



Utilité de la prévention Rh systématique chez les patientes présentant un antigène D partiel

Dr Cécile TOLY-NDOUR, PharmD, PhD

*Service d'Hémodiologie Foetale et Périnatale (Dr Agnès MAILLOUX)
Centre National de Référence en Hémodiologie Périnatale (CNRHP)
Hôpital St Antoine - Assistance Publique des Hôpitaux de Paris*

Déclaration de liens d'intérêt



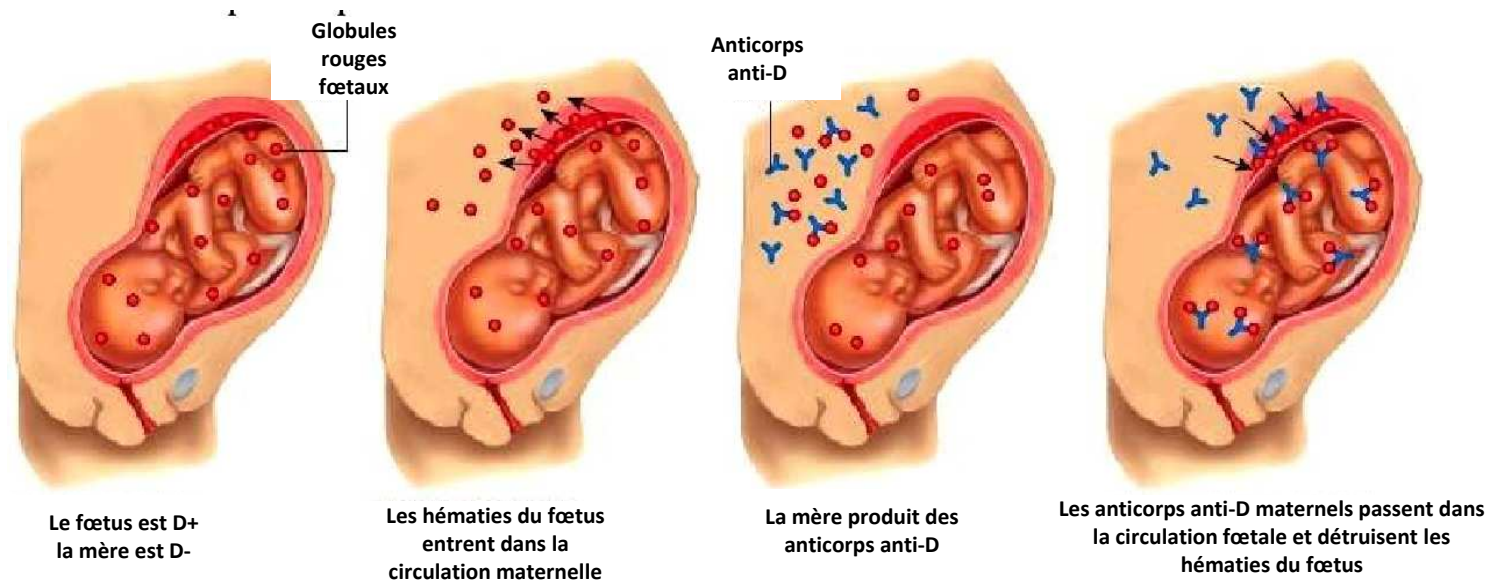
Intervenant : Cécile TOLY-NDOUR, Paris

J'ai un ou plusieurs lien(s) d'intérêt

Consultante occasionnelle (« bêta-testing ») pour les sociétés BIO-RAD et IMMUCOR

Allo-immunisation anti-D pendant la grossesse et prévention Rh

Physiopathologie de la maladie Hémolytique du fœtus et du nouveau-né due à une incompatibilité fœto-maternelle anti-D



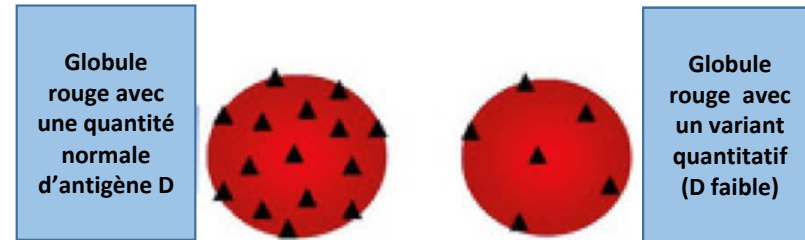
Prévention Rh

- **Dans les années 60:** début de l'administration d'immunoglobulines anti-D (IgRh) en post partum, suivie par la **prophylaxie antenatale ciblée** dans les situations à risque d'hémorragie fœto-maternelle → diminution du taux d'allo-immunisation anti-D pour les patientes D négatif (RH:-1) porteuses d'un enfant D positif (RH:1) de **15 à 1,6 %** (Crowther CA et al, Cochrane Database syst Rev 1997).
- **Dans les années 1990s:** introduction de l'**immunoprophylaxie systématique au début du 3ème trimestre (28SA)** pour prévenir l'immunisation anti-D chez les patientes causées par des petites hémorragies fœto-maternelles spontanées et occultes qui sont fréquentes à ce terme → cela a encore permis de **diminuer de moitié le risque d'allo-immunisation** (Koelewijn JM et al Transfusion 2008)

