



ÉTABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG - NORD DE FRANCE

Génotypage RHD foetal sur plasma maternel

Anne Delsalle,
Sandrine Dourieux

TACT oct 2013

Les antigènes et le locus RH

- ▶ 1987-Agre- Antigènes du système Rh portés par 2 protéines membranaires RhD et Rh CE
- ▶ 1991 –Cherif-Zahar- Locus composé de 2 gènes situés sur le bras court du chromosome 1: RHD et RHCE possédant 97% d'identité
- ▶ 1993- Bennet- Génotypage RHD sur LA

ADN foetal et plasma maternel



- ▶ 1997 – Lo met en évidence DNA foetal libre dans plasma maternel
- ▶ Origine placentaire
- ▶ ADN de bas PM
- ▶ Concentration augmente avec l'âge gestationnel
 - ▶ 3,4% du total de l'ADN plasmatique au 2nd trimestre
 - ▶ 6,2% au 3^{ème} trimestre
- ▶ Cinétique: élimination totale \leq 48 h après l'accouchement
- ▶ Perspective de développer une méthode de génotypage

Intérêts du génotypage RHD

Diagnostic anténatal non invasif

→ chez les femmes immunisées anti-D si géniteur hétérozygote vis-à-vis du gène RHD

Adapter la surveillance de la grossesse

Évite surveillance particulière si fœtus RHD négatif

→ Rationaliser l'administration systématique des Ig anti-D

Systematisation éventuelle dans le cadre de la prévention anténatale à 28 SA pour limiter l'injection d'Immunoglobulines anti-D aux seules femmes RHD négatif porteuses d'un fœtus RHD positif



Méthodes d'extraction et d'amplification sélective de l'ADN foetal

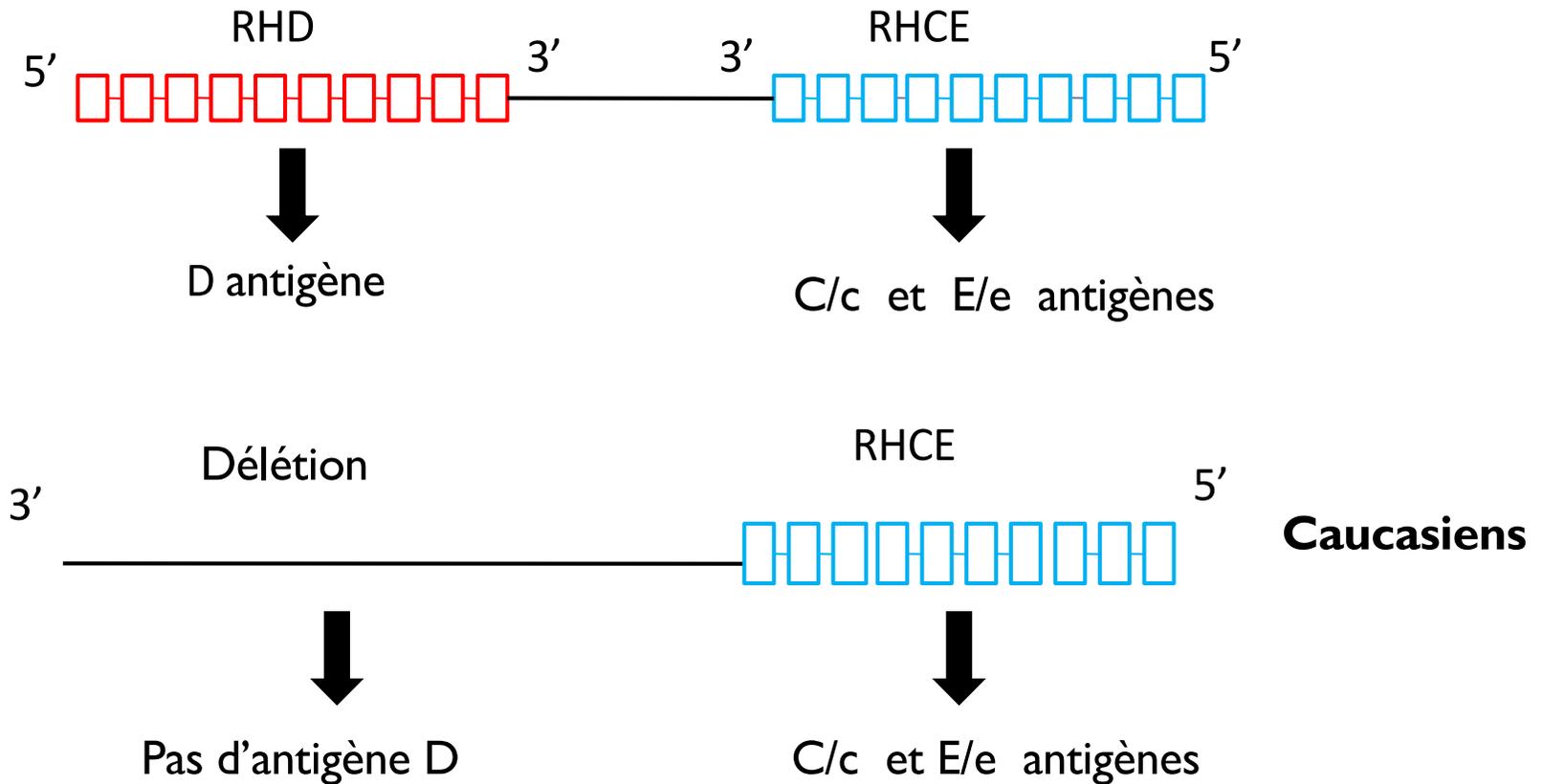
- ▶ Faible quantité: 25 copies /ml plasma
Comment garantir qu'un résultat négatif correspond à un foetus RH:-I et non à un défaut d'ADN?
- ▶ Existence de variants
 - Polymorphisme locus RH/ recombinaison gènes RHD/RHCE
 - Présence d'allèles silencieux (gène RHD/phénotype RH:-I)

