

Validation du Génotypage RHD Foetal Non Invasif chez les Femmes RHD-Négatif Porteuses de l'Allèle RHDPsi

N.R. DA SILVA(1), C. ROUILLAC-LE SCIELLOUR(2), M. MENU(3), Y. COLIN(4), C. LE VAN KIM(4), J.P. CARTRON(4), Y. BROSSARD(1), A. CORTEY(1), B. CARBONNE(1), A. MAILLOUX(1)

(1) Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale (CNRHP), AP-HP St Antoine, PARIS, FRANCE ; (2) Laboratoire Central CHI Poissy-Saint Germain en Laye, POISSY, FRANCE ; (3) Institut Jacques Boy, REMS, FRANCE ; (4) Institut National de la Transfusion Sanguine, PARIS, FRANCE

Introduction

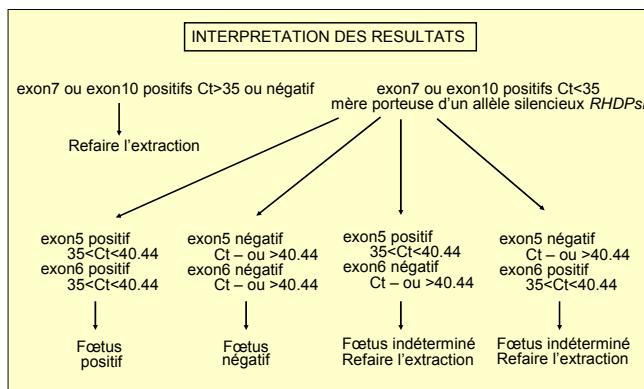
De nos jours, l'allo-immunisation anti-D reste la principale cause d'anémie hémolytique fœtale. La détermination du génotype RHD fœtal est actuellement possible à partir d'un simple prélèvement sanguin maternel. La technique repose sur l'amplification par *polymerase-chain-reaction* (PCR) du gène *RHD* contenu dans l'ADN fœtal présent dans la circulation maternelle. Ce test permettrait de diminuer d'un tiers l'utilisation d'immunoglobulines chez les femmes RhD-négatif, pour la prévention de l'allo-immunisation anti-D. En cas d'allo-immunisation maternelle, il permet de n'appliquer une surveillance spécialisée qu'aux fœtus de groupe RhD-positif. Cependant, cette analyse réalisée sur du plasma maternel avec le kit « Free DNA fetal kit RHD » (Rouillac-Le Sciellour et al., TCB, 2007 (14) : 572-7), n'est concluante que si les femmes RhD-négatif ne possèdent pas dans leur génome des séquences non exprimées du gène *RHD* venant interférer avec le test. Parmi ces allèles *RHD* silencieux, le plus fréquent est l'allèle *RHDPsi* : il est observé chez 66% environ des femmes RhD-négatif originaires d'Afrique noire.

Objectif

Valider une technique ainsi qu'une stratégie pour le génotypage RHD fœtal à partir de sang maternel chez les femmes RhD-négatif porteuses de l'allèle silencieux *RHDPsi*, situation rencontrée dans 3% des demandes de génotypage fœtal RHD faites au CNRHP.

Matériel et méthodes

Les ADNs plasmatiques de 35 femmes enceintes RhD-négatif porteuses d'un allèle *RHDPsi* ont été extraits à partir de 500µl de plasma en utilisant le kit d'extraction QIAamp MinElut Virus Vacumm Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). L'ADN a été éluté dans 35µl d'eau. Pour chaque patient, trois PCR en temps réel ont été réalisées : une amplification de l'exon 7 ou 10 avec le kit « Free DNA fetal kit RHD » comme marqueur d'extraction et une amplification des exons 5 et 6 spécifiques de l'allèle *RHD* sauvage (Finning et al., Transfusion, 2002 (42) : 1079-1085). Les résultats obtenus ont été interprétés selon l'arbre décisionnel ci-dessous et comparés au génotypage RHD fœtal réalisé sur liquide amniotique et/ou au phénotype RhD de l'enfant à la naissance.



Résultats et interprétation

	Fœtus RhD+	Fœtus RhD-	Total
Test +	28	0	28
Test -	0	5	5
Indéterminé	1	1	2
Total	29	6	35

$Ct_{E7m}=31,30 (\pm 1,90)$
 $Ct_{E10m}=32,28 (\pm 2,43)$

\Rightarrow Pourcentage d'indéterminé=5,7%

Reprise des indéterminés

	Fœtus RhD+	Fœtus RhD-	Total
Test +	0	0	0
Test -	0	1	1
Indéterminé	1	0	1
Total	1	1	2

\Rightarrow Pourcentage d'indéterminé=2,9%

- Sensibilité du test=100%
- Spécificité du test=100%
- Valeur prédictive positive du test (aptitude à prévoir un phénotype fœtal RhD positif) =100%
- Valeur prédictive négative du test (aptitude à prévoir un phénotype fœtal RhD négatif) =100%

Conclusion

Les PCR *RHD* exons 5 et 6 entrent désormais, avec les PCR *RHD* exons 7 et 10, dans notre stratégie de génotypage fœtal *RHD* qui devient maintenant accessible aux fœtus dont la mère ou eux-mêmes sont porteurs du gène *RHDPsi*.

La PCR *RHD* exon 5 est réalisée systématiquement avec les PCR *RHD* exon 7 et 10 chez toutes les patientes RhD-négatif, alors que la PCR exon 6 est réalisée uniquement chez les patientes RhD-négatif possédant un allèle *RHDPsi*.