

Journée Yves Brossard

d'hémobiologie fœtale et néonatale

« 10 ans du CNRHP et de progrès en hémobiologie périnatale »

Vendredi 16 janvier 2015

HISTORIQUE ET ACTUALITE SUR LES OUTILS BIOLOGIQUES POUR LE DIAGNOSTIC ET LE SUIVI DES INCOMPATIBILITES FOETO-MATERNELLES

Stéphanie HUGUET-JACQUOT

UF Biologique et d'Expertise en Immuno-Hématologie Périnatale - CNRHP

Pôle biologie médicale et pathologie

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



Hôpitaux
Universitaires
Est Parisien

DIAGNOSTIC-SUIVI BIOLOGIQUE

ALLO-ANTICORPS COURANTS ET RISQUE D'ANEMIE FOETALE

Spécificité (nomenclature traditionnelle)	Spécificité (nomenclature numérique)	Risque d'anémie foetale	Maladie hémolytique néonatale
Anti-D	Anti-RH1	OUI après 15 SA	OUI
Anti-Kell	Anti-KEL1	OUI après 15 SA	OUI
Anti-c	Anti-RH4	OUI après 20 SA	OUI
Anti-E	Anti-RH3	RARE (3ème trimestre)	OUI
Anti-e	Anti-RH5	Exceptionnel	OUI
Anti-Fya	Anti-FY1	Exceptionnel	OUI
Anti-Jka	Anti-JK1	Exceptionnel	OUI
Anti-Kpa	Anti-KEL3	Exceptionnel	OUI
Anti-M	Anti-MNS1	Exceptionnel	OUI

DIAGNOSTIC-SUIVI BIOLOGIQUES

Paramètres de l'anticorps influençant le risque hémolytique

⇒ **Sa spécificité** : *déterminée par la RAI + IAI*

⇒ **Affinité** : différente selon la spécificité

donnée par le titrage en Coombs indirect sur hématies tests natives

⇒ **Concentration** : très grande variation (*de 1 ng/ml à 100 µg/ml*)

déterminée / dosage pondéral ou approchée / titrage

⇒ **Pouvoir d'activation des récepteurs Fc** :

fonction de la sous-classe IgG₁ ou IgG₃ et de la glycosylation Fcγ

déterminée par des tests fonctionnels (type ADCC)



TECHNIQUES DE QUANTIFICATION DES ANTICORPS UTILISEES AU CNRHP



I- LA TECHNIQUE DE TITRAGE

DIAGNOSTIC-SUIVI BIOLOGIQUE

Titration des anticorps

- Titration en technique de Coombs indirect en tube en milieu de force ionique normale à 37°C:
 - Test indirect à l'antiglobuline
 - hématies tests normales
 - lecture macroscopique des agglutinats → score
- Lecture directe : **IgM**
- Addition de l'anti-IgG : lecture en test indirect à l'antiglobuline
- Réalisation en parallèle d'un témoin titration
- Titration comparatif / sérum précédent
 - ☞ **Reflet de la concentration et de l'affinité de l'anticorps**

Titration tube et titration en support solide :

Difficultés de corrélation

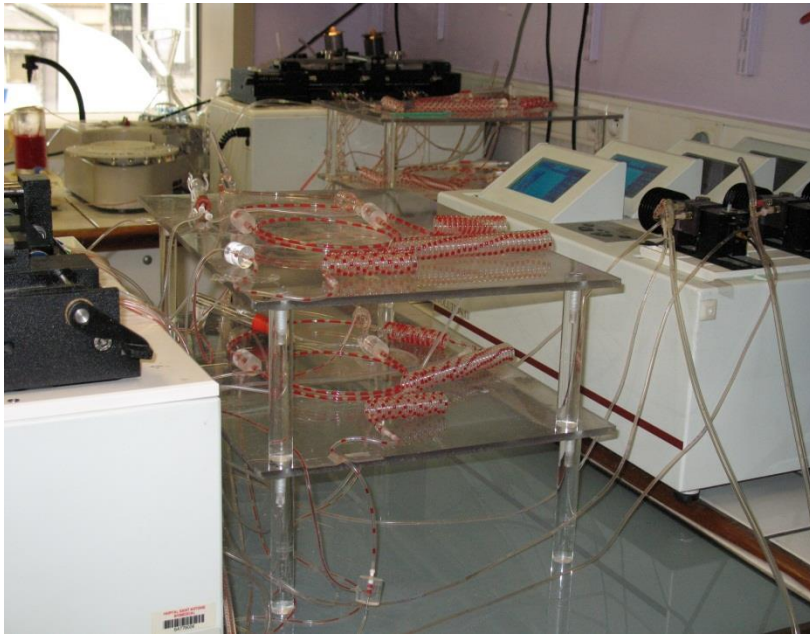
Spécificité des anticorps	Nombre de spécimens	Nombre de dilution d'écart pour la technique gel par rapport à la technique tube		
		Minimum	Maximum	Moyenne
Anti-RH1	65	0	+ 6	+3
Anti-RH1+RH2	31	0	+ 4	+3
Anti-RH1+RH2+RH3	3	0	+ 4	
Anti-RH3	22	0	+ 5	+ 2
Anti-RH4	10	0	+ 6	+ 2
Anti-RH5	2	0	+ 4	
Anti-RH8	2	0	+ 1	
Anti-KEL1	7 (titre < 1/64)	0	- 3	- 2
	3 (titre > 1/64)	0	+ 3	
Anti-FY1	1	0	+ 1	
Anti-JK1	4	0	- 4	- 2
Anti-MNS1	8	0	- 3	- 2
Anti-MNS3	1	+ 1	+ 2	
Anti-MNS5	2	+ 3	+ 4	