Allèles D variant

- **Variants quantitatifs** (mutation ponctuelle dans les domaines transmembranaires ou intracytoplasmiques de la protéine RhD) :

Ex: D faible type 1,2,3 – Del ...



- **Variants qualitatifs** (mutation ponctuelle dans le domaine extracellulaire ou dans des régions transmembranaires particulières de la protéine RhD ou protéine hybride D-CE (conversion génique)):

- D partiel (un ou plusieurs épitopes de l'antigène D manquant)

- D faible à caractère partiel: moins de sites antigéniques et épitopes manquants

Ex: DII à VII, DAU, DAR, DOL,DFR,DBT, D faible type 11,15...

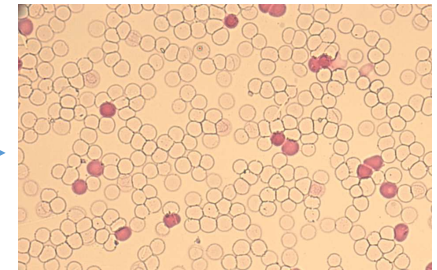


→ **Les patients avec un variant qualitatif sont à risque d'allo-immunisation anti-D.**

Femmes enceintes avec un allèle D variant

- Les femmes enceintes avec un antigène D partiel peuvent développer une allo-immunisation anti-D si les globules rouges de leur fœtus expriment l'antigène D "normal" (conventionnel)
- Mais une partie des immunoglobulines anti-D (IgRh) injectées va se lier au variant de la protéine RhD sur les globules rouges de la patiente, ce qui pose la question de l'utilité et de l'efficacité de l'immunoprophylaxie Rh pour ces patientes.

L'immunoprophylaxie anténatale ciblée et du post-partum est généralement faite, car liée à des événements à risque d'hémorragie fœto-maternelle ponctuels et possibilité d'adapter le nombre de doses injectées grâce au test de Kleihauer-Betke *(Prise en charge des hémorragies fœto-maternelles à l'accouchement chez des patientes RH1 partiel : à propos de 3 cas - SFTS 2019)*



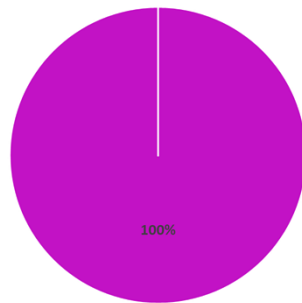
➤ Mais quand est-il de la prophylaxie antenatale systématique (PAS) ?

Enquête européenne sur la prévention Rh (2019)

15 réponses de 13 pays: Suisse, Pays-Bas, Finlande, Espagne, Italie, Pologne, Danemark, Slovaquie, Irlande, Allemagne, Belgique, Suède et France.

Rh disease prevention: the European Perspective – ISBT Science Series- Toly-Ndour C et al 2021

WHAT DO YOU DO FOR A WOMAN WITH A PARTIAL RH1 ANTIGEN FOR ROUTINE ANTI-RH1 PROPHYLAXIS ?



■ Administration of the same dose of anti-RH1 as RH1 negative women
■ No anti-RH1 administration

Pour les patientes avec un variant D partiel, ou avec un variant D affaibli en l'absence de caractérisation moléculaire, tous les pays ont la même attitude qui est de proposer l'administration d'IgRh à la même dose que pour les patientes D négatif. Mais peu d'éléments de preuve justifie cette pratique.

→ Quelle est l'efficacité de la PAS pour les patientes porteuses d'un variant D partiel ?

