

Techniques de génotypage *RHD* fœtal non invasif quelles améliorations ?

Dr Agnès Mailloux – Nelly Da Silva, PhD
Service d'hémobiologie fœtale et périnatale

Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale
LBM des HU de l'Est Parisien – DMU BioGeMH
Hôpital Saint-Antoine – AP-HP Sorbonne Université – Paris



4^{ème} Journée « Yves Brossard »

d'hémobiologie fœtale et néonatale

Vendredi 24 janvier 2025

GÉNOTYPAGE RHD FCÉTAL NON INVASIF

- ✓ Examen aujourd'hui largement prescrit dans le cadre du suivi de la femme enceinte RhD négatif (15 %) soit environ 142 000 patientes (remboursement 2017)
- ✓ Examen soumis à une autorisation de DPN
- ✓ Réalisé par une dizaine de laboratoires en France
- ✓ Examen transmis dans la plupart des cas nécessitant une interprétation et un conseil de prise en charge

GÉNOTYPAGE *RHD* FŒTAL NON INVASIF

INDICATIONS

PRINCIPE

INTERPRÉTATION (expérience du CNRHP)

GENOTYPAGE RHD FŒTAL – INDICATIONS

CONTEXTE 1 – RECOMMANDATIONS

Femme immunisée anti-RH1
risque d'anémie fœtale sévère si le fœtus est positif

à partir de 11 SA

Résultat génotypage RHD fœtal non invasif

Fœtus RHD+
Incompatibilité
fœto-maternelle
Légitime surveillance

Fœtus RHD-
Compatibilité
fœto-maternelle
Levée de surveillance

Fœtus Indéterminé
Incompatibilité
fœto-maternelle possible
Légitime surveillance

Besoins:

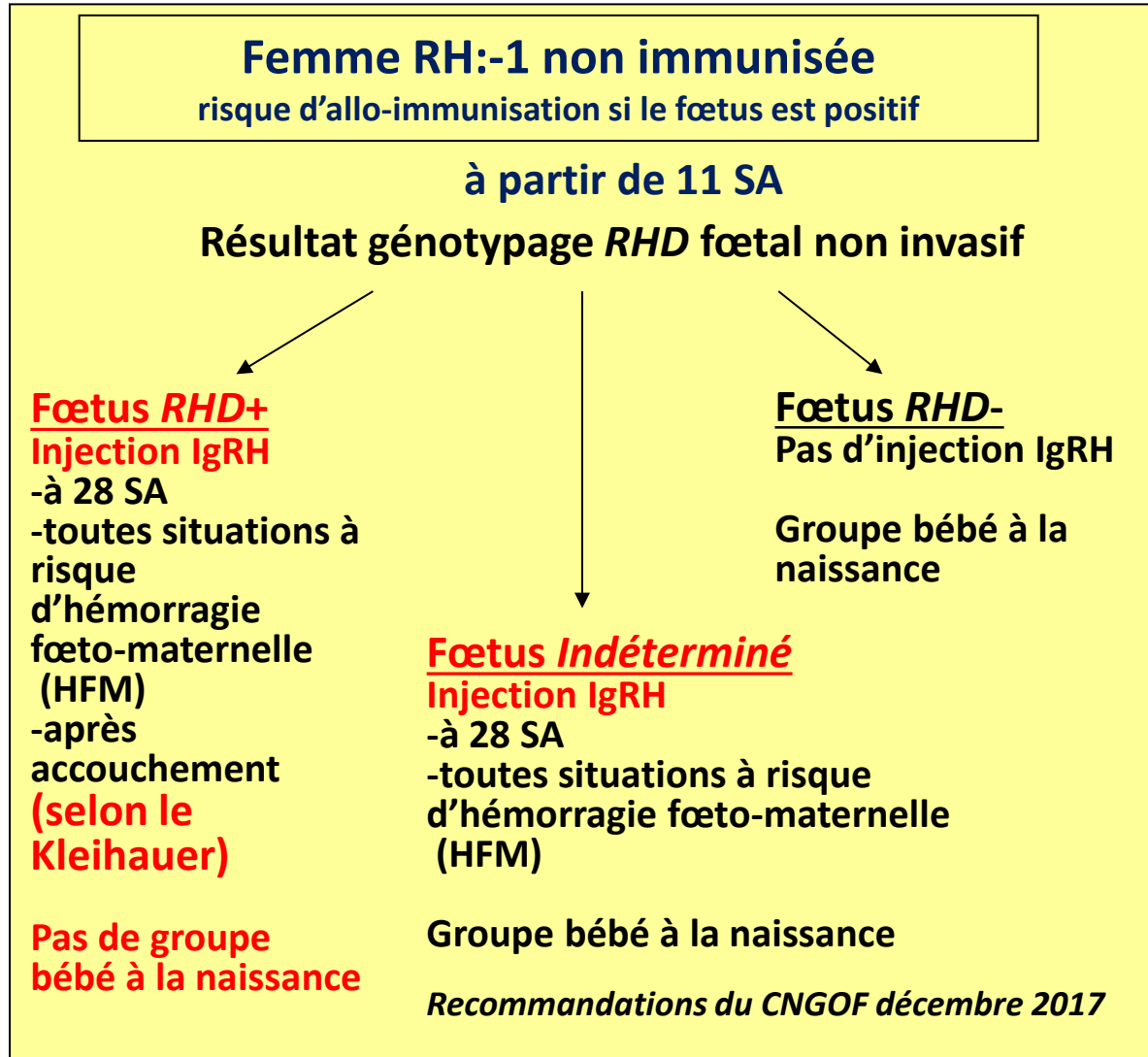
- certitude des positifs
- certitude des négatifs
- diagnostic précoce

