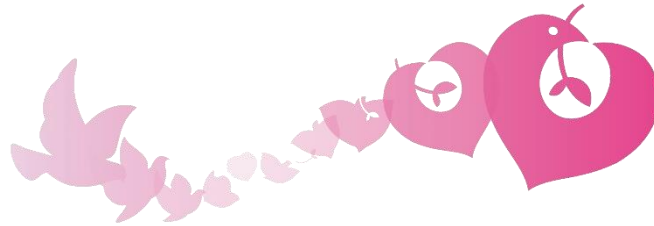




Hôpitaux
Universitaires
Est Parisien

CNRHP
centre national de référence
en hémiobiologie périnatale

ASSISTANCE
PUBLIQUE  HÔPITAUX
DE PARIS



MODALITÉS DE RÉALISATION DES GÉNOTYPAGES NON-INVASIFS DES GROUPES SANGUINS FOETAUX

Agnès Mailloux

UF Biologique et d'Expertise en Immuno-Hématologie Périnatale - CNRHP Pôle
biologie médicale et pathologie

Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien – AP-HP - Paris

Jeudi 8 Septembre 2016

Soirée CNRHP
Hémobiologie Foetale et Néonatale

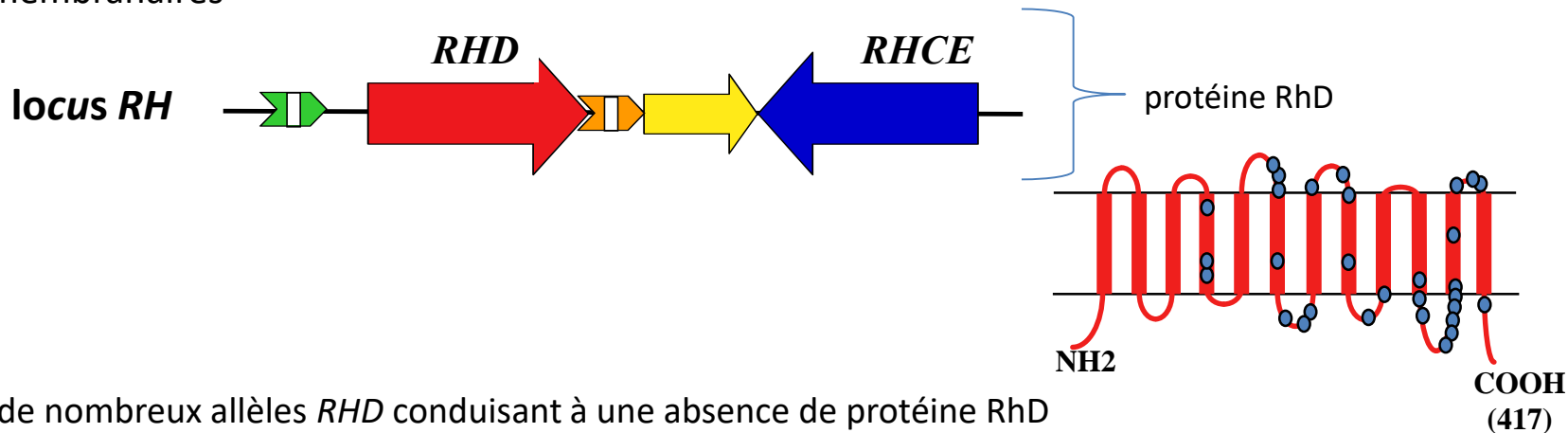
INTRODUCTION

- Génotypage non invasif des groupes sanguins foetaux : outil essentiel proposé dans le suivi IH de la femme enceinte.
- Disponible pour quels types de gènes de groupes sanguins érythrocytaires ?
- A quel terme ?
- Dans quelles indications ?
- Interprétation du résultat

