

Le génotypage *RHD* fœtal non invasif

H. DELABYFEKKAR, N. DA SILVA, S. HUGUET-JACQUOT,
C. TOLY-NDOUR, J. BEAUD, A. MAILLOUX *

RÉSUMÉ

Le génotypage *RHD* fœtal, réalisé aujourd'hui à partir du sang maternel et non plus uniquement du liquide amniotique, est un examen de biologie moléculaire dorénavant proposé systématiquement à toutes les femmes de phénotype RH:-1. Susceptible d'être déterminé par PCR (en temps réel ou digitale) ou par spectrométrie de masse, il a révolutionné la prise en charge clinique de ces femmes, qu'elles soient immunisées ou non.

MOTS-CLÉS : génotypage *RHD*, prophylaxie, prévention, maladie hémolytique du nouveau-né.

I. - INTRODUCTION

Le génotypage *RHD* fœtal peut être établi, depuis les années 2000, de manière non invasive à partir d'un échantillon de sang maternel et non plus uniquement à partir du liquide amniotique. Inscrite à la nomenclature des actes de biologie médicale et remboursée par l'Assurance maladie depuis juillet 2017, cette analyse est aujourd'hui proposée systématiquement chez toute femme RH:-1, modifiant ainsi le schéma de prise en charge de la grossesse, que celle-ci présente ou non une allo-immunisation anti-RH1. Dans cet article de revue sont décrits, après une présentation du contexte clinique dans lequel cet examen biologique est prescrit, les bases moléculaires du génotypage *RHD*, les différentes approches analytiques actuellement envisageables, l'interprétation de l'analyse et son intérêt pour le suivi de la femme enceinte.

II. - CONTEXTE CLINIQUE DE RÉALISATION

A) Les incompatibilités fœto-maternelles

Les incompatibilités fœto-maternelles concernent 1 à 2 grossesses pour 1 000 (1). Cinquante % d'entre elles impliquent des anticorps dirigés contre des antigènes d'autres systèmes que le système ABO. Leur expression clinique varie en fonction du type d'anticorps et peut se manifester *in utero* ou à la naissance. Parmi ces incompatibilités, celle liée à un anticorps anti-RH1 (« anti-D ») est la plus fréquente, suivie par celles mettant en jeu les anticorps anti-RH4 (« anti-c »)

* Unité fonctionnelle biologique et d'expertise en Immuno-Hématologie Périnatale, Centre national de référence en hémobiologie périnatale (CNRHP), Hôpital Saint-Antoine, 75012 Paris.

et anti-KEL1 (« anti-Kell »). Comparées aux incompatibilités fœto-maternelles liées au système ABO, elles sont cliniquement plus graves.

Quinze % de la population caucasienne est de phénotype RH:-1. Il est important de souligner que parmi les antigènes exposés à la surface de l'hématie, l'antigène RhD est le plus immunogène après ceux du système HLA : il est donc responsable plus fréquemment d'immunisation en cas d'introduction de globules rouges par transfusion ou grossesse chez un sujet qui en est dépourvu.

En cas d'incompatibilité fœto-maternelle, l'anti-RH1 est responsable, à une concentration élevée, d'une anémie fœtale sévère précocement au cours de la grossesse ; elle peut évoluer en anasarque fœto-placentaire conduisant à la mort fœtale en l'absence de transfusion *in utero*. Ainsi, il est recommandé de quantifier la concentration de cet anticorps, tous les 15 jours à partir de 18 semaines d'aménorrhée (SA) (2), afin de déterminer le suivi clinique approprié en fonction de son titrage et dosage pondéral. Quand le seuil établi de risque d'anémie fœtale sévère est dépassé, soit 1 g/mL, un suivi clinique rapproché par une échographie hebdomadaire avec mesure de la vitesse systolique maximale de l'artère cérébrale moyenne fœtale (Doppler) est instauré afin de détecter une anémie fœtale sévère. L'accélération de celle-ci signe l'existence d'une anémie fœtale sévère qui soulève l'indication d'une transfusion sanguine. Celle-ci est posée *in utero* jusqu'à 32 SA pour l'équipe clinique du Centre national de référence en hématologie périnatale (CNRHP). Parmi les 815 transfusions *in utero* réalisées en France entre 2011 et 2014, 53 % étaient liées à une allo-immunisation anti-RH1, 8 % à une immunisation anti-KEL1 et 3 % à une immunisation anti-RH4 (3).

Durant la période postnatale, deux complications majeures liées à la destruction des hématies fœtales par les anticorps maternels sont redoutées : l'anémie et l'hyperbilirubinémie consécutives à l'hémolyse. En effet, du fait de l'immaturité hépatique du nouveau-né, la majeure partie de la bilirubine libérée n'est pas conjuguée à l'acide glucuronique et la bilirubine libre est neuro-toxique par fixation sur les noyaux gris centraux. La mise en place précoce de la photothérapie est alors nécessaire afin de dégrader la bilirubine. Des exsanguino-transfusions sont effectuées dans les cas les plus graves.

