La prévention par immunoglobulines anti-D a fait baisser de manière spectaculaire les nouvelles allo-immunisations. Néanmoins, ces immunoglobulines restent des produits dérivés du sang et leur utilisation devrait être limitée au minimum, qu'elle soit sur signes d'appel (métrorragies, traumatisme abdominal, amniocentèse...), ou réalisée de manière systématique vers 28 semaines d'aménorrhée (SA) comme le préconisent les recommandations de 2005 [1].

La connaissance, dès la fin du premier trimestre de la grossesse, du groupe RhD foetal permettrait d'éviter les injections d'immunoglobulines inutiles aux mères RhD négatif dont l'enfant est lui aussi RhD négatif. Cette situation représente plus du tiers de toutes les femmes enceintes RhD négatif.

Le génotypage RhD foetal non invasif sur sang maternel est désormais une technique validée et éprouvée, mais qui n'est jusqu'à aujourd'hui réalisée de manière fiable que par quelques rares laboratoires très spécialisés [2,3]. L'application à grande échelle de cette technique passera par la diffusion à de nombreux laboratoires agréés d'un kit commercial de génotypage RhD.

2. TECHNIQUE DU GÉNOTYPAGE NON INVASIF

2.1. Principe du génotypage foetal sur sang maternel

Depuis 1990, Lo et al. [4] ont mis en évidence la présence d'ADN foetal circulant dans le plasma maternel. La quantité d'ADN foetal circulant varie de quelques copies jusqu'à plusieurs centaines de copies de génome foetal par millilitre de plasma ; la quantité croît avec l'âge gestationnel. Chez les femmes enceintes RhD négatif qui ne possèdent donc pas le gène *RHD* dans leur génome, il est possible, lorsque leur fœtus est RhD positif, d'identifier ce gène dans l'ADN extrait de leur plasma par une technique d'amplification génique (Brevet Oxford University).

Il était déjà possible, depuis les années 1990, d'effectuer un génotypage RhD foetal par *polymerase-chain-reaction* (PCR) sur le liquide amniotique. Néanmoins, cette méthode s'appuie sur un geste invasif d'amniocentèse, à risque d'hémorragie fœtomaternelle qui pourrait réactiver ou activer, en l'absence de prévention, une immunisation anti-D.

2.2. Le gène *RHD*

Dans la pratique quotidienne, on distingue les individus Rhésus négatif dont les hématies ne portent pas l'antigène D, et les individus Rhésus positif, dont les hématies sont porteuses de l'antigène D.

En réalité, l'organisation du système Rhésus, décrite en 1991 par une équipe française [5], est très complexe et polymorphe. En effet, le système Rhésus comprend d'autres marqueurs membranaires que l'antigène D : C, c, E, e. On

parle généralement de locus Rhésus pour désigner un ensemble de deux gènes, très proches sur le chromosome 1 et qui semblent transmis en bloc (Fig. 1) : le gène *D* (ou *RH1*), codant pour la protéine de l'antigène D, et le gène *CE*, codant pour les autres antigènes. Le gène *CE* est toujours présent. Le gène *D* est absent chez la plupart (> 98 %) des sujets RhD négatif (gène *D* délété ; Fig. 1). Beaucoup plus rarement (< 2 %), le phénotype RhD négatif peut correspondre à une mutation du gène *D* ou à des gènes hybrides *D-CE-D* (Tableau 1).

2.3. Technique d'amplification du gène *RHD*

Une méthode permettant la détermination précoce (dès 10–12 SA) du génotype *RHD* foetal à partir de l'ADN foetal libre extrait d'une simple prise de sang maternel a été mise au point par le Centre national de référence en hématologie périnatale (CNRHP) [2].

L'ADN du plasma maternel est d'abord purifié puis concentré dans un éluat. La présence du gène *RHD* foetal dans l'ADN plasmatique est détectée par amplification génique (PCR) de deux régions distinctes spécifiques du gène *RHD* : les exons 7 et 10, afin de détecter un maximum de variants du gène *RHD* et de limiter les erreurs dues au grand polymorphisme du gène *Rhésus*.