Examens du bilan de prévention Rh réalisés au CNRHP

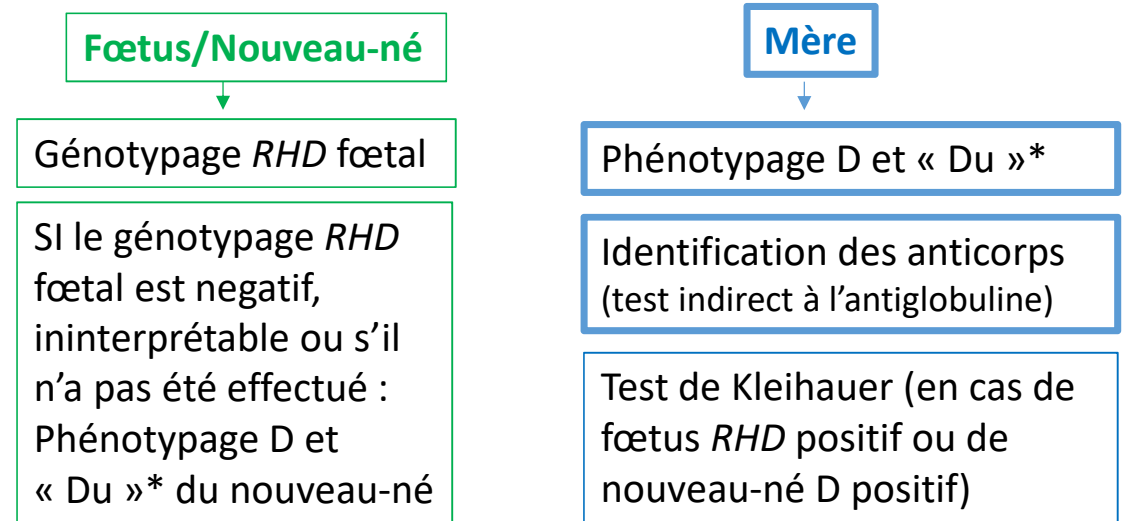
Le laboratoire du CNRHP centralise les prélèvements de 27 maternités d'Ile-De-France pour réaliser leur bilan de prévention Rh du post-partum.

Méthode

Nous avons récupéré les données des prélèvements reçus entre le 1er janvier 2020 et le 31 décembre 2021.

Nous avons regardé:

- Le % de mère avec un variant D
- Et pour les patients qui avaient reçu une PAS, s'il y avait toujours de l'anti-D passif circulant dans le sang maternel au moment de l'accouchement (signe que la dose de 1500 UI (300 µg) avait permis de couvrir tout le 3ème trimestre



**« Du » = recherche d'une expression affaiblie de l'antigène D par une technique de test indirect à l'antiglobuline qui amplifie la réaction d'hémagglutination*

Conseil donné par les biologistes du CNRHP sur la nécessité ou non d'administrer des IgRH à la patiente et d'adapter la dose (1000 UI (200 µg) ou plus)

Resultats : phenotypes D maternels

11609 prélèvements de mères reçus

217 patientes avec un **variant D** trouvé phénotypiquement (**1,9%**)

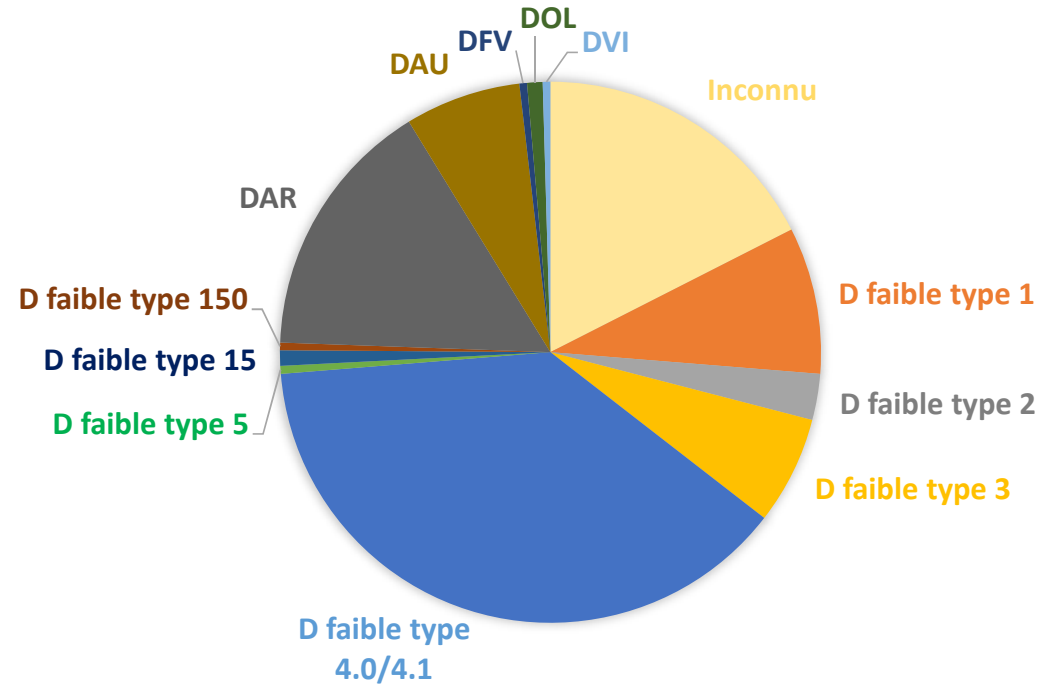
11392 patiente D negative

179 de ces patientes avaient eu leur variant D caractérisé au niveau moléculaire par le laboratoire IHM de l' EFS Henri Mondor

38 de ces patientes avaient un variant non caractérisé ou non identifié au niveau moléculaire

19 D faible type 1 (9%), 6 D faible type 2 (3%), 14 D faible type 3 (6%)
 83 **D faible type 4.0/4.1 (38%)**
 34 **DAR (16%)**, 15 **DAU (7%)**, and 8 variants rares (4%).