Prévalence du phénotype RhD négatif

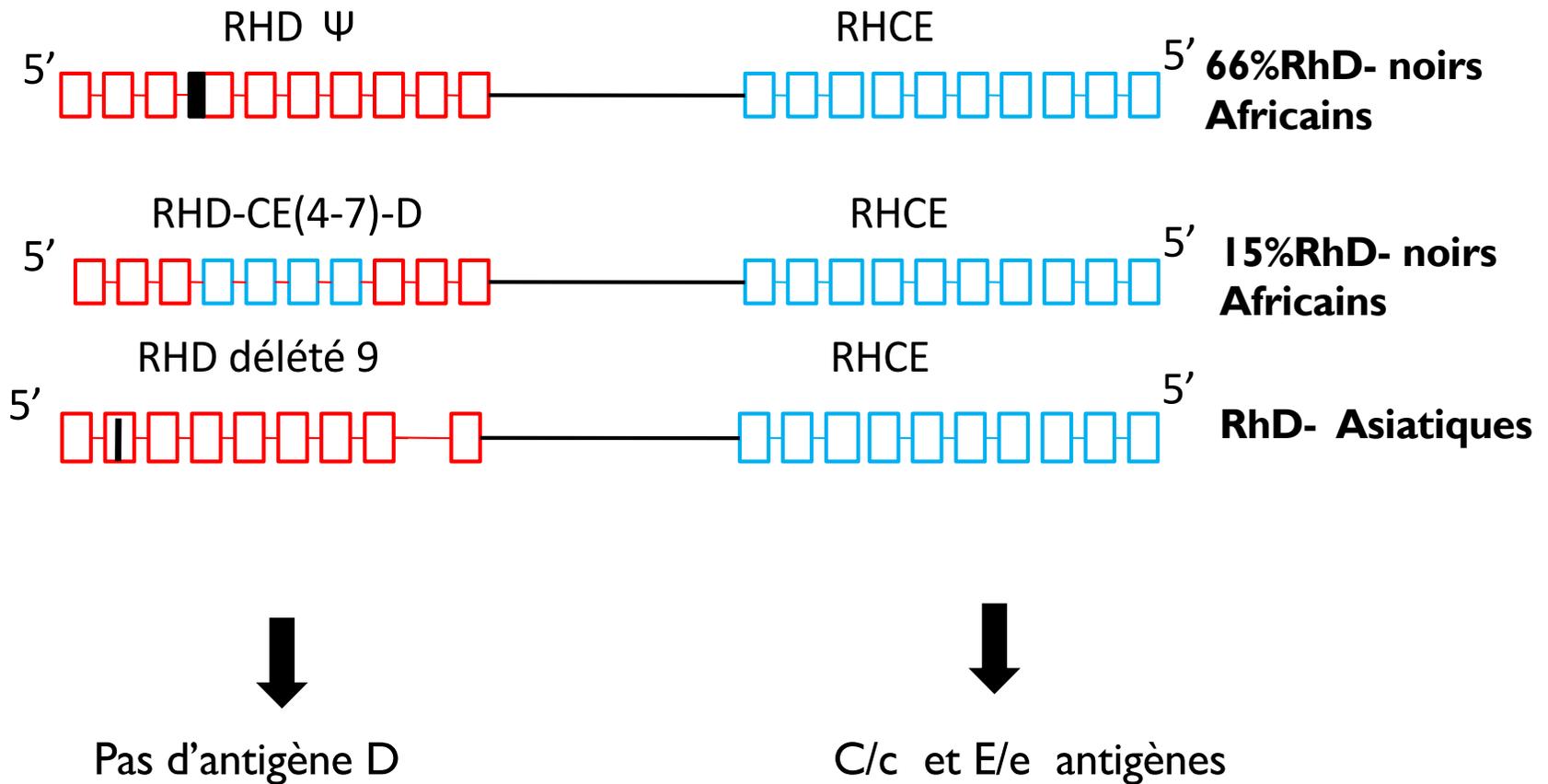
	Phénotype RhD négatif		
	Européens 15-17%	Africains 3-5%	Asiatiques <0.1%
Délétion du gène RHD	>99%	10-20%	
Gènes RHD non fonctionnels	<1%	60-70%	50%
Gènes hybrides D-CE-D	<1%	10-25%	50%