Les amplifications géniques sont réalisées sur un automate de PCR quantitative en temps réel afin de répondre au mieux aux exigences de non-contamination, de rapidité et de fiabilité des analyses de biologie moléculaire. Les amplicons sont révélés grâce à trois sondes d'hydrolyse spécifiques de chaque région amplifiée, de manière à ce que la technique soit applicable à tous les appareils PCR en temps réel [2].

Dans chaque série d'extraction, il est inclus un plasma de témoin positif, de témoin négatif et un témoin blanc (constitué d'eau à la place du plasma). Un contrôle interne d'extraction de l'ADN (ADN de maïs) est ajouté dans chaque échantillon de plasma à extraire et dans chacun des trois témoins de contrôle (positif, négatif et blanc). L'ajout d'ADN étranger permet les points suivants :

- de vérifier la qualité et le rendement de l'extraction ;
- de mettre en évidence la présence éventuelle d'inhibiteurs de la réaction d'amplification génique, lorsque les exons 7 et 10 ne sont pas détectés.

Dans la très grande majorité des cas (> 98 %), chez les sujets RhD positif, la réaction est positive avec les amorces des exons 7 et 10. Les sujets RhD négatif ont une réaction négative pour ces deux exons. Seuls quelques variants peuvent donner des

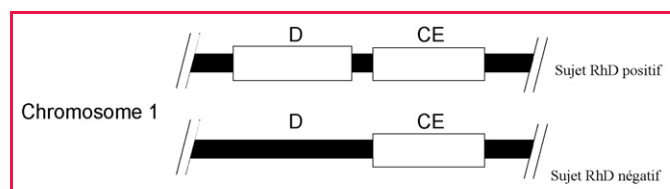


Fig. 1. Schéma du gène *Rhésus*, situé sur le chromosome 1.

Tableau 1

Profil génotypique RhD des personnes RhD négatif

	Caucasiens RhD négatif (15 %)	Noirs africains RhD négatif (3 %)	Exon 7	Exon 10
Gène <i>D</i> délété	> 98 %	10–25 %	–	–
Gène <i>D</i> muté non fonctionnel	< 1 %	60–70 %	+	+
Gène hybride <i>D-CE-D</i>	< 1 %	10–20 %	–	+

résultats faussement positifs ou discordants pour les deux exons (Tableau 1).

Chez le sujet caucasien, le phénotype RhD négatif correspond dans plus de 98 % des cas à une délétion du gène *D*. L'utilisation du test permet d'obtenir un résultat négatif pour les deux exons 7 et 10. Les gènes *D* mutés (type *Dy*) donnent un résultat faussement positif pour les deux exons 7 et 10. Cette situation (moins de 1 % des cas chez les Caucasiens) est sans conséquence clinique grave puisque le fœtus sera considéré comme positif en cas de situation à risque (nécessité de prévention par immunoglobulines ou allo-immunisation anti-D maternelle). Dans le cas de gènes hybrides *D-CE-D*, le résultat du test sera considéré comme indéterminé, car discordant pour les exons 7 et 10. Le fœtus doit alors être considéré comme positif jusqu'à l'accouchement et la mère recevra une prévention par immunoglobulines anti-D en cas de situation à risque.

3. PRINCIPALES INDICATIONS D'UTILISATION DU GÉNOTYPAGE SUR SANG MATERNEL

En France, environ 15 % de la population d'origine caucasienne est de phénotype RhD négatif. Cette fréquence varie selon les populations (35 % chez les Basques, 2 à 7 % dans la population africaine et seulement 0,3 % chez les Asiatiques). Ainsi, chaque année en France, 150 000 à 165 000 femmes RhD négatif sont enceintes, dont 90 000 sont enceintes d'un fœtus RhD positif [6].