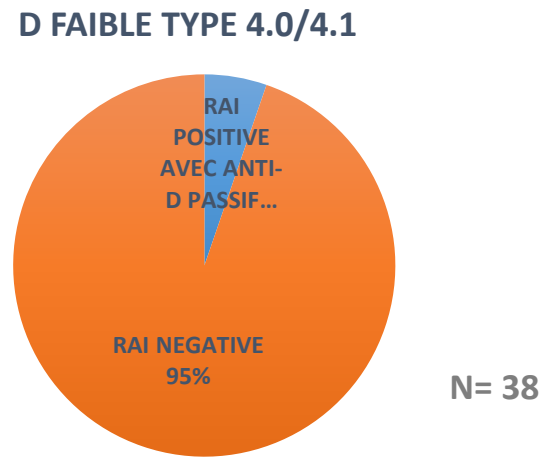
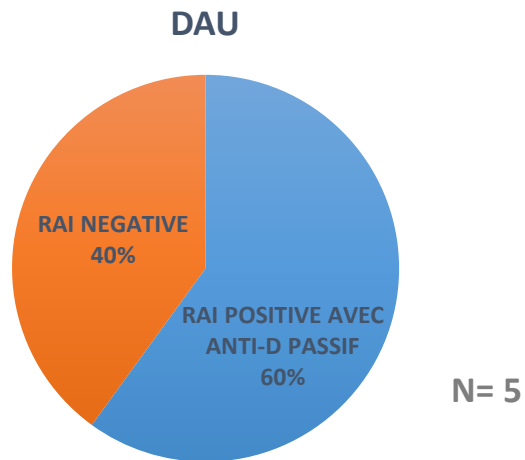
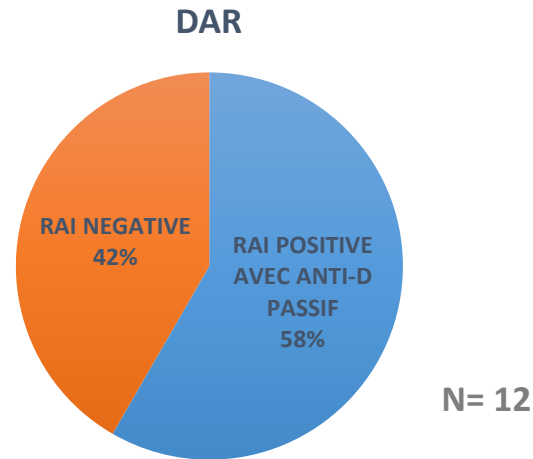
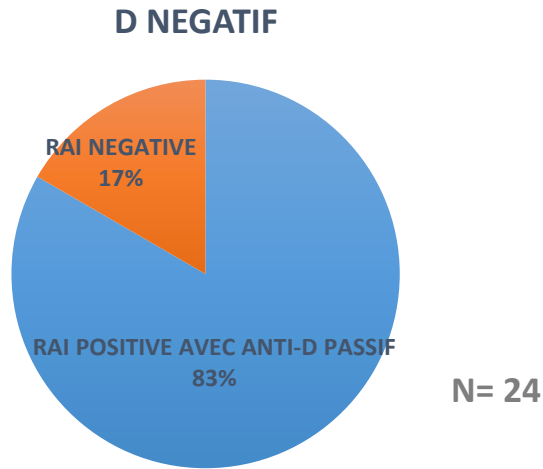
DISTRIBUTION DES ALLELES VARIANT RHD



Le génotypage RHD maternel (caractérisation moléculaire des variants D) a été réalisé avec une combinaison de test (Puces RHD (Bio-Array), PCR temps-réel maison et séquençage Sanger). Ces tests ont été réalisés au laboratoire IHM de l'EFS H MONDOR (Créteil – France)

RAI et identification des anticorps dans le serum maternel à l'accouchement

Pour les patientes avec un fœtus RHD positif ou un nouveau né D positif et ayant reçu uniquement la PAS (pas d'autres injections ciblées ensuite) au 3^{ème} trimestre. (RAI / IAI réalisée en technique immunocapture (test indirect à l'antiglobuline))