B) Prophylaxie chez les femmes non immunisées

Compte-tenu des répercussions de l'allo-immunisation anti-RH1, il est recommandé depuis les années 1970 d'injecter des immunoglobulines anti-D en *post-partum*. Il est également préconisé d'injecter des immunoglobulines anti-D pendant la grossesse de

façon ciblée pour tout événement potentiellement immunisant (choc, métrorragies...). La dose administrée doit être alors adaptée au résultat du test de quantification de l'hémorragie fœto-maternelle. Cette prophylaxie a permis de diminuer très largement le nombre de patientes allo-immunisées (4). Depuis 2005, une prophylaxie systématique des femmes enceintes RH:-1 est également préconisée. Le choix d'une administration à 28 SA est notamment justifié par l'existence de micro-passages physiologiques d'hématies fœtales dans la circulation maternelle au cours du troisième trimestre de la grossesse (5). Cependant, pour environ 40 % d'entre elles, il n'y a aucun risque d'allo-immunisation car le fœtus est également de phénotype RH:-1. Chez ces femmes, cette prescription, en plus d'être inutile et coûteuse, les expose à des risques liés à l'utilisation de médicaments dérivés du sang (6).

La Haute Autorité de santé (HAS) (7) avait émis, dès 2011, des recommandations pour la réalisation du génotypage fœtal *RHD* non invasif systématiquement chez toutes les femmes RH:-1 enceintes de conjoints RH:1, immunisées ou non, afin de concentrer les efforts de surveillance et de prévention chez les femmes le nécessitant. Une étude médico-économique multicentrique, nationale et prospective (Geniferh – 850 patientes incluses – Programme de Soutien aux Techniques Innovantes et Coûteuses), conduite à l'initiative de l'Unité Fonctionnelle de biologie du CNRHP avait démontré la pertinence de cette stratégie en termes de rapport coût/efficacité. Une meilleure compliance à la prévention était notamment obtenue dans le groupe ayant bénéficié du génotypage (8). Ces recommandations étaient aussi formulées pour les patientes RH:P1 (ou RH1 partiels), c'est-à-dire celles dépourvues d'une partie de l'antigène RhD et donc susceptibles de s'immuniser contre la partie de l'antigène faisant défaut si le fœtus ou le nouveau-né possède un antigène RhD sauvage.

C) Suivi clinique des femmes immunisées

Jusqu'en 2000, le suivi des grossesses de femmes immunisées contre l'antigène RhD était conséquent car elles étaient considérées, par défaut, comme étant incompatibles avec leur fœtus, ou bien l'incompatibilité était diagnostiquée par une méthode invasive (génotypage à partir du liquide amniotique). Or, comme pour les femmes non allo-immunisées, une partie de ces grossesses ne nécessitent pas un suivi différent des grossesses normales puisque le fœtus est de phénotype RH:-1, donc « phénocompatible ».

III. - GÈNES *RHD* ET *RHCE*

Les gènes *RHD* et *RHCE* sont situés sur le chromosome 1 : ils sont peu distants l'un de l'autre et leur polarité est opposée (9) (Figure 1). Ce locus *RH*

s'étend sur 450 Kilobases. Les deux gènes sont par ailleurs fortement homologues, suggérant qu'ils résultent de la duplication d'un gène ancestral. *RHD* et *RHCE* ségrègent ensemble lors de la méiose et forment 8 haplotypes différents : *Dce*, *DcE*, *dce*, *DCe*, *dCe*, *DCE* et *dCE* codant pour les antigènes RhD, RHC, Rhc, RhE et Rhe. Le gène *RHD*, composé de 10 exons et 10 introns, code pour une protéine de surface non glycosylée, comportant 12 domaines transmembranaires (10) (Figure 2). L'antigène RhD est porté par l'ensemble de la molécule et est considéré comme une mosaïque constituée de multiples épitopes, spécifiés majoritairement par les exons 4,5 et 7. Le positionnement tête bêche des gènes *RHCE* et *RHD* et leur forte homologie facilitent les échanges génétiques qui sont à l'origine de nombreux allèles *RHD*. Il existe de très nombreux variants du gène *RHD* dont l'expression phénotypique s'étend du phénotype RH:1 à RH:-1 en passant par un continuum d'expression de l'antigène variable en quantité et qualité. On peut schématiquement séparer ces variants en 3 phénotypes en plus du phénotype RH:1 (Tableau I).