3.1. Femmes RhD négatif ayant une allo-immunisation anti-RhD

Le génotypage est ici très utile pour le diagnostic d'incompatibilité fœtomaternelle RhD chez des femmes RhD négatif porteuses d'une immunisation anti-D. La technique sur sang maternel est ici la technique de choix permettant d'éviter le recours à une amniocentèse et ses risques dont celui de fausse couche et de réactivation de l'immunisation maternelle lorsque le fœtus est RhD positif.

En cas de négativité du génotype RhD fœtal, confirmée sur deux prélèvements sanguins espacés d'une à quelques semaines, le risque d'anémie fœtale est absent, quelle que soit la sévérité de l'allo-immunisation. La grossesse pourra être surveillée de manière habituelle et ne nécessitera pas de prise en charge spécialisée. La surveillance des titrages et dosages d'anticorps anti-D est ici inutile. En cas de positivité du génotype *RHD* fœtal, il existe une

situation d'incompatibilité sanguine materno-fœtale qui justifie une surveillance spécialisée : titrages et dosages pondéraux d'anticorps anti-D d'une part, recherche de signes d'anémie fœtale par l'échographie et surtout le Doppler (pic systolique de vélocité de l'artère cérébrale moyenne) d'autre part [7]. Enfin, la prise en charge néonatale devra se faire en milieu spécialisé du fait de la nécessité éventuelle de transfusion sanguine et de photothérapie intensive.

3.2. Intérêt du génotypage fœtal dans la stratégie de prévention des allo-immunisations

3.2.1. Prévention ciblée

La prévention dite ciblée de l'allo-immunisation anti-D repose sur l'injection d'immunoglobulines à l'accouchement et pendant la grossesse, dans les situations à risque d'hémorragie fœtomaternelle : métrorragies, traumatisme abdominal, amniocentèse ou autre prélèvement ovulaire... Lorsque le procréateur est connu avec certitude par la patiente et que son groupe RhD est négatif, confirmé par la carte de groupe vue par le soignant, le génotypage fœtal n'est pas justifié. Dans les autres cas, la détermination du génotype *Rhésus D* fœtal sur sang maternel au début du deuxième trimestre permettra d'éviter aux femmes Rhésus négatif dont le fœtus est de Rhésus négatif une ou des injections d'immunoglobulines anti-D inutiles puisqu'elles ne sont pas à risque d'immunisation. Cette situation est loin d'être exceptionnelle puisqu'elle représente environ un tiers des cas.

3.2.2. Prévention systématique du troisième trimestre

Depuis 2005, il est recommandé d'effectuer une injection systématique d'immunoglobulines anti-D (300 mcg) vers 28 SA afin d'éviter les immunisations liées à des hémorragies fœtomaternelles occultes donc inaccessibles à une prévention ciblée [1]. Ces passages d'hématies fœtales, totalement impossibles à dépister, sont responsables d'environ un tiers des allo-immunisations graves actuellement suivies. Cette prévention systématique représente une augmentation importante de l'utilisation d'immunoglobulines anti-D. Dès que le génotypage RhD fœtal sera largement disponible, il permettra de réduire de manière importante (environ un tiers) les injections d'immunoglobulines.

3.2.3. Cas particulier des prélèvements ovulaires (amniocentèses et biopsies de trophoblaste)

Le génotypage RhD fœtal sur liquide amniotique est disponible et fiable depuis les années 1990. Lorsque les

résultats peuvent être rendus en moins de 72 heures après l'examen, il reste possible de ne prescrire l'injection d'immunoglobulines qu'aux femmes dont le fœtus est RhD positif. Cependant, le délai entre la réalisation de l'amniocentèse et le rendu des résultats du génotypage, la nécessité de reconvoquer la patiente et le délai entre l'acte à risque et l'injection d'immunoglobulines représentent autant de risques d'échec de la prophylaxie.

Dans ce contexte, le génotypage fœtal sur sang maternel est alors proposé huit à dix jours avant le prélèvement. En cas de génotype *RHD* négatif, il n'est pas prescrit d'injection d'immunoglobulines et le génotype fœtal *RHD* sur liquide amniotique ou villosités choriales dans les 72 heures suivant le geste permet alors de conforter l'abstention de prévention. En cas de positivité du génotype *RHD* fœtal sur sang maternel, l'injection d'immunoglobulines est réalisée immédiatement après le prélèvement.