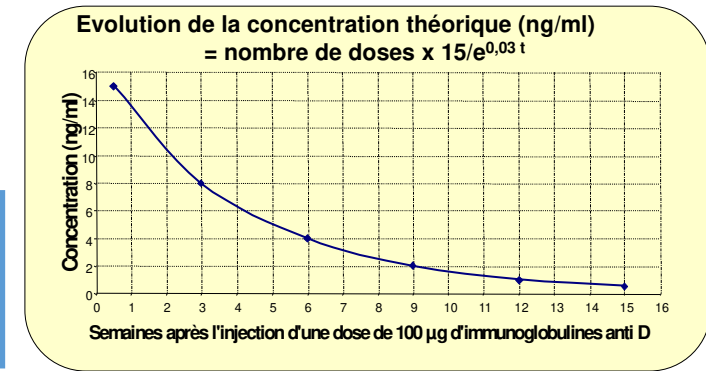


Respectivement 58 % et 60 % des patientes avec un variant DAR ou DAU qui n'ont reçu que la PAS ont des anti-D détectables à la RAI à l'accouchement

Mais cela ne concerne que 5% des patientes avec un D faible type 4

Concentrations plasmatiques théoriques en anti-D après injection d'IgRh (pour les patientes D négatif (RH:-1))

Délai près l'injection	Concentration after 1000 IU (200µg) anti-D administration (IV route)	Concentration after 1500 IU (300µg) anti-D administration (IV route)
48h	30 ng/ml (0,15 UI/ml)	45 ng/ml (0,23 UI/ml)
1 semaine	24 ng/ml (0,12 UI/ml)	36 ng/ml (0,18 UI/ml)
3 semaines	15 ng/ml (0,08 UI/ml)	22,5 ng/ml (0,11 UI/ml)
6 semaines	7,6 ng/ml (0,04 UI/ml)	11,4 ng/ml (0,06 UI/ml)
9 semaines	3,8 ng/ml (0,02 UI/ml)	5,7 ng/ml (0,03 UI/ml)
12 semaines	1,8 ng/ml (0,01 UI/ml)	2,7 ng/ml (0,015 UI/ml)
15 semaines	0,9 ng/ml (0,005 UI/ml)	1,35 ng/ml (0,007 UI/ml)



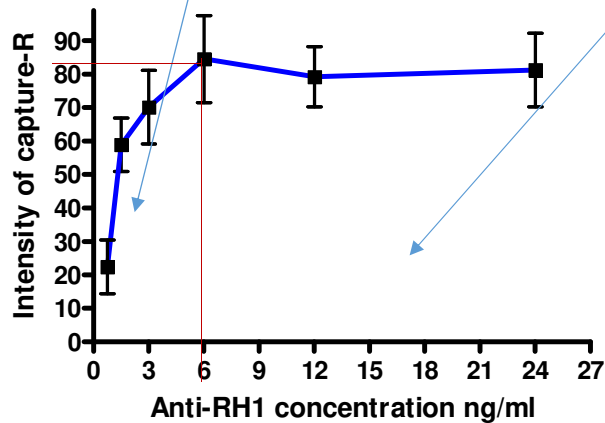
A l'accouchement, à maximum 41 SA, les patients sont à plus de 13 semaines après l'injection de la PAS: **des anti-D passifs sont souvent encore détectables** par les techniques actuelles, mais à faible concentration (la limite de détection en colonne-filtration et en immunocapture étant en général entre 1.5 et 6 ng/ml (0.008 and 0,03 UI/ml))

Anti-D Approche quantitative

En utilisant un étalon anti-D polyclonal de concentration connue, il est possible de déterminer la concentration en anti-D passif au moment de l'accouchement et de voir si elle est comme attendue, plus élevée (immunisation ?) ou plus basse (consommation des IgRh))

La majorité des patientes qui n'ont reçu que la PAS au 3ème trimestre ont des valeurs en intensité d'immunocapture en dessous de celle obtenue avec un étalon de concentration 6 ng/ml

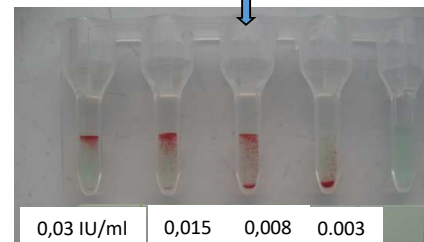
Valeur des puits positifs de l'étalon de 6ng/ml en Immunocapture



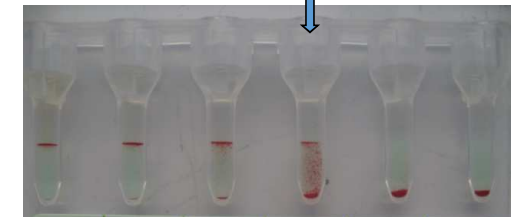
Mailloux A et al, ISBT 2010, Berlin

Pour les patients avec des valeurs plus élevées (du fait d'injection supplémentaire d'IgRh en prophylaxie ciblée au cours du 3ème trimestre), un microtitrage anti-D est réalisé.