Intérêt clinique

Adaptation de la surveillance des femmes enceintes allo-immunisées présentant un risque d'anémie fœtale sévère

GÉNOTYPAGE *RHD* FŒTAL – INDICATIONS

CONTEXTE 2 – RECOMMANDATIONS



La femme enceinte RH:-1 (D négatif) n'est pas immunisée (absence d'anti-RH1 détectables), et le père présumé du fœtus est en situation d'hétérozygotie probable pour le gène *RHD*.

La prise en charge est alors préventive, et consiste à éviter la réaction immunitaire maternelle contre les globules rouges fœtaux présentant l'antigène RH1, par l'administration d'immunoglobulines anti-RH1 (D)

Intérêt clinique

Optimisation de la prévention de l'allo-immunisation anti-D

GÉNOTYPAGE *RHD* FŒTAL NON INVASIF

INDICATIONS

PRINCIPE

INTERPRÉTATION (expérience du CNRHP)

GÉNOTYPAGE *RHD* FŒTAL NON INVASIF

principe = déterminer les séquences fœtales
dans le plasma maternel

Extrait d'ADN de plasma/sérum maternel
(pool d'ADN circulant maternel et fœtal)

Identification
des séquences *RHD*
présentes chez le fœtus et
absentes chez la mère

Présence des séquences
FŒTUS POSITIF

Risque d'allo-immunisation
Risque d'incompatibilité fœto-maternelle

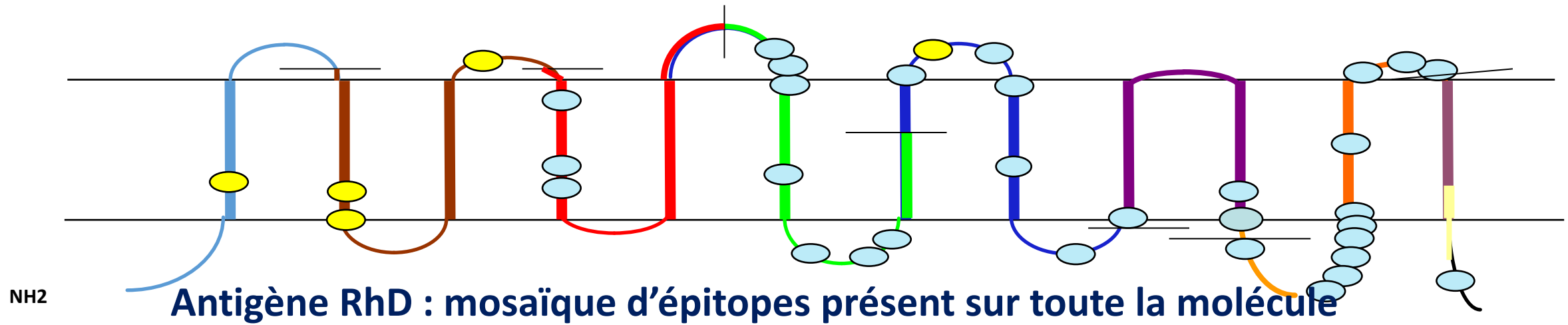
Absence des séquences
FŒTUS NEGATIF

(diagnostic par défaut)

Absence de risque d'allo-immunisation
Compatibilité fœto-maternelle

GÉNOTYPAGE *RHD* FCÉTAL NON INVASIF

Quelles sont les séquences *RHD* à identifier?