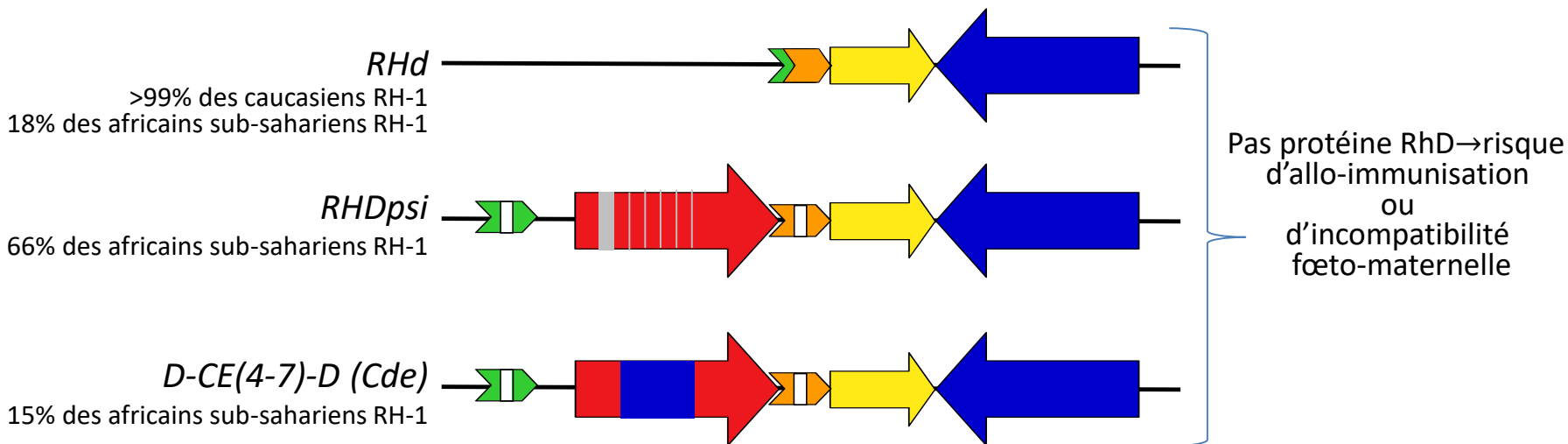
LE GENOTYPAGE *RHD* FOETAL NON INVASIF

GENOTYPAGE *RHD* BASE MOLECULAIRE

- Le locus *RH* s'étend sur 450kb et contient les gènes *RHD* et *RHCE* (10 exons/10 introns) orientés en tandem inversé et séparés par *SMP1*
Le gène *RHD* code pour une protéines de surface non glycosylée comportant 12 domaines transmembranaires



- Existe de nombreux allèles *RHD* conduisant à une absence de protéine RhD

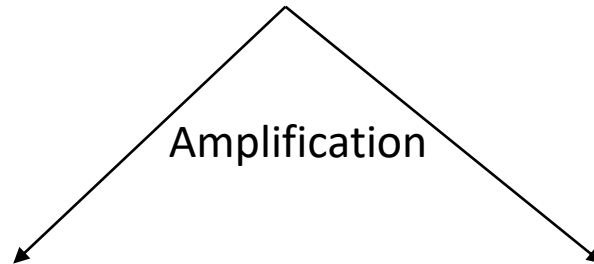


GENOTYPAGE *RHD*

PRINCIPE

AMPLIFICATION DE SEQUENCES *RHD* FOETALES

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



Amplification positive

1-tardive

FCETUS RHESUS *RHD* POSITIF

Car : ABSENCE DE SEQUENCE DU GENE

***RHD* CHEZ LA MERE RH-1**

2-précoce

MERE POSSEDANT UN ALLELE *RHD*

SILENCIEUX

Amplification négative

FCETUS RHESUS *RHD* NEGATIF

(diagnostic par défaut)

GENOTYPAGE FOETAL RHD REALISATION

I- Test basé sur

1-l'utilisation du **Free DNA fetal kit RHD®** kit de l'institut Jacques Boy contenant des témoins négatifs et positifs (CQI) et qui permet l'amplification de

3 exons *RHD* : 5, 7 et 10

1 ADN traceur (maïs) qui valide l'étape d'extraction

Rouillac-Le Sciellour et al, TCB, 2007

2-l'utilisation d'un témoin positif fabriqué maison (CQI) qui reflète le signal d'amplification foetal

3-Amplification d'un exon supplémentaire pour les patientes possédant un allèle *RHDψ* :
l'exon ***RhD* exon 6**

Finning et al, Transfusion, 2002

4-Si le signal d'amplification est d'origine maternel, extraction d'ADN maternel et amplification du gène *RHD* pour distinguer les différents allèles silencieux *RHD*

II-Pour prévenir le risque de faux négatif, tous les examens trouvés négatifs sont confirmés sur un second prélèvement