Titrage en test indirect à l'antiglobuline en colonne filtration utilisant des hématies D+ papainées et en comparant les réactivités du serum de la patiente avec celles d'un étalon à 24 ng/ml.



STANDARD



SAMPLE

Concentration en Anti-D = Inverse de la dernière dilution réactive de l'échantillon

Concentration de l'étalon dans le puits qui a la même intensité de réaction

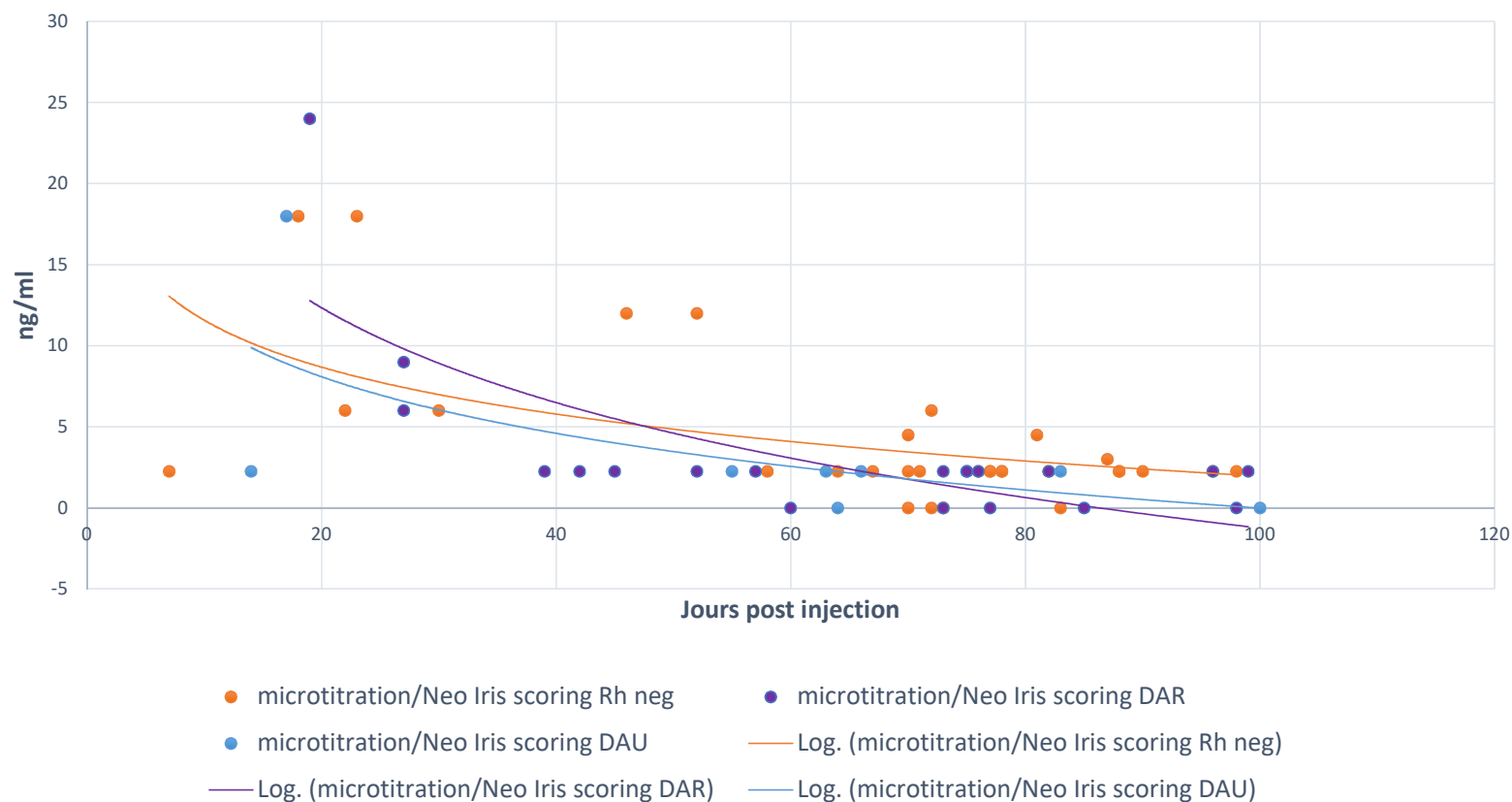
$$8 \times 0,008 = 0.06 \text{ IU/ml (12 ng/ml)}$$

Brossard Y et al, Feuilles de Biologie 2002

Courbes pharmacocinétiques des IgRh en fonction du variant D maternel (1)

Des courbes pharmacocinétiques des concentrations en anti-D ont été établies par régression logarithmique à partir des tests de quantifications effectués à l'accouchement et en considérant la date de la dernière injection d'IgRh.

