

L'Allo-Immunsation Fœto-Maternelle

Actualités

Allo-immunisation = réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène étranger

Production d'anticorps contre un antigène de groupe sanguin à la suite d'une **hémorragie foëto-maternelle (HFM)** pendant la grossesse

Fréquence de l'HFM

4 % dès le 1^{er} trimestre

12 % au 2^{ème} trimestre

45 % au 3^{ème} trimestre

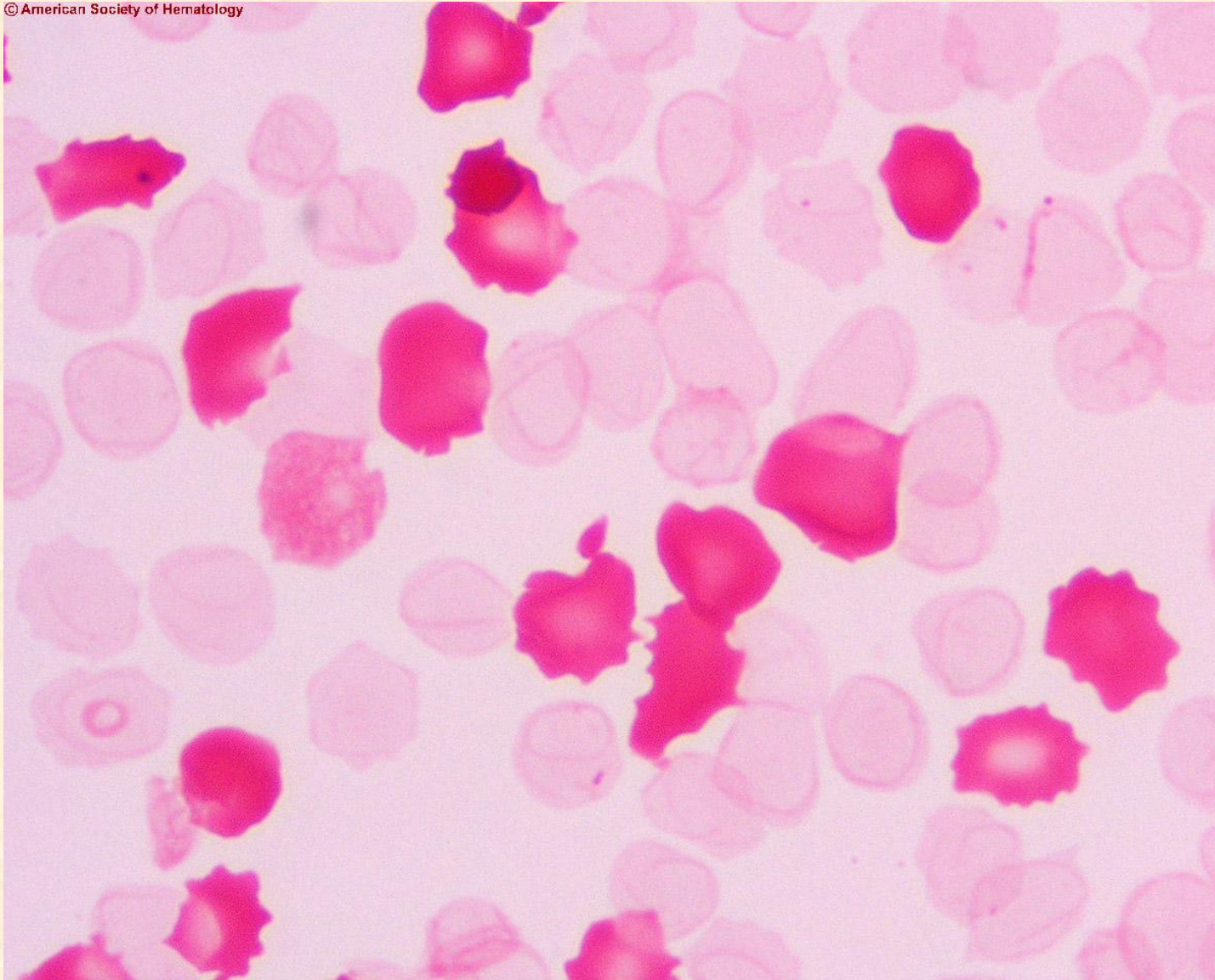
60 % à l'accouchement

Situations à risque hémorragique

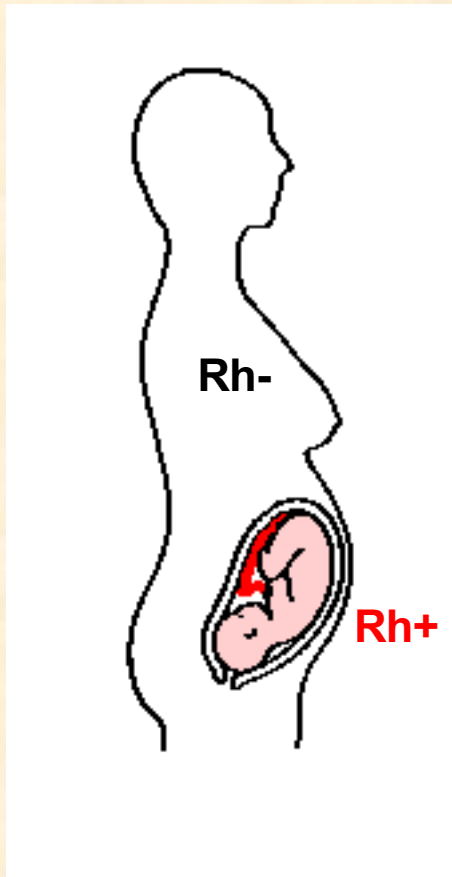
IVG, FCS, GEU, manœuvres, traumatisme

Estimation du volume de l'HFM par le test de KLEIHAUER

© American Society of Hematology



L'Allo-Immatisation Fœto-maternelle (AIFM)



GROSSESSE INDEX

Passage d'hématies fœtales dans la circulation maternelle (3^e T. et accouchement)



Réponse primaire

Allo-immunisation maternelle

GROSSESSE INCOMPATIBLE SUIVANTE

Réponse secondaire

Réactivation et transfert des anticorps vers le fœtus



Maladie Hémolytique Fœtale et Néonatale (MHFN)