Grande dispersion des résultats quelque soit le titre.

Utilisation du support gel augmente de façon peu reproductible le titre des Ac.

SAUF **Anti-KEL1**, **anti-MNS1**, **anti-JK1** : titres en support gel < titrage tube.

II- LA TECHNIQUE DE DOSAGE PONDERAL



DIAGNOSTIC-SUIVI BIOLOGIQUE

Dosage pondéral des anticorps

anti-RH1, anti-RH4, Anti-RH3, anti-RH5, Anti-RH2, anti-public

☞ Dosage précis de la concentration en anticorps

☹ Technique lourde

CV de la technique : 5 % à 20 %

AutoAnalyzer : depuis les années 70 – Technicon®
2000 – Alliance®
2014 – Astoria® en cours de validation

Variante 2 temps : hématies tests traitées au préalable par broméline : haut rendement de fixation (résultat proche de la concentration réelle)

Variante 1 temps : broméline introduite directement dans le circuit, destruction des IgG₃ (dosage des IgG₁ de haute affinité).

Les autres techniques de quantification des anticorps

➤ ADCC test de cytotoxicité dépendante de l'Ac (abandonné) :

Tests fonctionnels cellulaires in vitro : Mesure de la capacité des anticorps à induire une lyse ou une phagocytose des GR sur lesquels ils se sont fixés.

Technique lourde avec radioélément (^{51}Cr).

Utilisable pour tout type d'anticorps.

➤ ELISA (en cours de mise au point) :

Technique rapide, sensible, spécifique et reproductible.

Mesure de la capacité totale de fixation des anticorps sur leur cible.

Zone de mesure intéressante entre 24 ng et 100 ng où microtitrage et dosage pondéral peu précis.

Utilisable pour les anti-KEL1.

➤ Cytométrie en flux (perspective) :

Courbe d'étalonnage avec anti-RH1 standard

Marquage indirect : RBC + anti-RH1 à doser + Ac anti-IgG humaine couplé à la FITC

Etude des sous classes avec anticorps anti-IgG₁, anti-IgG₃



III- LA TECHNIQUE DE MICROTITRAGE DES ANTI-RH1

**Mise en place en 1999 au CNRHP
Automatisée depuis 2007**

MICROTITRAGE ANTI-RH1

Hémagglutination en support gel pour le dosage des faibles taux en anti-RH1 grâce à une gamme d'un standard anti-RH1.

Technique adaptée à la **prophylaxie Rhésus** et au dosage des anti-RH1 passif

EST-CE QUE LA QUANTITE D'ANTICORPS EST SUFFISANTE POUR PROTEGER D'UNE IMMUNISATION ANTI-RH1 ?