E1

E2

E3

E4

E5

E6

E7

E8

E9

E10



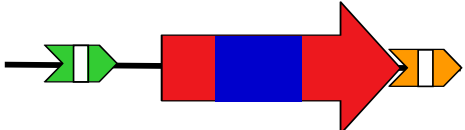




3 exons cibles codant majoritairement l'antigène RhD : exons 4, 5 et 7

GÉNOTYPAGE *RHD* FŒTAL NON INVASIF

Quels sont les allèles du gène *RHD* à rechercher?

Gene *RHD*

-Le variant RH:-1 (maternel ou fœtal)	Caractéristiques moléculaire	Phénotype
<p><i>délétion</i> </p> <p>>99% des caucasiens RH:-1 17% des afro-antillais RH:-1</p>	Absence du gène <i>RHD</i>	RH:-1
<p><i>Pseudogene DPsi</i> </p> <p>66% des afro-antillais RH:-1</p>	Présence de séquence <i>RHD</i> non fonctionnelle	
<p><i>D-CE(4-7)-D</i> </p> <p>17% des afro-antillais RH:-1</p>	Absence de séquence <i>RHD</i> codant pour l'antigène RH1	
-Le variant RH:1 (fœtal)	Caractéristiques moléculaire	Phénotype
<p><i>RHD</i> </p>	Présence de séquence <i>RHD</i> codant pour l'antigène RH1	RH:1
<p><i>D-CE(4-5)-D</i> </p>	Présence de séquence partielle <i>RHD</i> codant pour l'antigène RH1	RH:P1

GÉNOTYPAGE RHD FŒTAL NON INVASIF

Kits commerciaux disponibles

Nom du dispositif	Pays d'origine	Société	Technologie	Cible(s) RHD
Devyser RHD	Suède	Devyser Diagnostics	PCR en temps réel	exon 4
RBC-FluoGene RHD Zygoty Q	Allemagne	Inno-Train Diagnostik GMBH	PCR en temps réel	exons 5 et 7
NiMoTest® Fetal RHD qPCR	Danemark	BeDiaGenomics	PCR en temps réel	exons 5 et 7
Fetal RHD genotyping	Russie	DNA Technology	PCR en temps réel	exons 7 et 10
Cell3 Direct Rhesus D Fetal Blood Group Genotyping	Royaume-Uni	Nonacus	PCR en temps réel	exons 5, 7 et 10
FetoGnost Kit RHD	Autriche	Ingenetix GmbH	PCR en temps réel	exons 5, 7 et 10
AIO-RHD Fetal DNA Kit	France	Genotropy	HRM	exons 5, 7 et 10
Free DNA Fetal Kit RHD	France	Institut de Biotechnologies Jacques Boy	PCR en temps réel	exons 5, 7 et 10