Anémie fœtale et néonatale

Ictère néonatal

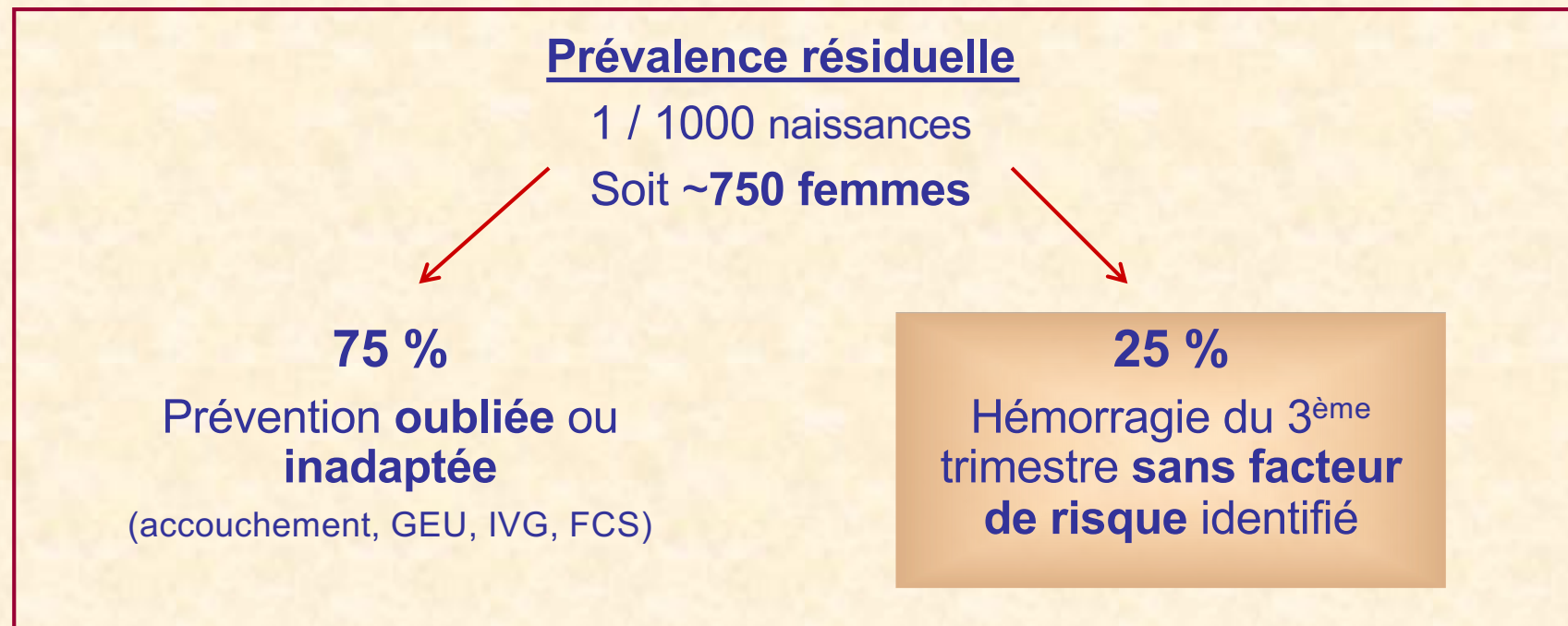
Les Anticorps en cause

Anti-D (RH1) ± anti-C (RH2)	70 % des cas dépistés 90 % des cas graves (TIU)
Anti-c (RH4) Anti-K (KEL1)	moins fréquents, parfois sévères
Anti-E (RH3)	fréquent, le plus souvent bénin (IgM souvent)
Anti-M (MNS1) Anti-Lewis (LE)	fréquent, jamais ou exceptionnellement dangereux (IgM)
Anti-Duffy (FY1) Anti-Kidd (JK1)	rares, le plus souvent bénins
Anti-publics	rares, gravité variable

Prévention ciblée
par injection d'IgG anti-D

- ✓ à l'accouchement si enfant Rh+
 - ✓ au cours de la grossesse si situation à risque hémorragique