Pharmacocinétique des IgRH en fonction du variant *RHD*



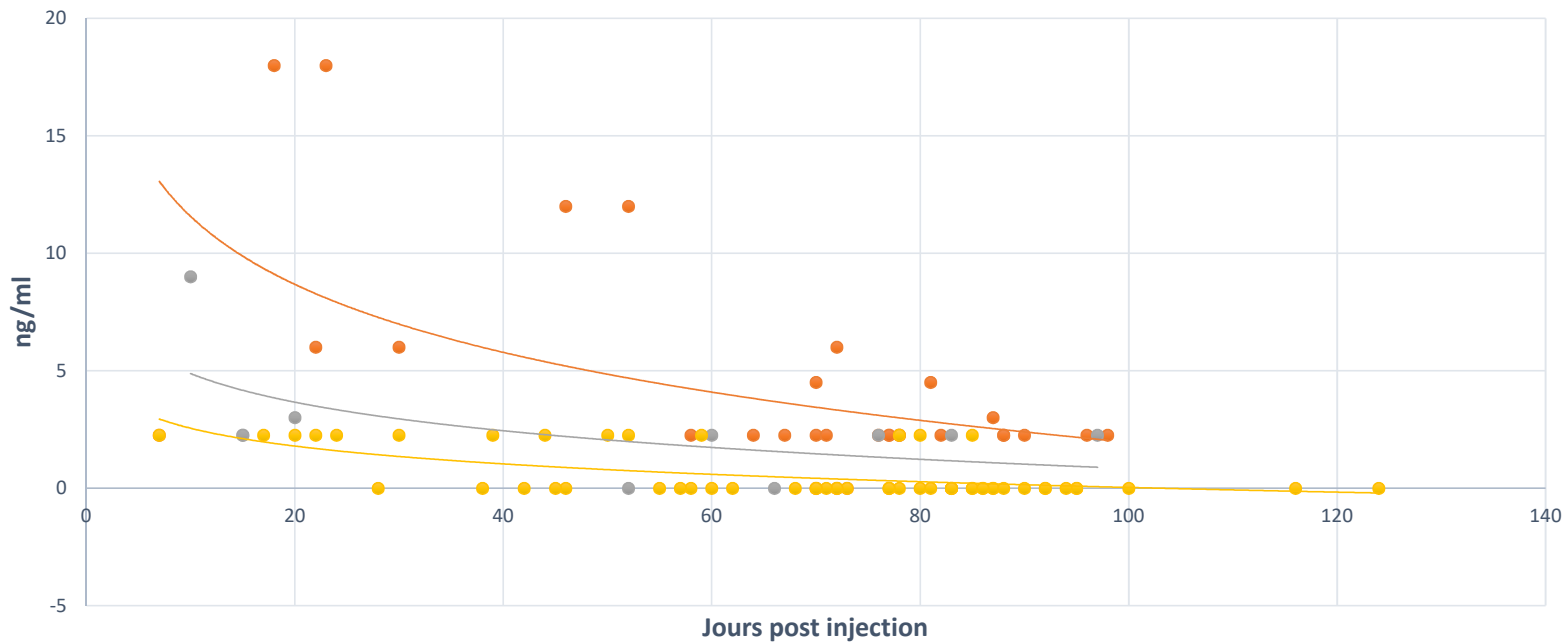
→ Concentrations élevées dans les premières semaines suivant l'injection d'IgRh et diminution progressive des taux pour les patients D négatif et pour celles ayant des variants DAR ou DAU.

Rq: un anti-D avec des intensités < celles de l'étalon 6ng/ml en immunocapture a été considéré comme à 3 ng/ml
Une RAI négative à l'accouchement a été considérée comme 0 ng/ml

Courbes pharmacocinétiques des IgRh en fonction du variant D maternel (1)

Des courbes pharmacocinétiques des concentrations en anti-D ont été établies par régression logarithmique à partir des tests de quantifications effectués à l'accouchement et en considérant la date de la dernière injection d'IgRh.

Pharmacocinétique des IgRh en fonction du variant *RHD*



→ Diminution rapide de la concentration en anti-D dans les jours qui suivent l'injection pour les variants D faible type 1 et D faible type 4.0 / 4.1 comparativement aux contrôles D négatif.

Rq: pour le D faible type 1, les injections d'IgRh avaient été effectuées en l'absence de connaissance ou avant la caractérisation moléculaire du variant.