- **Phénotype RH:-1** : l'antigène RHD est absent. La séquence *RHD* est plus ou moins complète. Ces patientes, à l'instar de celles de phénotype RH:-1, risquent une allo-immunisation anti-RH1 en l'absence d'immunoprophylaxie RH.
- **Phénotype RH:P1 (9)** : la protéine RhD est tronquée. Il manque une séquence dans le gène *RHD*, à l'origine d'une absence d'un ou de plusieurs épitopes. Les mécanismes possibles sont la présence d'allèles hybrides *RHD-CE-D* ou *RHCE-D-CE* liés à des mécanismes de conversion génique entre les gènes *RHD* et *RHCE* ou la substitution d'acides aminés. Une femme présentant ce phénotype peut synthétiser un anticorps anti-RH1 reconnaissant un ou des épitopes qu'elle ne possède pas.
- **Phénotype RH:W1 (ou RH1 faible)** : la protéine RhD est qualitativement normale, mais quantitativement diminuée (9). Moléculairement, il

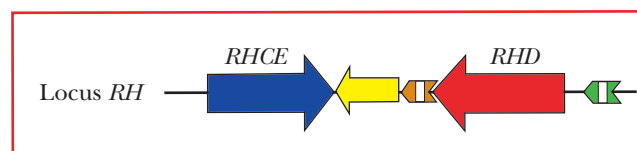


Fig. 1 - Organisation génétique du locus *RH*.

s'agit de mutations dans le gène *RHD* aboutissant à des substitutions d'acides aminés localisés dans les régions transmembranaires ou intracellulaires. L'allo-immunisation des individus est plus rare.

Plusieurs mécanismes moléculaires aboutissent au phénotype RH:-1 c'est-à-dire à l'absence totale de l'antigène RHD.

- Une délétion complète du gène *RHD*, cas le plus fréquent chez la patiente caucasienne.
- Des mutations faux sens ou non-sens, une insertion nucléotidique ou un décalage du cadre de lecture... dans le gène *RHD* à l'origine d'un gène *RHD* silencieux et à une absence totale de protéine RhD. Chez la patiente non caucasienne, et en particulier d'origine afro-antillaise, celui le plus fréquent est le pseudogène *D^ψ* consécutif à des mutations faux-sens dans l'exon 4 et 5 et à la duplication et l'insertion dans l'exon 4 de 37 paires de bases (les 19 derniers nucléotides de l'intron 3 et les 18 premiers de l'exon 4), aboutissant à la formation d'un codon stop prématuré dans l'exon 6. Les exons 10 à 7 sont présents et identiques à l'allèle *RHD* normal.
- Des réarrangements moléculaires par conversion génique entre les gènes *RHD* et *RHCE* générant des allèles hybrides *RHD-CE-D* ou *RHCE-D-CE*. L'allèle (C)ce^s est le plus fréquent avec obtention d'un gène hybride : *RHD-CE-D*. Les exons 4 à 7 du gène *RHD* ont été remplacés par ceux du gène *RHCE*, avec synthèse d'une protéine hybride RHD-CE-D sans antigène RhD.

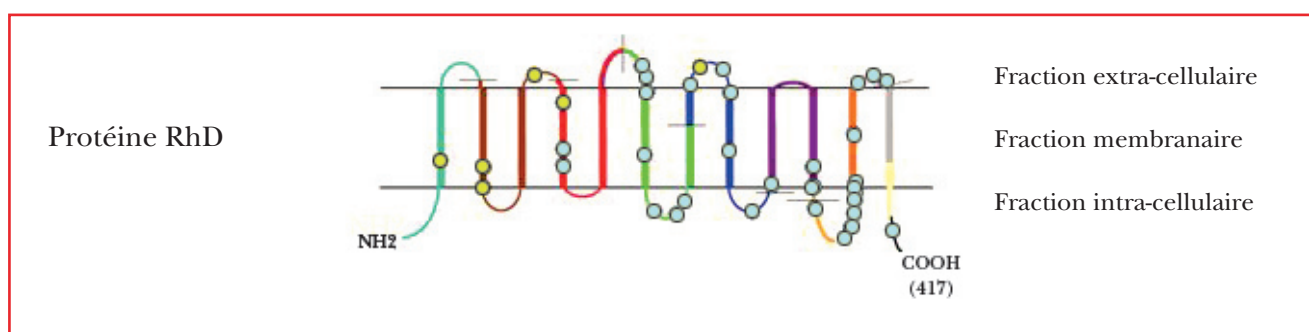


Fig. 2 - Topologie de la protéine membranaire RhD.

Les segments protéiques de couleur différente correspondent chacun au produit d'un des dix exons constitutifs du gène *RHD*.

Tableau I - Phénotypes RH:1 et RH:-1 et supports génétiques correspondants.

		Caractéristiques moléculaires	Phénotype
<i>RHDdel</i> Phénotype RH:-1		Absence du gène <i>RHD</i>	RH:-1
<i>RHDψ</i> Phénotype RH:-1		Présence de séquence <i>RHD</i> non fonctionnelle	RH:-1
<i>(C)ce^s</i> <i>D-CE(4-7)-D</i> Phénotype RH:-1		Absence de séquence <i>RHD</i> fonctionnelle	RH:-1
<i>D-CE(6-7)-D</i> Phénotype RH:P1		Présence de séquence partielle <i>RHD</i> fonctionnelle	RH:P1
<i>RHD</i> Phénotype RH:1 ou RH:W1 ou RH:-1 silencieux		Présence de séquence partielle <i>RHD</i> fonctionnelle	RH: 1 Ou RH:W1