4. VERS UN GÉNOTYPAGE RHD CHEZ TOUTES LES FEMMES RHD NÉGATIF?

Considéré le succès des résultats obtenus dans les indications citées plus haut, l'extension du génotypage fœtal RhD sur sang maternel à toutes les femmes enceintes RhD négatif est aujourd'hui envisagée.

La généralisation du génotypage fœtal RhD permettrait d'éviter un grand nombre d'administrations de produits dérivés du sang. Les immunoglobulines anti-D actuellement commercialisées sont d'origine humaine (provenant exclusivement de donneurs sains d'Amérique du Nord, hyperimmunisés et rémunérés). Le risque viral lié à l'utilisation des immunoglobulines anti-D est extrêmement faible du fait des traitements appliqués pour éliminer les virus. Néanmoins, ce risque ne peut être considéré comme totalement nul, notamment avec des virus encore non répertoriés, argument pour limiter la prescription d'immunoglobulines anti-D chez les femmes qui ne sont pas à risque d'immunisation.

De plus, l'administration systématique d'immunoglobulines anti-D à 28 SA aux femmes RhD négatif représente un surcoût important par rapport à l'administration uniquement sur signes d'appel. La généralisation du génotypage RhD fœtal sur sang maternel pourrait en partie compenser le surcoût lié à la prophylaxie systématique en permettant de la réserver aux seules femmes à risque d'immunisation, c'est-à-dire enceintes

d'un fœtus RhD positif. Cette stratégie plus rationnelle de prévention permettrait également de limiter les recherches d'agglutinines irrégulières, également coûteuses.

À partir des travaux réalisés au Centre national de référence en hémiobiologie périnatale et grâce à une coopération recherche-industrie (INSERM, INTS, CNRHP, Institut Jacques-Boy), un kit de première génération a été développé en 2005–2006, afin de faciliter la généralisation de ce test dans un proche avenir. Le kit *free DNA fetal kit*[®] RhD Jacques-Boy a obtenu une norme CE en juin 2007. Il s'agit du premier kit de génotypage RhD fœtal non invasif et sa mise à disposition sur le marché fait rentrer ce test et les laboratoires qui vont le pratiquer, dans le statut réglementaire du diagnostic prénatal par biologie moléculaire.

Une évaluation économique multicentrique, ainsi que la mise en place de contrôles de qualité de cette technique vont débiter très prochainement afin de valider la généralisation de ce test dans la pratique courante. Cette étude devrait également permettre de donner les bases nécessaires à la mise à la nomenclature des actes biologiques du génotypage RhD non invasif et, à terme, à son remboursement par la sécurité sociale.

RÉFÉRENCES

- [1] Collège national des gynécologues et obstétriciens français. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D fœtomaternelle. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2006;35(Suppl. 1):1S81–1S135.
- [2] Rouillac-Le Sciellour C, Puillandre P, Gillot R, Baulard C, Metral S, Le Van Kim C, et al. Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women. *Mol Diagn* 2004;8:23–31.
- [3] Gautier E, Benachi A, Giovangrandi Y, Ernault P, Olivi M, Gaillon T, et al. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:666–9.
- [4] Lo YM, Patel P, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA, Wainscoat JS. Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood. *Lancet* 1990;335:1463–4.
- [5] Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 1991;78:2747–52.
- [6] Branger B, Winer N. Épidémiologie de l'allo-immunisation anti-D pendant la grossesse. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2006;35(Suppl. 1):1S87–92.
- [7] Carbonne B, Castaigne-Meary V, Cynober E, Gougeul-Tesnière V, Cortey A, Soulié JC, Larsen M, Méraud B et al. Intérêt pratique du pic systolique de vélocité à l'artère cérébrale moyenne dans la prise en charge des allo-immunisations sévères. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2007 Nov 12; [Epub ahead of print].