GÉNOTYPAGE *RHD* FŒTAL NON INVASIF

INDICATIONS

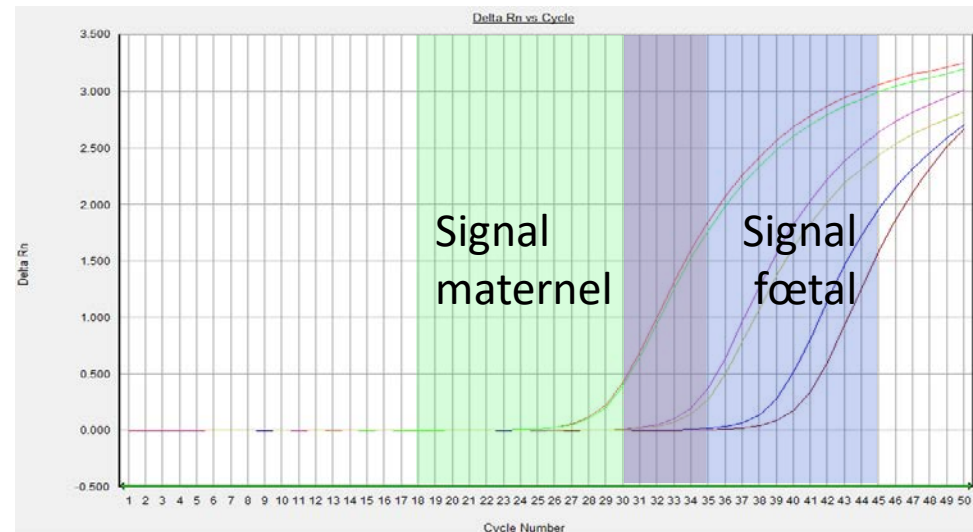
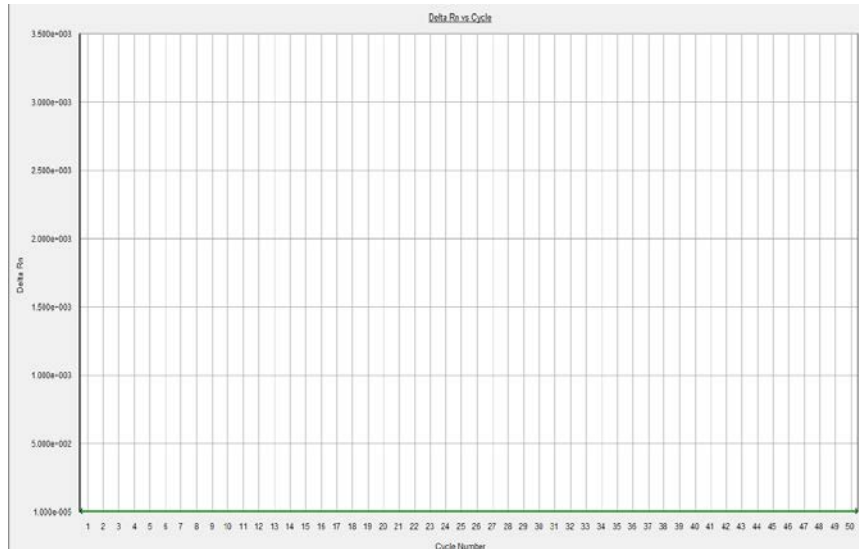
PRINCIPE

INTERPRÉTATION (expérience du CNRHP)

GÉNOTYPAGE *RHD* FŒTAL NON INVASIF

Principe d'interprétation au CNRHP (Free DNA Fetal Kit *RHD* de IJB)

Principe : 1- Identification de séquence *RHD* par PCR exons *RHD* 5, 7 et 10
2- Utilisation de Ct (nombre de cycles PCR pour lequel le signal du produit PCR se distingue du bruit de fond) pour différencier le signal fœtal du signal maternel