IV. - MÉTHODES DE GÉNOTYPAGE *RHD* FŒTAL

Inscrite à la nomenclature des examens de biologie médicale, cette analyse est remboursée par l'Assurance maladie depuis juillet 2017 pour toutes les femmes enceintes de phénotype RH:-1. Elle a pu être mise au point après le constat par Lo *et al* (11) de la présence d'ADN fœtal libre d'origine placentaire dans le sang maternel. Cette observation a également conduit à des tests de recherche de la trisomie 21 et de la détermination du sexe fœtal de manière non invasive. Bien entendu, la quantité d'ADN fœtal circulant est très inférieure à celle d'ADN maternel mais elle s'accroît au cours de la grossesse. Cette fraction est plus faible chez les femmes d'IMC élevé, chez les fumeuses et peut varier selon leur origine ethnique (plus faible chez les femmes afro-caribéennes) (11). L'ADN fœtal disparaît très rapidement après l'accouchement, en deux heures pour la majorité des femmes (12).

Deux méthodes sont actuellement proposées : la PCR, en temps réel et digitale, et la spectrométrie de masse. Elles reposent sur la détection d'une partie du gène *RHD* présent chez le fœtus mais absent chez la mère.

A) Génomique *RHD* fœtal non invasif par PCR en temps réel

1) Principe

En général, il s'agit d'une amplification de séquences du gène *RHD* fœtal par PCR en temps réel recourant à la technologie de sondes d'hydrolyse (TaqMan) (13). La quantité d'ADN fœtal étant très nettement inférieure à celle d'ADN maternel circulant, le cycle seuil (ou Ct pour *threshold cycle number*) déterminant la présence d'ADN *RHD* permet de différencier l'ADN fœtal et maternel. En effet, l'ADN fœtal étant minoritaire, sa détection se situe à un Ct compris entre 35 et 45 cycles alors que celle de l'ADN maternel, majoritaire, est aux alentours de 30 cycles (Figures 3).

Au moins une cinquantaine de protocoles ont été proposés pour la réalisation de cette approche. La plupart d'entre eux amplifient au moins deux parties du gène (exons 7 et 10), voire trois (exons 4,5, 10 ou exons 10 et 7 et intron 4 ou encore exons 5,7 et 10) (14-16). On retiendra avant tout le procédé générant le moins de résultats faussement négatifs, c'est-à-dire ayant une bonne valeur prédictive négative. En effet, il est impératif de détecter tous les fœtus *RHD* positifs, tant pour prévenir l'allo-immunisation que pour suivre une patiente allo-immunisée anti-RH1, un suivi

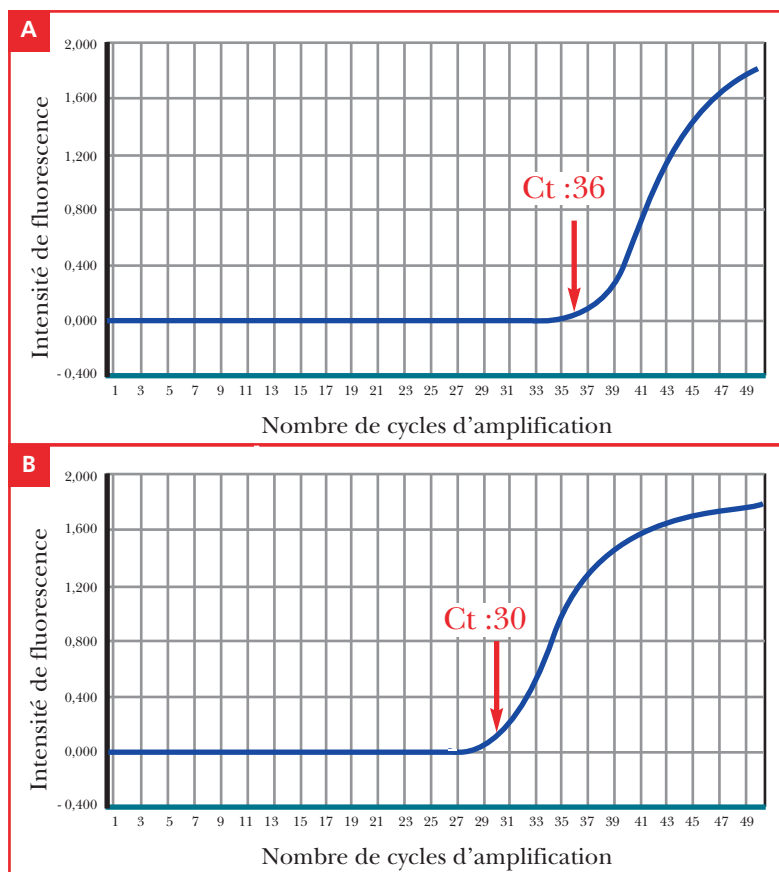


Fig. 3 - Génotypage *RHD* foetal par PCR en temps réel (technologie TaqMan) à partir de sang maternel.