GENOTYPAGE FOETAL *RHD* NON INVASIF EN PRATIQUE

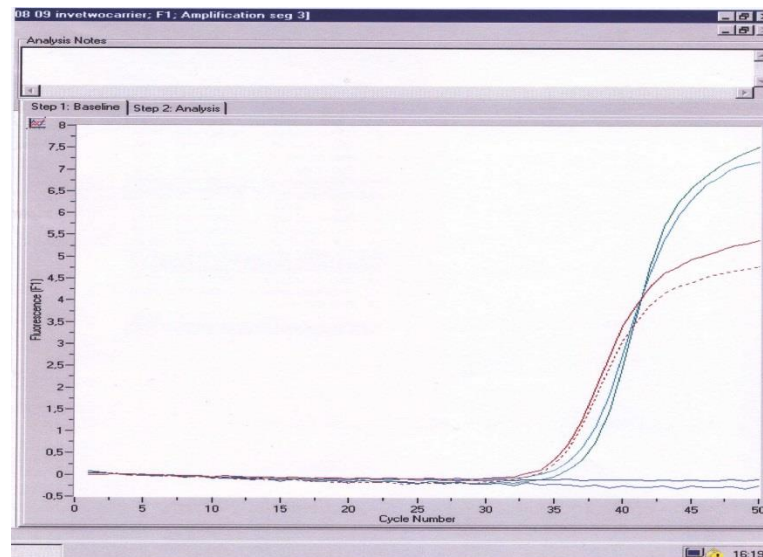
- Amplification par PCR des séquences spécifiques du gène *RHD* :

- **EXON 10** (*plus sensible mais moins spécifique*)

- **EXON 7** (*plus spécifique mais moins sensible*)

- **EXON 5** (permet l'exclusion d'un maximum de variants silencieux du gène *RHD*)

- Les 3 amplifications distinctes permettant d'augmenter la sensibilité du test et détecter un maximum de variant *RHD*



GENOTYPAGE *RHD* FOETAL

INDICATIONS

Femme immunisée
anti-*RH1*

Réalisation à partir de 12 SA

Foetus *RHD+*

Foetus *RHD-*

Incompatibilité
fœto-maternelle
légitime

surveillance lourde

exemption de
surveillance

Besoins:

- certitude des positifs
- certitude des négatifs
- diagnostic précoce

Femme *RH1* négatif non-immunisée

Avant amniocentèse

Réalisation 8-15 jours avant
le geste

Foetus *RHD+*

Foetus *RHD-*

injection IgRH
aussitôt après
amniocentèse

évite injection
d'IgRH

Prophylaxie systématique de
la 28^{ème} semaine

Réalisation avant 26 SA

Foetus *RHD+*

Foetus *RHD-*

injection
IgRH à 28 SA

exemption de
prévention et
surveillance
(40%)

Besoins:

- certitude des négatifs
- diagnostic avant 26SA

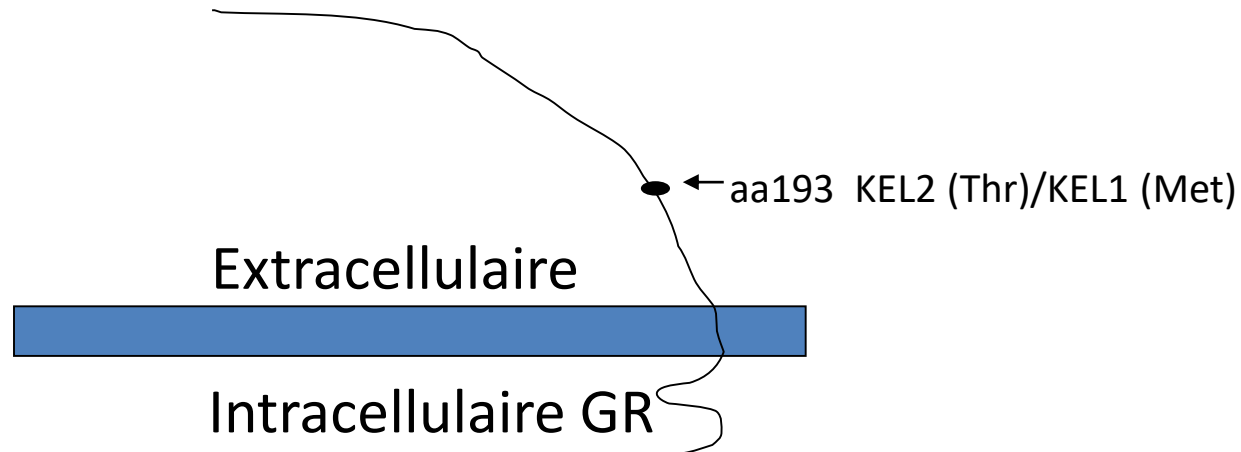
LE GENOTYPAGE *KEL1* FOETAL NON INVASIF

GENOTYPAGE KEL1

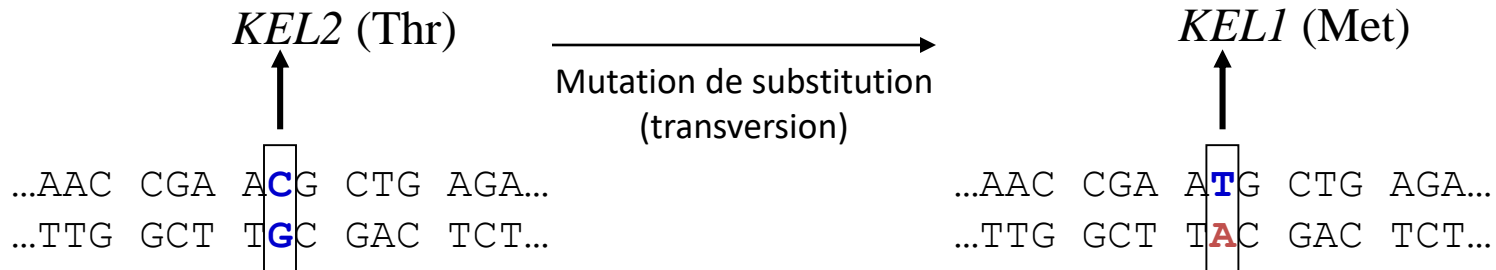
BASE MOLECULAIRE

-Gène *KEL* est constitué de 19 exons et 19 introns et code pour glycoprotéine transmembranaire (23 antigènes)

KEL1 (K=Kell) et KEL2 (k=Cellano)



-aa 193 est codé par l'exon 6



GENOTYPAGE *KEL1* FOETAL

INDICATION

**Femme immunisée
anti-*KEL1***

- Risque d'anémie foétale sévère fonction du titre de l'anticorps anti-*KEL1* maternel et l'âge gestationnel : risque d'anémie foétale sévère dès 16 SA
- Surveillance clinique spécifique démarrée à partir d'un titre supérieur au 1/32 (50 % des patientes)

- Réalisation à partir de 13 SA
- Proposé lorsque titre en anti-*KEL1* > au 1/32
- Conjoint hétérozygote *KEL1/KEL2*

Fœtus *KEL1* +

**Incompatibilité foeto-
maternelle**

légitime surveillance
lourde

Fœtus *KEL1* -

exemption de
surveillance

Besoins:

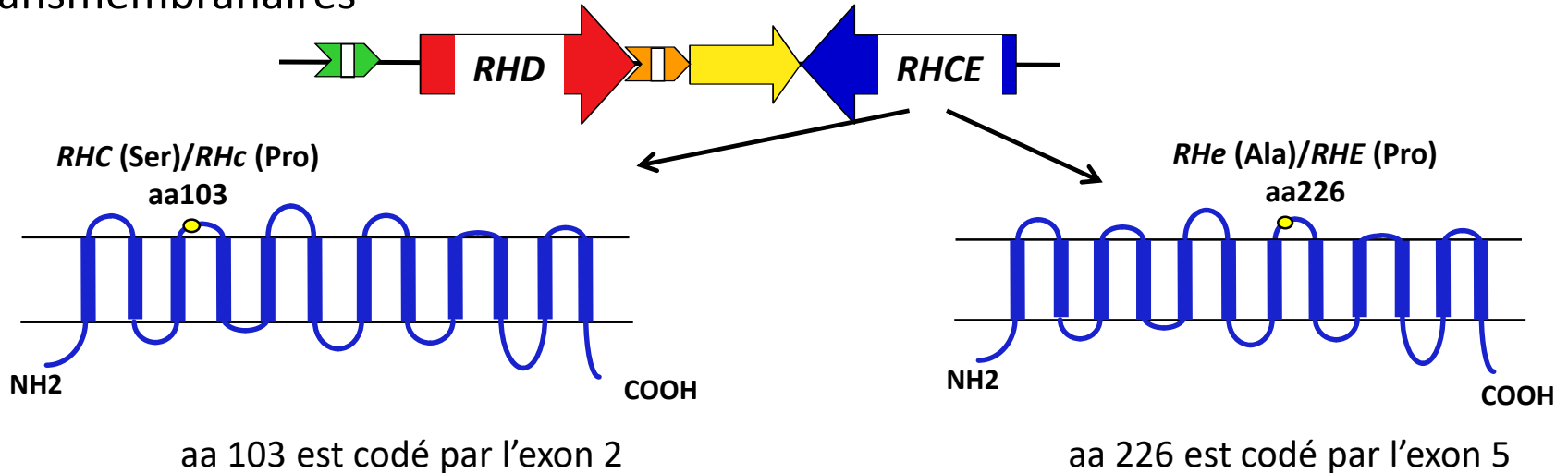
- certitude des positifs
- certitude des négatifs
- diagnostic précoce