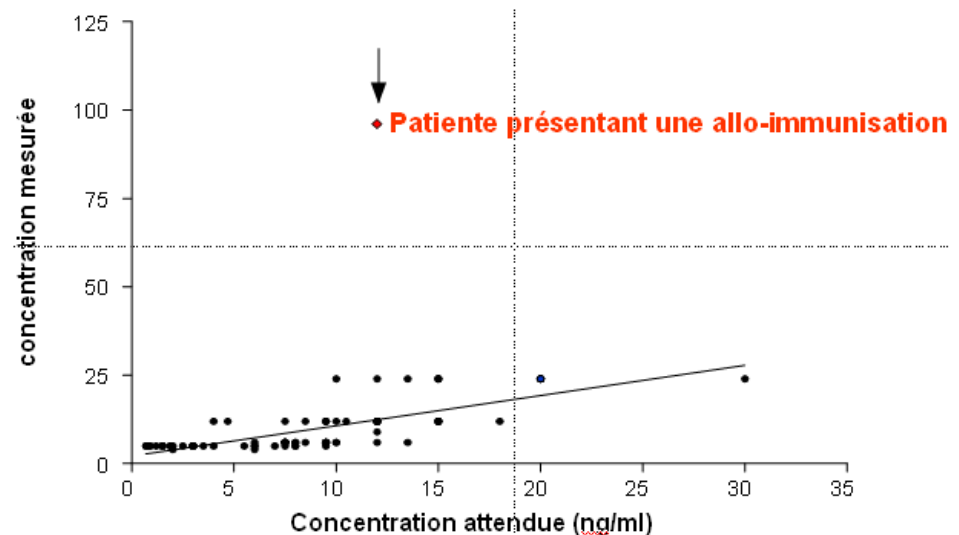
Apport IgG anti-RH1 \geq à 20 $\mu\text{g/ml}$ GR RH:1 \rightarrow efficacité 100%

PIEGE DES ANTI-RH1 :

Confusion

anti-RH1 passif / anti-RH1 immun

$\mu\text{T} \geq 24\text{ng/ml} \rightarrow$ Dosage pondéral



CNRHp

ASSISTANCE
PUBLIQUE  HÔPITAUX
DE PARIS

 Hôpitaux
Universitaires
Est Parisien
• Saint-Antoine • Rothschild
• Trousseau La Roche-Guyon • Tenon

IV- LES TECHNIQUES DE GENOTYPAGE FOETAL

DIAGNOSTIC-SUIVI BIOLOGIQUES

le génotypage fœtal par PCR

INVASIF

Liquide amniotique, villosités choriales, biopsie de trophoblastes : *RHD, RHc, RHE, KEL1...*

Indications : *immunisations sévères anti-KEL1 ou anti-RH4 avec géniteur hétérozygote*

NON INVASIF

Sang maternel (ADN plasmatique) :
RH1 (2004), KEL1 (2010), RH4 (2014, validation en cours)

Indications : *toutes immunisations anti-RH1 ou anti-KEL1 avec géniteur RH1 ou KEL1 positif*



DIAGNOSTIC ET SUIVI BIOLOGIQUE

des allo-immunisations anti-
érythrocytaires chez la femme enceinte

EN PRATIQUE

DIAGNOSTIC-SUIVI BIOLOGIQUE

Schéma de Titrage- Dosage

	Anti-RH1	Anti-RH4	Anti-Kell	Anti-RH3
Dosage pondéral de base à partir d'un titre :	$\geq 1/8$	$\geq 1/4$	NON	$\geq 1/8$
Réactivation	Fréquente tous les trimestres	Fréquente tous les trimestres	Rare 3 ^{ème} trimestre	Rare 3 ^{ème} trimestre
Fréquence des dosages	2 sem	2 à 4 sem	Tous les mois	6 ^è , 7 ^è et 8 ^è mois
Taux critiques	250 UCHP	500 UCHP titre $\geq 1/4$	1/32	700 UCHP titre $\geq 1/8$

Grossesse avec allo-immunisation

Schéma de prise en charge

Identification = Anti-RH1 ou anti-RH4 ou anti-KEL1 ou anti-RH3

Génotypage fœtal invasif ou non invasif
Phénotypage du conjoint

Titrage ± Dosage

négatif

positif

Surveillance levée

< Taux critiques

> Taux critiques

- Surveillance échographique standard
- Titrage ± dosage toutes les 2 à 4 semaines

- Surveillance hebdomadaire écho +
vélocimétrie doppler
- Titrage ± dosage tous les 15 jours

Bilan d'incompatibilité fœto-maternelle chez le nouveau-né

Remerciements

Dr Yves BROSSARD

UF clinique CNRHP

Dr A. CORTEY

Dr E. MAISONNEUVE

Pauline THOMAS

Pr. B. CARBONNE

Pr J.M. JOUANNIC

Pôle de périnatalité : Pr D. MITANCHEZ



UF biologie CNRHP

Dr A. MAILLOUX

Dr C. TOLY-NDOUR

Equipe technique

Pôle biologie médicale et pathologie :

Dr M. VAUBOURDOLLE



Hôpitaux
Universitaires
Est Parisien