A) Femme dont le gène *RHD* est délété, enceinte d'un fœtus génotypé *RHD* positif (amplification tardive correspondant au fœtus) ;
 B) Femme enceinte possédant des séquences du gène *RHD* (amplification précoce, Ct :30).

inadapté pouvant avoir des conséquences très graves. Un faux positif conduira à une prophylaxie inutile, sans impact important pour la patiente non allo-immunisée et son fœtus, ou à un suivi clinique et biologique renforcé dispensable chez la patiente allo-immunisée et donc plus acceptable.

Deux types de contrôle doivent être effectués :

a) un contrôle de l'absence de problème d'extraction, de l'inexistence d'inhibiteurs de PCR et d'une amplification correcte : l'addition d'un ADN exogène (traceur) à l'échantillon sanguin permet de valider l'analyse (15),

b) ou bien un contrôle de la présence d'ADN fœtal par amplification de gènes spécifiques du fœtus : gène *SRY* pour les fœtus uniquement de sexe masculin et /ou gène *RASSF1A* hyperméthylé (15, 16).

Au Centre National de Référence, la technique employée est celle développée par l'institut Jacques Boy (*Free DNA Fœtal RHD Kit*). Les exons 10, 7 et 5 de *RHD* sont amplifiés. Un ADN traceur exogène permet de valider l'étape d'extraction et de contrôler

l'absence d'inhibiteur de PCR. Un témoin positif « maison » est ajouté pour refléter le signal d'amplification fœtal en plus des contrôles internes fournis dans le kit. Pour les patientes porteuses de l'allèle *D Ψ* , une PCR supplémentaire ciblant l'exon 6 du gène *RHD* a été mise au point.

2) Interprétation

La technologie a été standardisée et « industrialisée » ; elle est désormais accessible à des laboratoires disposant d'un agrément de dépistage prénatal (DPN).

Après validation des contrôles de bonnes pratiques, le génotypage fœtal peut être interprété. L'amplification d'un exon permet de conclure à sa présence dans le sérum maternel et le Ct permet de déterminer son origine : tardif, il est fœtal et précoce, il est maternel.

Chez la patiente possédant un gène *RHD* délété :

- L'amplification avec un Ct tardif permet de conclure à un génotypage *RHD* fœtal positif.
- L'absence d'amplification des exons *RHD* ciblés atteste un génotypage *RHD* fœtal négatif. Celui-ci est systématiquement contrôlé à partir d'un second échantillon sanguin, réalisé préférentiellement après 15 SA afin de disposer, selon les recommandations de l'HAS, d'ADN fœtal circulant en quantité suffisante.

Pour les autres patientes, l'interprétation du génotypage *RHD* fœtal est lié au type de variant maternel. Pour celles présentant un allèle *RHD D Ψ* ou (*C*)^{ce^s} (Tableau II, a et b), exprimé ou non, celui-ci interfère dans l'interprétation du génotypage fœtal. L'analyse du gène *RHD* maternel *a minima* est alors réalisée (au Centre National de Référence) par amplification des exons 10, 7, 5 et 4 et de l'intron 4 à partir de l'ADN extrait des leucocytes. Cette étude est nécessaire pour interpréter le résultat du génotypage fœtal. Elle permet également pour les autres variants (Tableau II, c et d) d'expliquer pourquoi le résultat de génotypage *RHD* fœtal ne peut être rendu pour ces patientes (pour leur grossesse actuelle mais aussi pour toutes les futures autres). La mère possède une partie voire la totalité du gène *RHD*. Comme mentionné précédemment, la plus forte concentration d'ADN maternel est à l'origine d'une amplification plus précoce

Tableau II - Origine des amplicons obtenus par PCR selon les variants maternels (à gauche).

	Exon4	Exon5	Exon6	Exon7	Exon10
<i>RHDdel</i> Phénotype RH:-1	Fœtal	Fœtal	Fœtal	Fœtal	Fœtal
a) <i>RHDψ</i> Phénotype RH:-1	Fœtal	Fœtal	Fœtal	Maternel	Maternel
b) <i>(C)ce^s</i> <i>D-CE(4-7)-D</i> Phénotype RH:-1	Fœtal	Fœtal	Fœtal	Fœtal	Maternel
c) <i>D-CE(6-7)-D</i> Phénotype RH:P1	Maternel	Maternel	Fœtal	Fœtal	Maternel
d) <i>RHD</i> Phénotype RH:1 ou RH:W1 ou RH:-1 silencieux	Maternel	Maternel	Maternel	Maternel	Maternel

de ces exons du gène *RHD*. Ainsi, il ne sera pas possible de déterminer si le fœtus possède également ces exons. De plus, l'analyse permet éventuellement d'orienter vers une étude du gène *RHD* maternel plus approfondie dans un laboratoire spécialisé afin d'établir le statut partiel ou affaibli du variant *RHD*.

Dans les cas particuliers des femmes enceintes de phénotype RH:-1 porteuses d'un allèle *Dψ* ou *(C)ce^s*, il est possible de conclure pour le génotypage *RHD* fœtal.