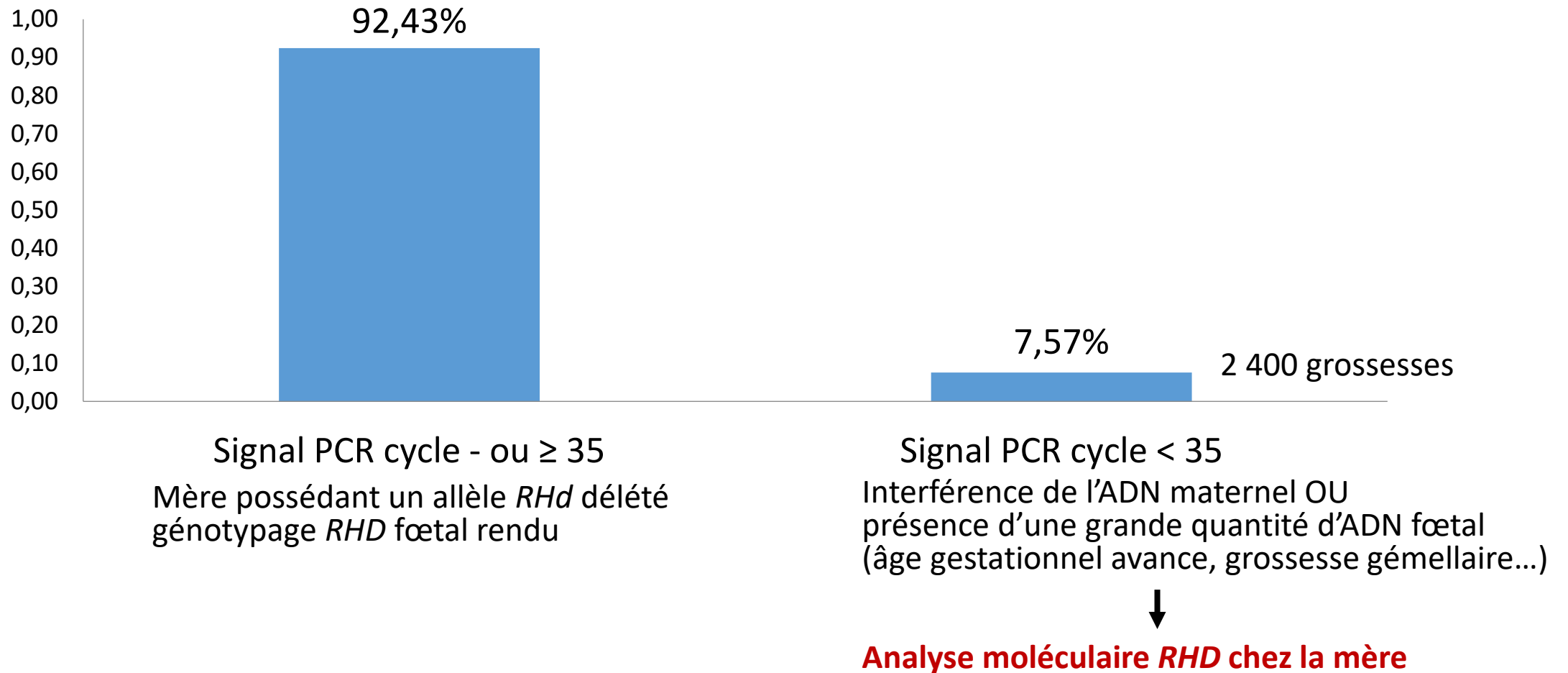
Pas de signal = pas de séquence *RHD* :

- 1- mère possède un allèle *RHD* délété
- 2- **fœtus négatif** (diagnostic par défaut)

- ✓ Signal tardif **après 35 cycles** = **signal fœtal positif** et mère possédant un gène *RHD* délété
- ✓ Signal précoce **avant 30 cycles** = signal maternel (identification d'un variant qui interfère)
- ✓ Signal **entre 30 et 35 cycles** = signal maternel ou fœtal

GÉNOTYPAGE *RHD* FŒTAL NON INVASIF

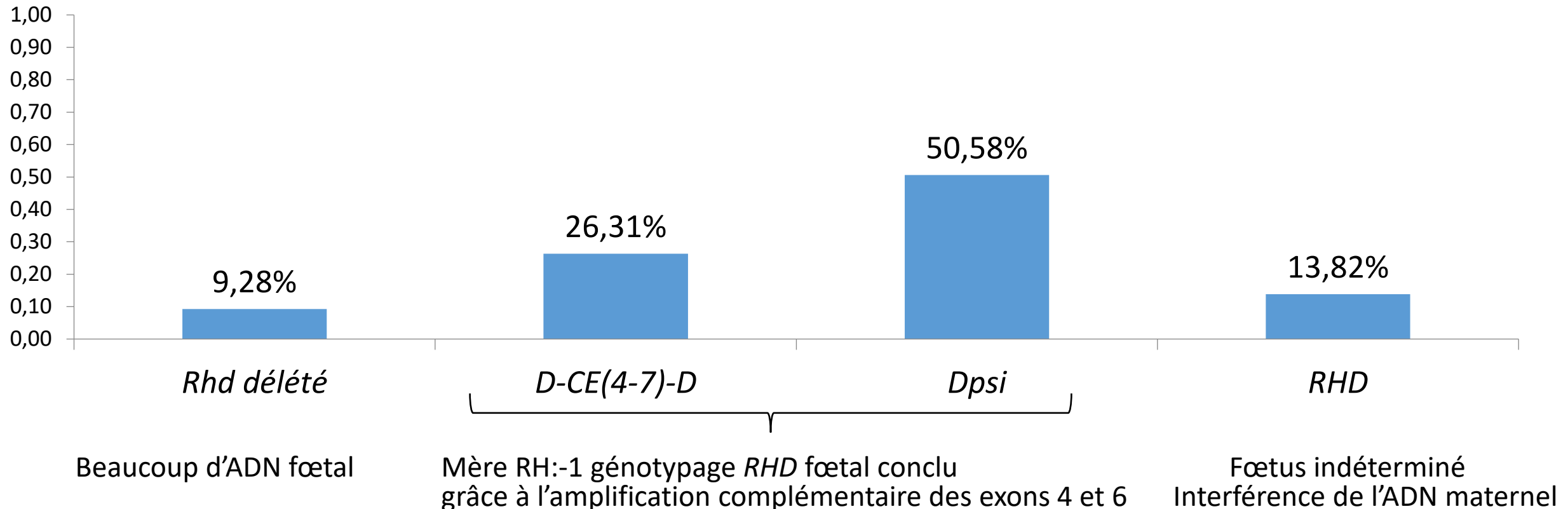
Répartition des signaux PCR sur 31 722 grossesses (11 ans)