- microtitration/Neo Iris scoring Rh neg
- microtitration/Neo Iris scoring weak D type 1
- microtitration/Neo Iris scoring weak D type 4
- Log. (microtitration/Neo Iris scoring Rh neg)
- Log. (microtitration/Neo Iris scoring weak D type 1)
- Log. (microtitration/Neo Iris scoring weak D type 4)

Etudes in vitro

Mode opératoire

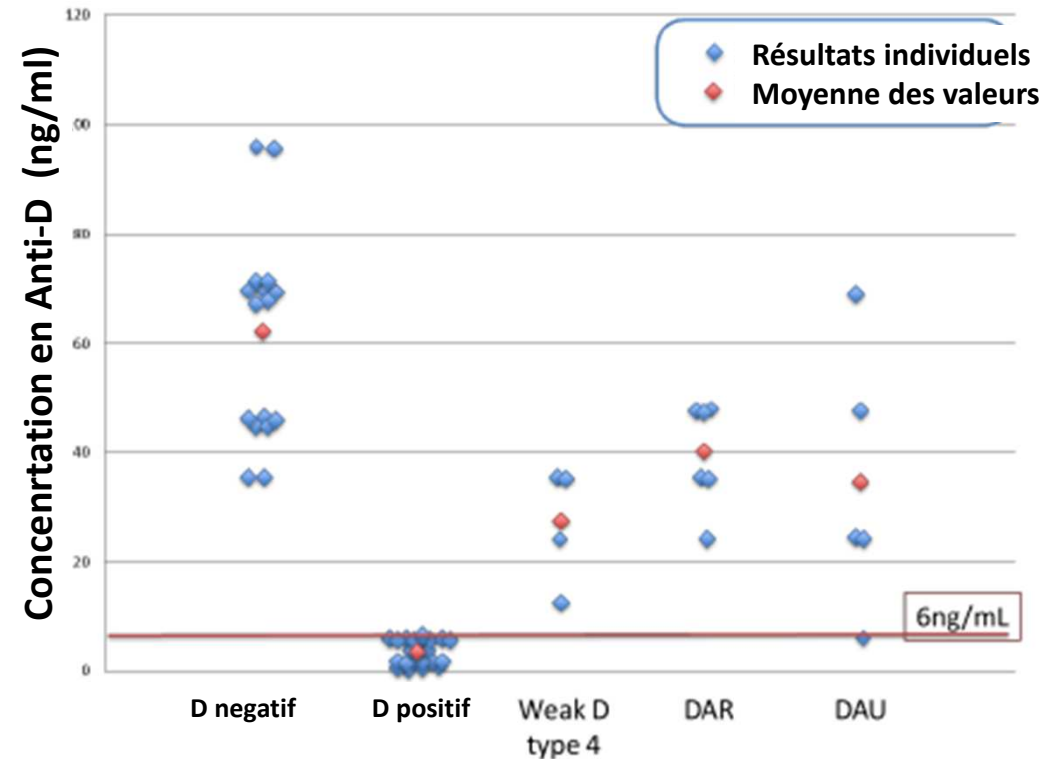
Sang total (1ml) de mère D négatif, D positif ou avec un variant D.

36 ng (0,18 UI) d'IgRh

Incubation 60 min / 37°C

Microtitrage anti-D dans le plasma pour déterminer la proportion d'IgRh libre (disponible)

Anti-D concentration en fonction du statut D



Floch A et al, SFTS 2015, Montpellier

→ Ces résultats concordent avec les résultats observés “in vivo” :

Les patients avec des variants DAR et DAU variants ont des concentration en anti-D plus élevées dans le surnageant comparativement aux patients D faible type 4.0/4.1.



Conclusion et perspectives

- **L'efficacité de la prophylaxie anténatale systématique semble différer selon les variants D.** Elle semble inutile pour les patients avec un variant D faible type 4.0/4.1 (ce qui est en accord avec la récente évolution des recommandations nationales pour ces variants) mais semble utile pour les patients avec un variant DAR ou DAU.
- **Des études complémentaires** sont nécessaires pour confirmer ces résultats sur **plus d'échantillons et plus de variants**. Il sera important de **déterminer la dose efficace d'IgRh** à administrer (probablement supérieure à 1500 UI (300 µg)) et/ou l'intérêt de proposer **un schéma d'injections multiples** au 3ème trimestre pour optimiser la prévention de l'allo-immunisation chez ces patientes.



Laboratoire du CNRHP

Chef de service :
Dr Agnès MAILLOUX

Dr Cécile TOLY-NDOUR

Dr Stéphanie HUGUET-JACQUOT

Dr Faiza BOUSSA-KHETTAB

Dr Hélène DELABY

Dr Jenny BEAUD

Dr Jérôme BABINET

Dr Nassima BOUTARFA

Staff technique



EFS Créteil (Henri MONDOR)

Chef de service
Pr France PIRENNE

Dr Aline FLOCH

Dr Christophe TOURNAMILLE

Vintuya MURALITHARAN

Merci de votre attention 😊