- a) Cas de l'allèle *Dψ*. Le génotypage *RHD* fœtal retrouve une amplification précoce des exons 7 et 10, lié à la présence de ces exons chez la mère.

- Le génotypage fœtal est conclu positif si les exons 5 et 6 sont amplifiés tardivement.

- Il est conclu négatif en l'absence d'amplification des exons 5 et 6. Un examen de contrôle est systématiquement effectué, après de préférence 15 SA afin de disposer d'une quantité suffisante d'ADN fœtal circulant.

- b) Cas de l'allèle *(C)ce^s*. Le génotypage *RHD* fœtal retrouve une amplification précoce de l'exon 10, lié à la présence de cet exon chez la mère.

- Le génotypage fœtal est conclu positif si les exons 7 et 5 sont amplifiés.

- Il est conclu ininterprétable en l'absence d'amplification des exons 7 et 5. Un examen de contrôle est systématiquement effectué, après de préférence 15 SA afin de disposer d'une quantité suffisante d'ADN fœtal circulant. Si le contrôle a le même profil, le génotypage *RHD* est rendu ininterprétable car il existe des variants partiels, sans exons 5 et 7.

Il convient de mentionner que tous ces variants peuvent également être décelés chez le fœtus. Dans ces cas, le génotypage *RHD* fœtal non invasif est rendu ininterprétable car les profils d'amplification peuvent correspondre à des variants silencieux ou à des variants partiels.

B) Génotypage *RHD* fœtal non invasif par d'autres approches

1) Par PCR digitale

La PCR digitale est une technique fondée sur l'analyse du résultat final d'une multitude de PCR réalisées grâce à la compartimentation par dilution de l'ADN dans des gouttelettes. Chaque gouttelette correspond à une PCR spécifique de la séquence cible recherchée. Le résultat quantitatif est exprimé en nombre de « gouttelettes positives », c'est-à-dire ayant le gène cible, par rapport au nombre de gouttelettes analysées. Cette technique est très sensible et moins soumise aux interférences des inhibiteurs de

PCR (17). Elle est particulièrement indiquée en cancérologie mais également pour le génotypage fœtal non invasif du fait de la faible proportion d'ADN fœtal par rapport à l'ADN maternel. Par contre cette technique est coûteuse, longue, délicate à mettre au point et pour l'instant difficilement applicable à grande échelle.

Pour le génotypage *RHD* fœtal non invasif, il est possible aussi de détecter des variants maternels interférants grâce au nombre de « gouttelettes positives ». En effet, comme pour la PCR en temps réel, un seuil quantitatif de gouttelettes est déterminé au-dessus duquel le signal mis en évidence est d'origine maternelle.

La mise en évidence du gène *RHD* fœtal est réalisée par l'amplification de 4 exons. Les amorces choisies permettent l'amplification des exons 4 et 5 sauvages, tandis que celles choisies pour les exons 7 et 10 amplifient le gène *RHD* sauvage mais également les variants *D^ψ* et *(C)^{ce}*. La présence d'ADN fœtal est vérifiée par l'amplification d'ADN sur les chromosomes Y ou de la région du gène promoteur de *RASSF1A* hyperméthylé. Le contrôle d'extraction et d'absence d'inhibiteur est réalisé par l'amplification du gène interne de bêta-globine (18).

2) Par spectrométrie de masse selon la technique SABER (Single Allele Base Extension Reaction)

Cette technique combine l'amplification de l'ADN cible par PCR, l'extension ciblée de la mutation recherchée et l'analyse du produit par MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*) (19). Bien que coûteuse et longue, elle permet de discriminer deux allèles différant d'une seule paire de bases et donc de s'affranchir de l'interférence des variants *RHD* maternels. Pour le génotypage *RHD* fœtal non invasif, les exons 7 et 10 sont amplifiés. Les résultats sont intéressants en termes de sensibilité et spécificité. Cette technique est également applicable au génotypage *KEL1* fœtal non invasif et plaquettaire (20).

V. - INDICATIONS ET INTERPRÉTATIONS

A) Chez la femme non immunisée

Avant 28 SA, si le génotypage *RHD* fœtal est positif ou bien s'il est ininterprétable, une injection d'immunoglobulines anti-D (300 µg) est préconisée chez la femme non immunisée à 28 SA, puis pour chaque événement immunisant, la dose étant adaptée au résultat du test de quantification de l'hémorragie fœto-maternelle. S'il est négatif après réalisation de deux contrôles, aucune prophylaxie n'est nécessaire durant la grossesse.

À l'accouchement, selon les nouvelles recommandations du Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (21), les pratiques ont été adaptées, les patientes RH:-1 ayant aujourd'hui quasiment toutes accès au génotypage *RHD* fœtal non invasif. En cas de génotypage *RHD* fœtal positif, le groupe sanguin du nouveau-né ne sera plus vérifié : il sera considéré de phénotype RH:1. Seul un prélèvement sanguin maternel sera nécessaire pour la réalisation du test de quantification de l'hémorragie fœto-maternelle et l'adaptation de la dose d'immunoglobulines anti-D à injecter dans les 72 heures suivant l'accouchement. En cas de génotypage *RHD* négatif vérifié ou ininterprétable, la conduite à tenir reste la même qu'antérieurement : du sang est prélevé chez la mère et l'enfant afin de vérifier le phénotype de ce dernier.