RhD négatif: fondement génétique



RhD négatif: fondement génétique



Prélèvements



- ▶ ≥ 12 SA
- ▶ 2 tubes EDTA
- ▶ Centrifugation, décantation du plasma 48H
- ▶ Congélation -20°C par aliquots si génotype est réalisé en différé.



Extraction ADN

- ▶ 500 μ L de plasma
- ▶ Ajout ADN Mais (traceur pour la validation de l'étape d'extraction)
- ▶ Technique automatisée sur barrette unitaire: MagnaPure Compact ROCHE
 - ADN maternel majoritaire + ADN foetal
- ▶ Témoins positif et négatif
- ▶ Blanc



Amplification

PCR Quantitative en temps réel sur Light Cycler

3 PCR (puis 4)

→ Etude de 2 (puis 3) régions du gène RHD

Exon 7 plus sensible

Exon 10 plus spécifique

(Exon 5 distinction / D Ψ)

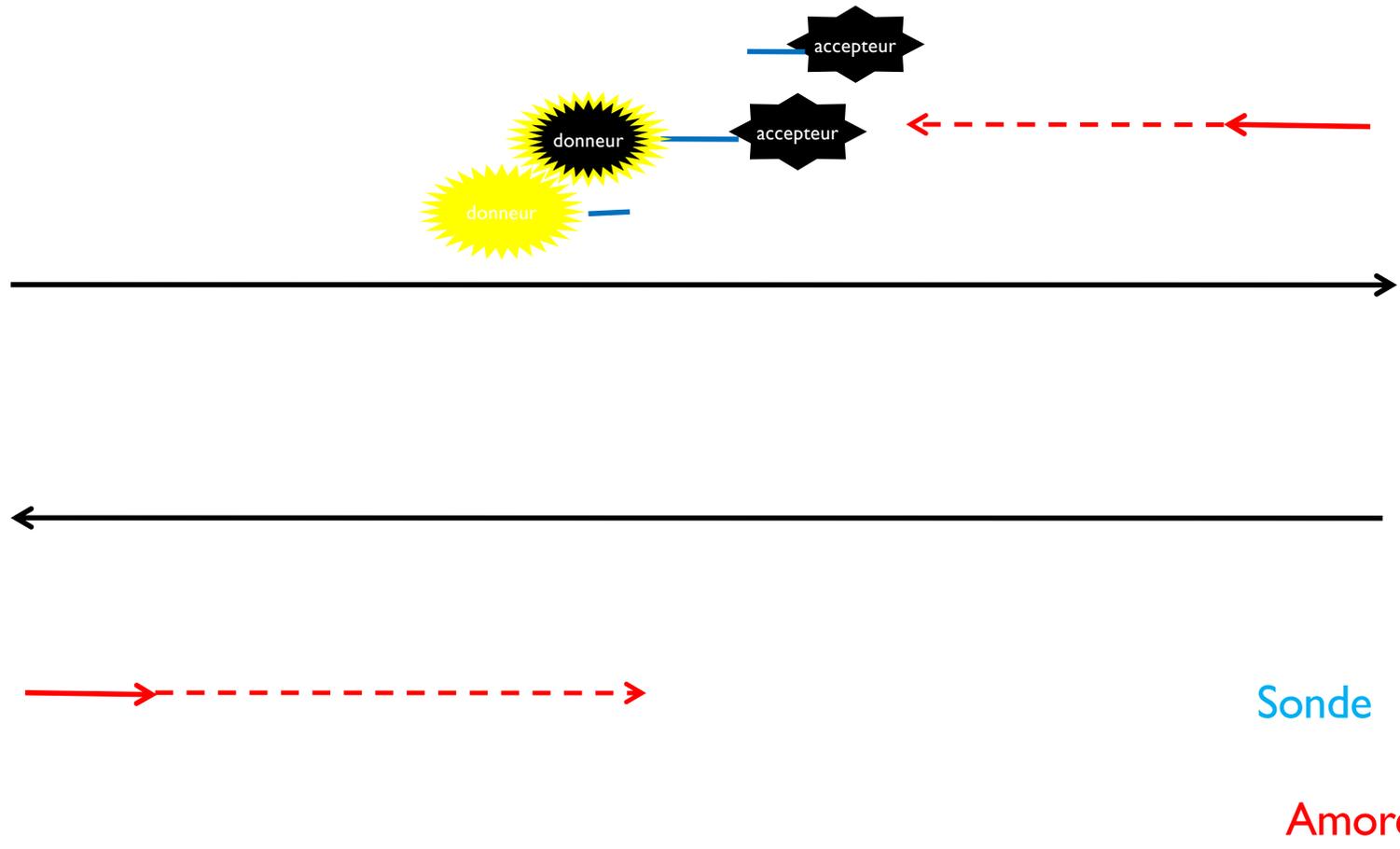
→ADN traceur

KIT marqué CE:

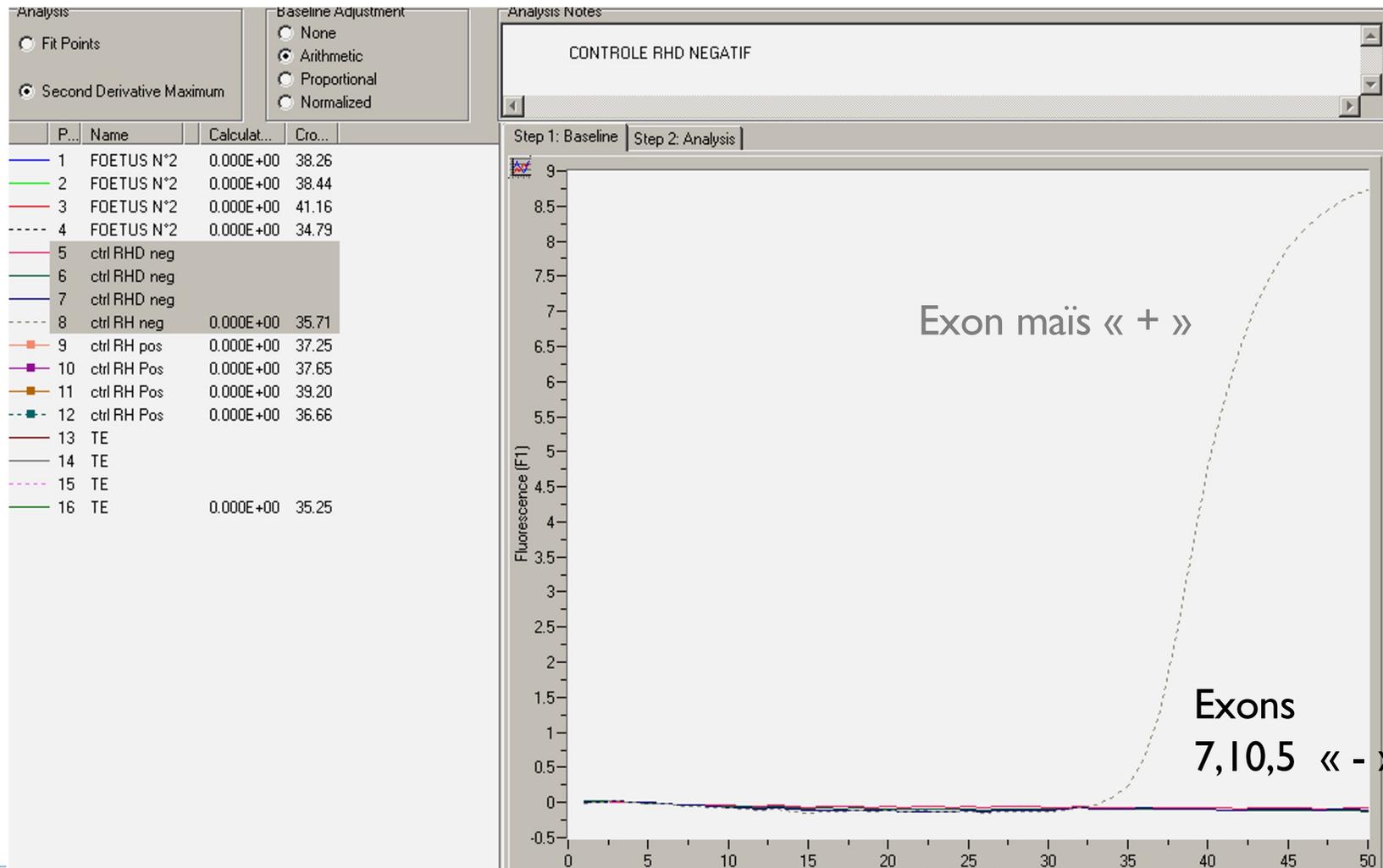
Free DNA fetal kit RhD BIORAD



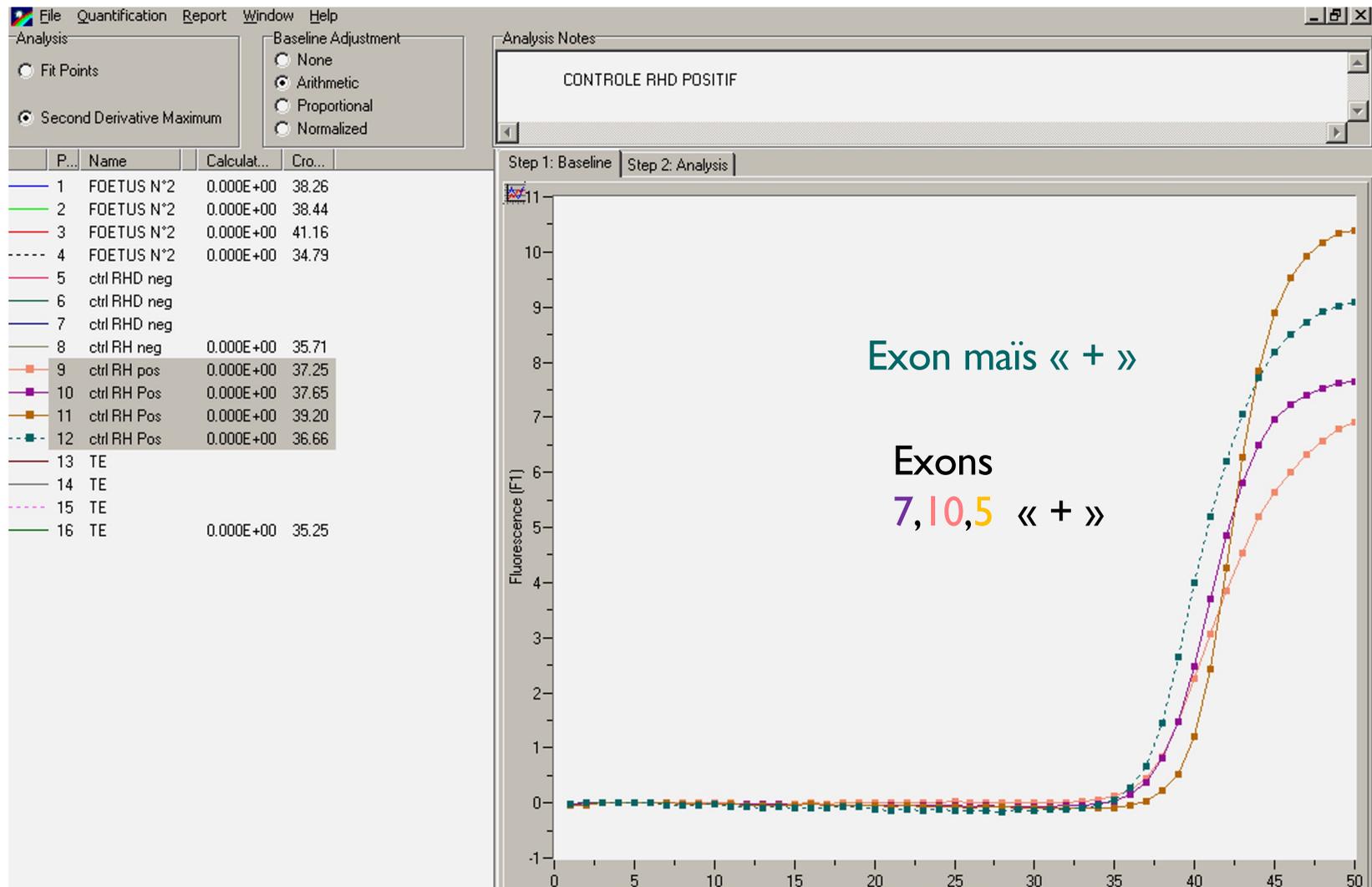
PCR QUANTITATIVE sondes TaqMan



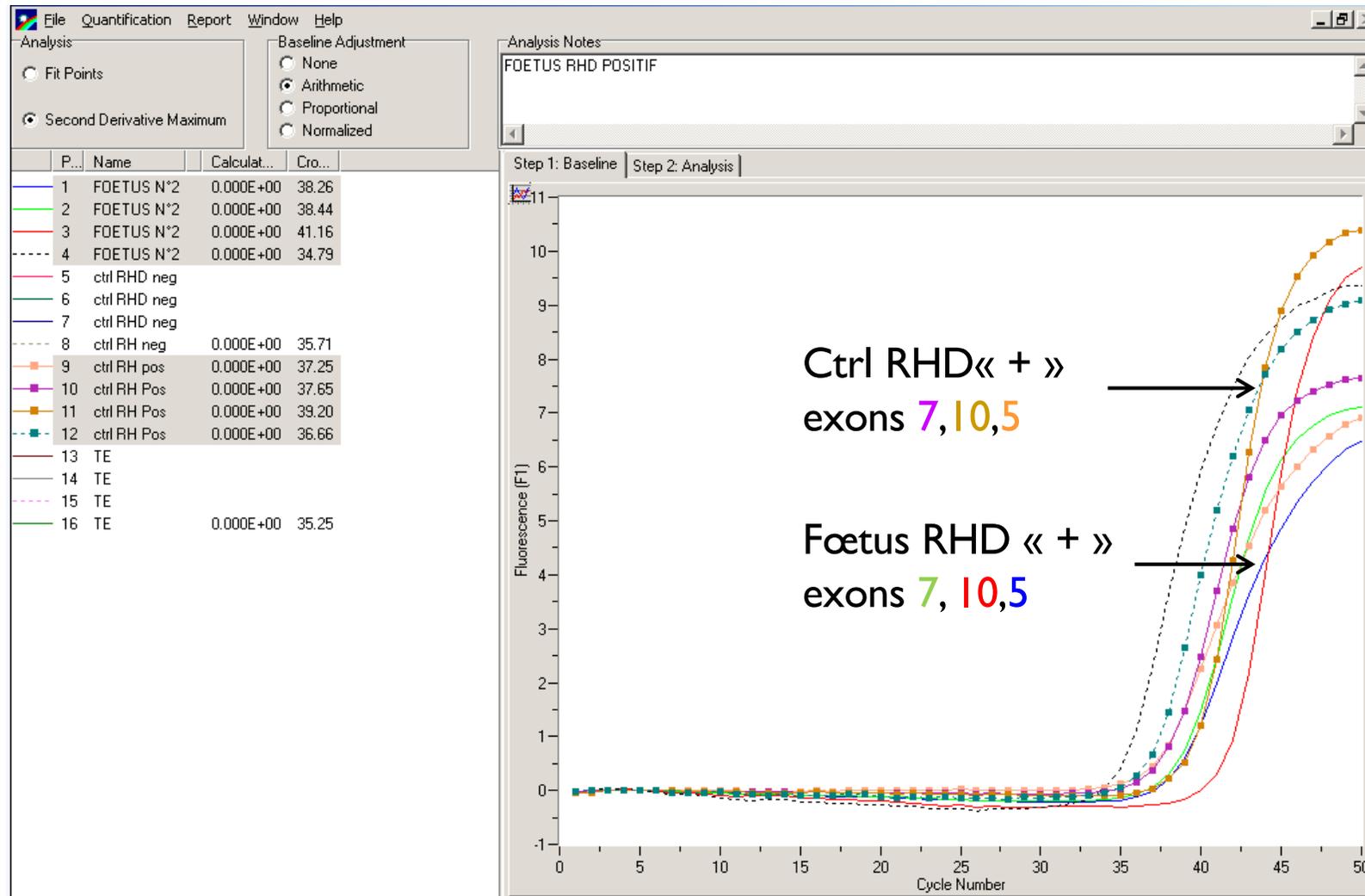
Résultats



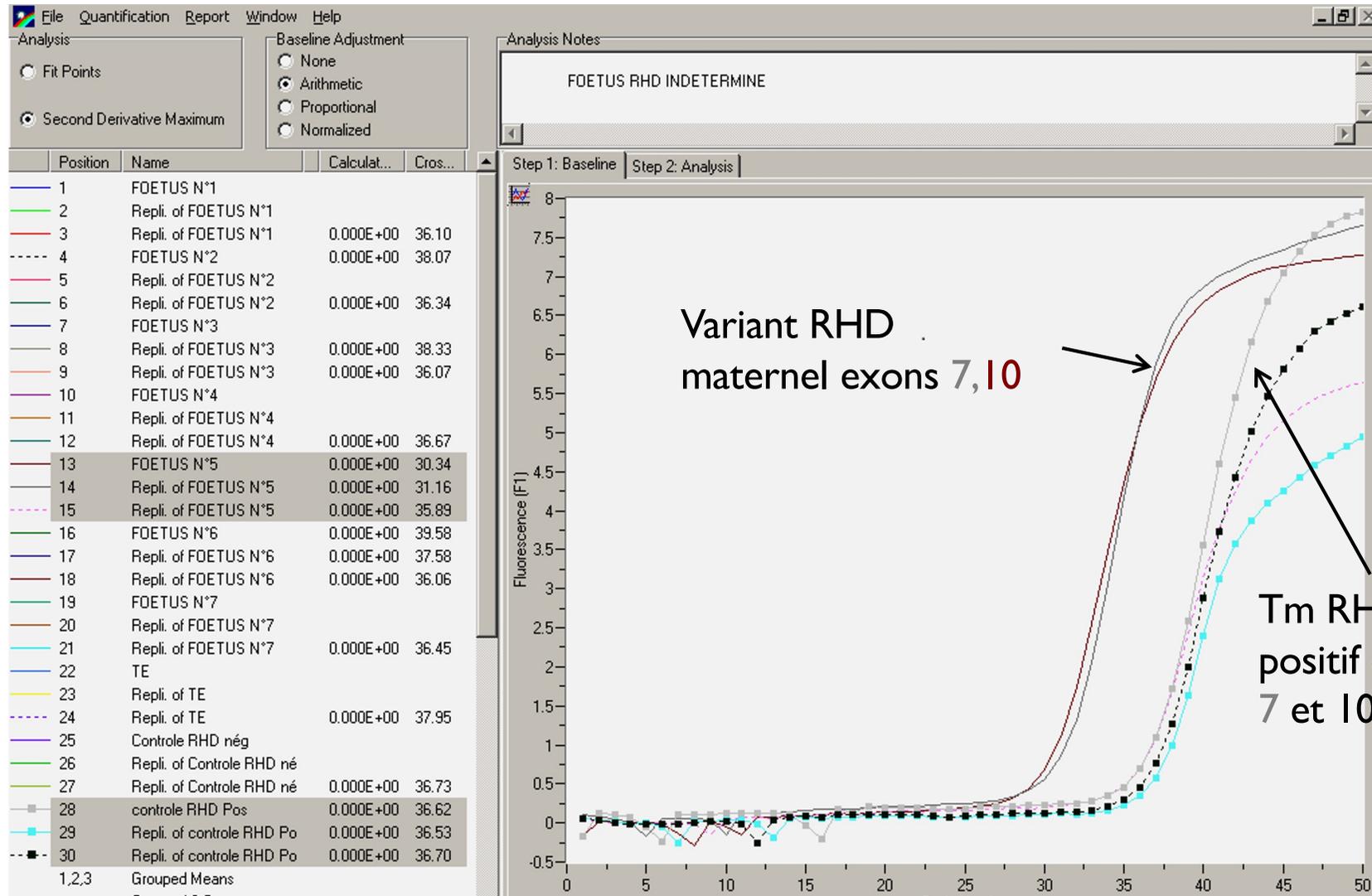
Résultats



Résultats



Résultats



Interprétation



Signaux Cp patient > Cp Témoin positif						
Exon 7 + Exon 10 +	Exon 7 + Exon 10 -		Exon 7 - Exon 10 -		Exon 7- Exon 10 +	
	Nouvelle extraction		Fœtus RHD- à contrôler		Nouvelle extraction	
	si discordance				si discordance	