Da Silva N et al : Génotypage *RHD* fœtal non invasif chez des patientes annoncées D- (*RH*: -1) possédant des séquences génomiques *RHD* : étude rétrospective sur 11 ans.
Transfusion clinique et biologique, S28-2, Novembre 2023

GÉNOTYPAGE *RHD* FŒTAL NON INVASIF

Répartition des allèles maternels



Si pas de seuil défini pour identifier les variants maternels risque de résultats faussement positifs

CONSEQUENCE D'UNE ERREUR D'INTERPRETATION DE GENOTYPAGE CHEZ UNE PATIENTE IMMUNISEE

Patiente présentant une allo- immunisation anti-D sévère

- ✓ G5P3
- ✓ 12 SA : anti-D avec dosage pondéral à 1,5 µg/ml titre 32
- ✓ 12 SA : Génotypage RHD foetal positif
- ✓ Allo-immunisation sévère avec indication à surveiller PSV hebdomadaire à partir de 16 SA
- ✓ 27 SA : suivi hebdomadaire dans maternité de référence mis en place
- ✓ 31 SA : possible anémie foétale débutante : discussion TIU / cure de corticoïdes puis nouveau contrôle PSV
- ✓ TIU récusée
- ✓ Poursuivie des PSV hebdomadaires
- ✓ Naissance programmée à 37 SA
- ✓ Césarienne à 37SA+1j

Examens chez le nouveau-né

- ✓ Cordon Hb : 15 g/dL
- ✓ Bilirubinémie : 30 µmol/L
- ✓ Groupe : A RH:-1 (RhD négatif)
- ✓ TDA : négatif

CONCLUSION : NOUVEAU-NE RhD COMPATIBLE

CONSEQUENCE D'UNE ERREUR D'INTERPRETATION DE GENOTYPAGE CHEZ UNE PATIENTE IMMUNISEE

Enfant trouvé RhD négatif à la naissance

Examens complémentaires envoyés au LBMR :

- ✓ **Génotype *RHD* des cellules de l'enfant** pour rechercher un variant silencieux chez l'enfant.
- ✓ **Résultat** : absence de séquence du gène *RHD* , pas de variant silencieux chez l'enfant.
- ✓ **Génotype *RHD* des cellules de la mère** pour rechercher un variant silencieux chez la mère
- ✓ **Résultat** : patiente RhD négatif présentant un variant *RHD* silencieux de type *DPsi*

Hypothèse la plus probable expliquant ce faux positif :

- ✓ Laboratoire ayant réalisé le génotypage a amplifié des séquences maternelles du gène *RHD*.
- ✓ **Profil normalement bien identifiable car l'amplification des exons d'origine maternelle est beaucoup plus précoce que ceux d'origine foétale, ce type de profil nécessite des explorations complémentaires (rapport HAS de 2011 pour la pratique du génotypage *RHD* foetal).**

IMPORTANCE DE DETECTION DES VARIANTS MATERNELS CHEZ LES PATIENTES IMMUNISÉES

CONSEQUENCE D'UNE ERREUR D'INTERPRETATION DE GENOTYPAGE CHEZ UNE PATIENTE NON IMMUNISEE

Patiente RhD négatif, RAI négative,

- ✓ Une 1^{ère} demande de génotypage *RHD* foetal non invasif à 18 SA est adressé à un premier laboratoire dans le cadre d'une prophylaxie Rhésus
- ✓ **Résultat : patiente porteuse d'un allèle silencieux *Dpsi* enceinte d'un foetus génotypé *RHD* négatif, à contrôler sur un nouveau prélèvement à réaliser dans 2 semaines**
- ✓ Une deuxième détermination du génotypage *RHD* foetal est réalisée à 24 SA dans un autre laboratoire.
- ✓ **Résultat : foetus *RHD* positif sans mention concernant l'identification de séquences maternelles**
- ✓ Réclamation du prescripteur au près du premier laboratoire ayant réalisé l'examen. Conseil de réaliser un 3^{ème} prélèvement.
- ✓ **Résultat : foetus confirmé négatif chez une mère possédant un allèle silencieux *Dpsi***