Il convient de mentionner qu'il existe un risque de détection à tort d'un phénotype RH:1 chez l'enfant, sans conséquence clinique, dû à la présence de variants du gène *RHD* silencieux. Il s'agit d'enfants génotypés *RHD* positif durant la période anténatale et qui, en réalité, sont de phénotype RH:-1.

B) Chez la patiente allo-immunisée anti-RH1

Si le génotypage *RHD* fœtal est positif, un suivi clinique et biologique rapproché de la grossesse est pertinent. En cas de négativité, ce suivi reste standard. Seule une recherche d'agglutinines irrégulières est conseillée toutes les 6 semaines, car la femme allo-immunisée anti-RH1 est dite « bonne répondeuse » et peut fabriquer d'autres anticorps.

En cas de génotypage *RHD* fœtal positif, la conduite à tenir est résumée dans la figure 4.

VI. - CONCLUSION

Le génotypage *RHD* fœtal non invasif sur sang maternel a révolutionné la prise en charge des femmes de phénotype RH:-1. Pour les patientes non immunisées anti-RH1, seules les femmes ayant un fœtus génotypé RH:1 reçoivent la prophylaxie RH. Pour les patientes immunisées, seules celles ayant un fœtus génotypé RH:1 auront un suivi clinique et biologique plus contraignant. La réalisation des génotypes *RHc*, *RHE* et *KEL1* fœtaux sont également réalisables aujourd'hui afin d'assurer une meilleure prise en charge des grossesses présentant une incompatibilité fœto-maternelle respectivement anti-RH-4, anti-RH-3 et anti-KEL1, qui sont responsables de graves maladies ante- ou postnatales. Ces génotypes sont indiqués chez toutes les femmes immunisées, dont le conjoint est hétérozygote pour l'antigène cible.