	NP + 2 semaines		NP + 2 semaines		NP + 2 semaines	
	Exon 7 + Exon 10 +	Exon 7 + Exon 10 -	Exon 7 - Exon 10 -	Exon 7 + Exon 10 +	Exon 7- Exon 10 +	Exon 7 + Exon 10 +
	Fœtus RHD+	Fœtus RHD+ Fœtus RHD indéterminé Q insuffisante ADN foetal	Fœtus RHD - confirmé	Fœtus RHD+	Fœtus RH D indéterminé Variant RHD probable	Fœtus RHD+



Interprétation

Signaux Cp patient < Cp Témoin positif exons 7 et 10	
Exon 7 + précoce Exon 10 + précoce	Exon 7 – OU + Exon 10 + précoce
Nouvelle extraction Confirmation variant maternel	
Maman RHD Ψ	Autre variant maternel

Exon 5 +		Exon 5-
Cp patient > Cp Témoin positif	Cp patient < Cp Témoin positif	
Fœtus RHD+	Fœtus RHD indéterminé	Fœtus RHD négatif ou variant



Expérience Lilloise

- ▶ Oct 2001 XXXI journées de la société française de médecine périnatale
 - ▶ 2007 Congrès SFTS :
 - Etude sur 262 échantillons de plasmas issus patientes enceintes RH:-I
 - Développement d'une méthode « Maison »
 - Extraction manuelle
 - Amplification Light cycler 2.0 | seul exon 10 :2 duplicats