LE GENOTYPAGE *RHc* et *RHE* FOETAL NON INVASIF

GENOTYPAGE *RHc* et *RHE*

BASE MOLECULAIRE

Le gène *RHCE* code pour 4 allèles majeurs *RHce*, *RHcE*, *RHCe* et *RHCE* code pour une protéines de surface non glycosylée comportant 12 domaines transmembranaires



RHC (Ser) ...TTC CCT **C**CT GGG AGG...
...AAG GGA **G**GA CCC TCC...

RHe (Ala) ...AAC TCT **G**CT CTG CTG...
...TTG AGA **C**GA GAC GAC...

Mutation de substitution

RHc (Pro) ...TTC CCT **T**CT GGG AGG...
...AAG GGA **A**GA CCC TCC...

RHE (Pro) ...AAC TCT **C**CT CTG CTG...
...TTG AGA **G**GA GAC GAC...

GENOTYPAGE *RHc* FOETAL

INDICATION

**Femme immunisée
anti-RH4 (anti-c)**



350 patientes/an suivies au CNRHP pour immunisation anti-RH4

100 patientes avec des taux > à 500 UCHP/ ml (seuil de déclenchement d'une surveillance spécifique)

50 patientes avec des taux > à 1000 UCHP/ml (immunisation sévère)

- Réalisation à partir de 13 SA
- Proposé quelque soit la concentration en anticorps car risque de réactivation
- Conjoint hétérozygote RH2/RH4 (45%)

Fœtus *RHc* +

Fœtus *RHc*-

Incompatibilité foeto-maternelle

exemption de surveillance

légitime surveillance lourde

Besoins:

- certitude des positifs
- certitude des négatifs
- diagnostic précoce

GENOTYPAGE *RHE* FOETAL

INDICATION

**Femme immunisée
anti-RH3 (anti-E)**

Risque rare d'anémie fœtale sévère
Essentiellement au 3eme trimestre de la
grossesse



- Réalisation à partir de 13 SA
- Proposé pour des taux importants en anticorps > à 500 UCHP/ml conjoint hétérozygote RH3/RH5

Fœtus *RHE* +

**Incompatibilité fœto-
maternelle**
légitime surveillance

Fœtus *RHE* -

exemption de
surveillance

Besoins:

- certitude des positifs
- certitude des négatifs
- diagnostic précoce

CONCLUSION

- Intégration des génotypages de groupes sanguins fœtaux dans le suivi IH de la femme enceinte.
- Outil essentiel sur le plan médical chez des femmes enceintes RH1 négatif non immunisées pour préciser, de façon certaine, l'existence d'un risque d'immunisation au cours de la grossesse.
« Conséquences pratiques sur l'immunoprophylaxie au cours de la grossesse, à propos de cas cliniques du CNRHP »
- Dans les allo-immunisations avérées anti-RH1, KEL1, RH3 et RH4 la connaissance du génotype fœtal permet de faire le diagnostic d'incompatibilité foeto-maternelle
« Valeur ajoutée du génotypage RHD fœtal non-invasif dans la prise en charge des grossesses compliquées d'une allo-immunisation érythrocytaire »

REMERCIEMENTS

Dr Yves BROSSARD

UF biologie CNRHP

Nelly Da-Silva

Dr S. HUGUET-JACQUOT

Dr C. TOLY-NDOUR

Olivier OUDIN

Priscilla SAULET

Martine OGER

Pôle biologie médicale et pathologie : Dr M. VAUBOURDOLLE

UF clinique CNRHP

Dr A. CORTEY

Dr F. PERNOT

Dr E. MAISONNEUVE

Pauline THOMAS

Dr S. FRISZER

Pr J.M. JOUANNIC

Pôle de périnatalité : Pr D. MITANCHEZ

Collaborations

Christelle ROUILLAC-LE SCIELLOUR

Institut de
BIOTECHNOLOGIES
Jacques Boy

Dr Marc MENU