Pas de prophylaxie IgRH et bébé confirmé négatif à la naissance

Prélèvement – Transmission LBM centralisateur

LBM 1^{ère} intention

LBM 2^{ème} intention

LBM 3^{ème} intention (LBMR)

**Génotypage RHD non invasif chez femme RH:-1 – au moins 2 exons - >11 SA (NABM 4085)
Avec possible détection des interférences de l'ADN maternel (CT mesurable)**

Pas de signal

Allèle RhD délété chez la mère
Fœtus rendu négatif

2^{ème} détermination après 15 jours (NABM 4086)

Phénotypage mère

Génotypage RHD cellule maternelle

Génotypage RHD complémentaire (3^{ème} exon voir plus)

CT<35*

Signal maternel ou fœtal ?
7 % des cas

Fœtus indéterminé

**Retransmission LBM référence
Si techniques discriminantes non disponibles**

RHD
Fœtus rendu indéterminé (14%)

2^{ème} détermination après 15 jours (NABM 4086)

D-CE(4-7)-D (26%) ou Dpsi (50%)
Fœtus rendu positif si confirmation 3 exons

Prophylaxie ciblée ou surveillance légitimée

Rhd délété
Fœtus rendu positif (9%)

Prophylaxie ciblée ou surveillance légitimée

CT>35*

Allèle RhD délété chez la mère
Fœtus rendu positif

Prophylaxie ciblée ou surveillance légitimée

*Seuil à déterminer par le laboratoire

CONCLUSIONS/PERSPECTIVES

- ✓ Examen largement prescrit depuis son remboursement
- ✓ Outil essentiel pour le suivi de la patiente RH-1
- ✓ Existence de recommandations de suivi en fonction du résultat du génotypage
- ✓ Existence de recommandations HAS pour la technique à utiliser (au moins 2 exons)
- ✓ Importance de détecter les interférences avec les séquences *RHD* maternelles (mesure systématique des Cts) pour éviter des **FAUX POSITIFS** pouvant avoir des conséquences
 - ✓ Chez les patientes Allo-Immunisées : Risque d'un suivi lourd avec naissance programmée possible dès 37SA
 - ✓ Chez les patientes non Allo-Immunisées :
 - Risque d'une prophylaxie rhésus tout au long de la grossesse et après la naissance car le groupe du bébé n'est pas réalisé
 - Risque d'une prophylaxie non adaptée si D faible 1, 2, 3 et 4.0
- ✓ Perspectives : amélioration de la prise en charge des femmes allo-immunisées *RHD* partiel (type DVI)

Remerciements

DMU BioGeMH (Pr R. LEVY)

LBM EST PARISIEN (Dr M. VAUBOURDOLLE)

Service d'hémobiologie fœtale et périnatale – CNRHP (Dr A. MAILLOUX)

Techniciens / réceptionnistes / secrétaires / ingénieurs /cadre

Equipe des Biologistes : Dr J. BABINET, Dr J. BEAUD, Dr S. HUGUET-JACQUOT, Dr F. KHETTAB, Dr E. MAENULEIN, Dr R. PETERMANN , Dr C. TOLY-NDOUR,

LBU Saint-Antoine : Techniciens et Biologistes

DMU ORYGINE (Pr J-M. JOUANNIC)

Service de Médecine Fœtale (Pr J-M. JOUANNIC)

UF clinique du CNRHP (Pr J-M. JOUANNIC)

Permanence médicale du CNRHP

Infirmières

Pédiatres : Dr M-G. GUILLEMIN, Dr N. ABED, Dr J. WIRTH, Dr B. CARPENTIER, Dr A. POTIER

Obstétriciens : Dr P. MAURICE, Dr L. GUILBAUD, Dr F. DHOMBRES, Dr L. FRANCHINARD

SF coordinateur : B. LAFON, I. REGNIER