 - Spécificité 95,2% et Sensibilité de 98,5%
 - ▶ 2009 Congrès SFTS
 - Etude comparative « Méthode maison » Lilloise et le Free DNA fetal kit RHD J. Boy sur 48 prélèvements
 - ▶ Etude GENIFERH Mars 2009 à janvier 2013
 - Partenariat Maternité Jeanne de Flandre
 - 557 inclusions entre le 16/03/2009 et le 06/06/2011
-



Etude Géniferh

- ▶ Evaluation médico économique d'une **application systématique** au suivi des grossesses des femmes RHD négatif d'un test de génotypage RHD foetal sur sang maternel
 - ▶ **Etude multicentrique:** collaboration des maternités et laboratoires organisés en CPDPN de l'APHP, des CH Lille, Marseille, Nantes, Poissy
-



Objectifs de l'étude

▶ Intérêt médical

→ Proportion de patientes non exposées aux Ig

→ Conditions cliniques et biologiques de faisabilité optimale

▶ Aspect économique

→ Prix de revient

→ Coûts induits et évités

▶ Aspect biologique

→ Bilan qualité : sensibilité, spécificité, robustesse, âge gestationnel...





Bilan Géniferh

- ▶ Attendu pour 2013
- ▶ Inscription du test à la NABM ?