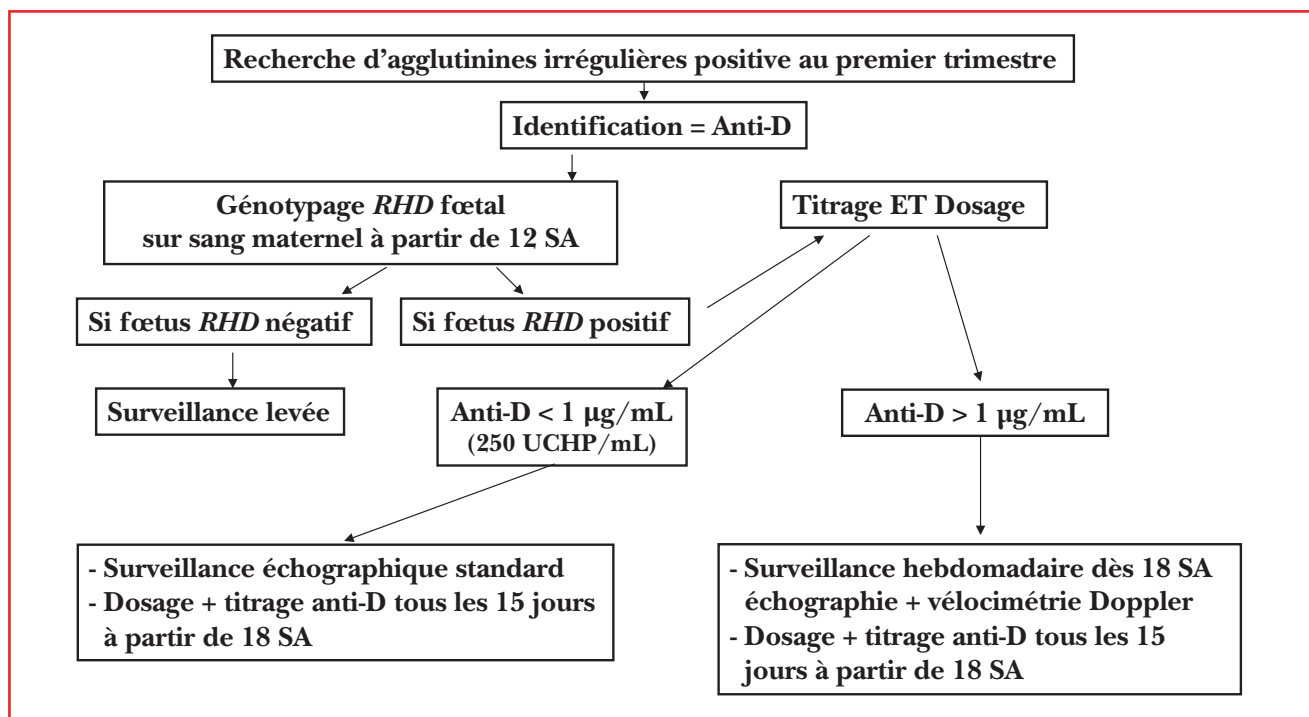


Fig. 4 - Grossesse avec allo-immunisation anti-RH1 : schéma de prise en charge.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Huguët-Jacquot S, Toly-Ndour C, Cortey A, Carbonne B, Mailloux A. Diagnostic et suivi biologiques des allo-immunisations anti-érythrocytaires chez la femme enceinte. *Rev Fr Lab* 2015 ; **2015** (470) : 73-80.
- (2) Toly-Ndour C, Huguët-Jacquot S, Delaby H, Maisonneuve E, Cortey A, Mailloux A. Quantification des anticorps anti-érythrocytaires chez la femme enceinte. *Revue de Biologie Médicale* 2019 ; **347** : 17-34.
- (3) Girault A, Friszer S, Maisonneuve E, Guibaud L, Cortey A, Jouannic JM. Transfusions fœtales érythrocytaires : état des lieux sur 4 ans en France (2011-2014). *J Gynecol Obstet Hum Reprod* 2017 ; **46** (2) : 119-24.
- (4) Koelewijn JM, de Haas M, Vrijlkotte TG, Bonsel GJ, van der Schoot CE. One single dose of 200 microg of antenatal RhIG halves the risk of anti-D immunization and hemolytic disease of the fetus and newborn in the next pregnancy. *Transfusion* 2008 ; **48** (8) : 1721-9.
- (5) Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D fœto-maternelle. Recommandations pour la pratique clinique. 2005. http://www.cngof.net/Journees-CNGOF/MAJ-GO/RPC/rpc_rhesus2005.pdf
- (6) Carbonne B, Cortey A, Scieillour CR, Brosard Y. Génotypage RhD fœtal non invasif sur sang maternel : vers une utilisation chez toutes les femmes enceintes RhD négatif. *Gynecol Obst Fert* 2008 ; **36** (2) : 200-3.
- (7) Haute Autorité de Santé. Détermination prénatale du génotype RHD fœtal à partir du sang maternel. Janvier 2011. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2011-10/avis_genotypage_foetal.pdf
- (8) Darlington M, Carbonne B, Mailloux A, Brosard Y, Lévy-Mozziconacci A, Cortey A, et al. Effectiveness and costs of non-invasive foetal RHD genotyping in Rhesus-D negative mothers: a French multicentric two-arm study of 850 women. *BMC Pregnancy Childbirth* 2018 ; **18** (1) : 496.
- (9) Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000 ; **95** (2) : 375-87.
- (10) Le Van Kim C, Colin Y. Les antigènes de groupe sanguin Rh : du diagnostic anténatal de la maladie hémolytique du nouveau-né à la fonction de transport d'ammonium. *Hématologie* 2004 ; **10** (5) : 372-83.
- (11) 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** (8703) : 1463-4.
- (12) Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999 ; **64** (1) : 218-24.
- (13) Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel : principes et applications. *Rev Biol Biotechnol* 2003 ; 22-11.
- (14) Rouillac-Le Scieillour C, Sérazin V, Brosard Y, Oudin O, Le Van Kim C, Colin Y. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma: use of a new developed Free DNA kit RhD®. *Transfus Clin Biol* 2007 ; **14** (6) : 572-7.
- (15) Zhou L, Thorson JA, Nugent C, Davenport RD, Butch SH, Judd WJ. Noninvasive prenatal RHD genotyping by real-time polymerase chain reaction using plasma from D-negative pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 2005 ; **193** (6) : 1966-71.
- (16) Brojer E, Zupanska B, Guz K, Orzińska A, Kalińska A. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion* 2005 ; **45** (9) : 1473-80.
- (17) Perez-Toralla K, Pekin D, Bartolo JF, Garlan F, Nizard P, Laurent-Puig P, et al. PCR digitale en micro-compartiments - I. Détection sensible de séquences d'acides nucléiques rares. *Med Sci (Paris)* 2015 ; **31** (1) : 84-92.
- (18) Orhant L, Rondeau S, Vasson A, Anselem O, Goffinet F, El Khattabi LA, et al. La PCR digitale, une nouvelle approche pour analyser l'ADN fœtal à partir du sang maternel : application à la détermination du génotype RHD fœtal. *Ann Biol Clin (Paris)* 2016 ; **74** (3) : 269-77.
- (19) Zhong XY, Holzgreve W. MALDI-TOF MS in prenatal genomics. *Transfus Med Hemother* 2009 ; **36** (4) : 263-72.
- (20) Menet MC. Principes de la spectrométrie de masse. *Rev Fr Lab* 2011 ; **41** (437) : 41-53.
- (21) Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus D chez les patientes de groupe Rhésus D négatif. Mise à jour en décembre 2017 des rpc du cngof de 2005. <http://www.cngof.fr/pratiques-cliniques/recommandations-pour-la-pratique-clinique/apercu?path=RPC%2BCOLLEGE%252F2017%252Fpreventionalloimmunisation-MAJ-2017-12-21.pdf&i=13323>