- ⇒ **Élimination rapide des hématies fœtales Rh+ avant développement de la réponse immunitaire**

Épidémiologie de l'AIFM en 2004



Évolution de la prévention 2004 - 2005



COLLÈGE NATIONAL
DES GYNÉCOLOGUES
ET OBSTÉTRICIENS FRANÇAIS

Recommandation de **prévention systématique au 3^{ème} trimestre** chez toute femme Rh- dont le fœtus est connu ou présumé Rh+ (grade A)

Cette prévention **systématique** s'ajoute à la prévention **ciblée**

→ **Réduction de 60 à 80 % des immunisations** par rapport à la prévention « ciblée seule »

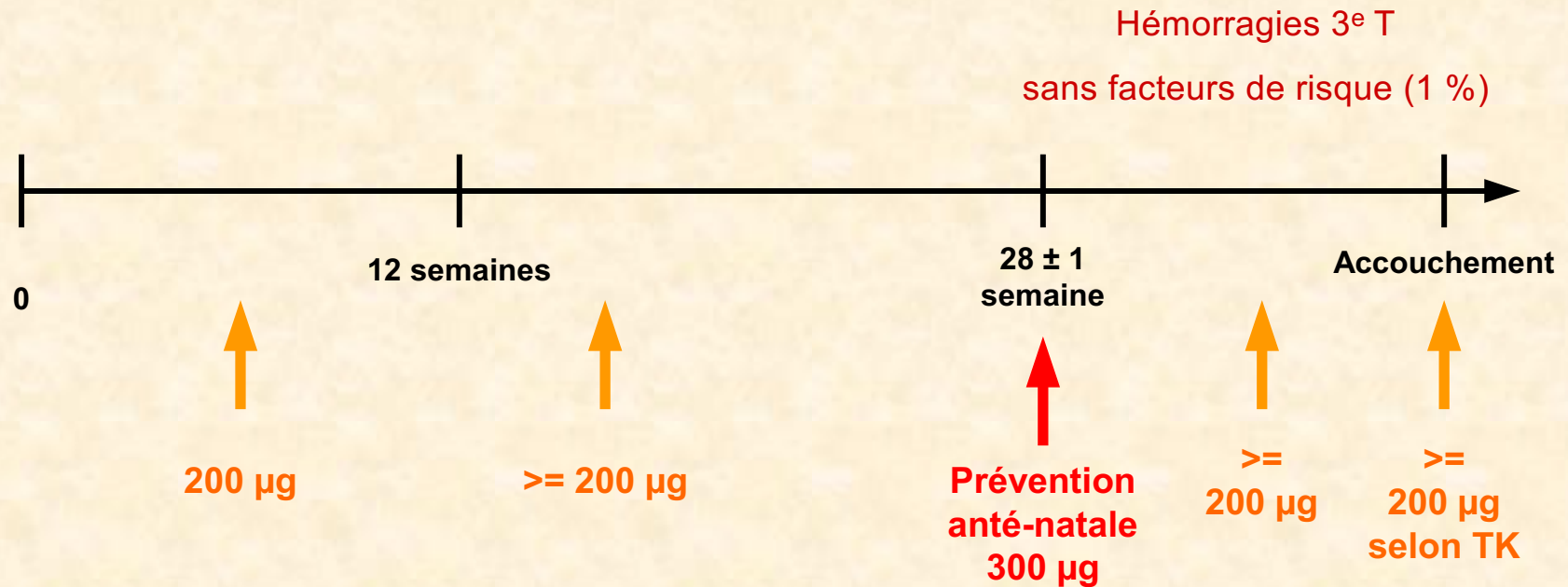
RHOPHYLAC® LFB

Nouvelle formulation d'Immunoglobuline anti-D (remplace le NATEAD)

Indication pour la prophylaxie systématique au 3^{ème} trimestre

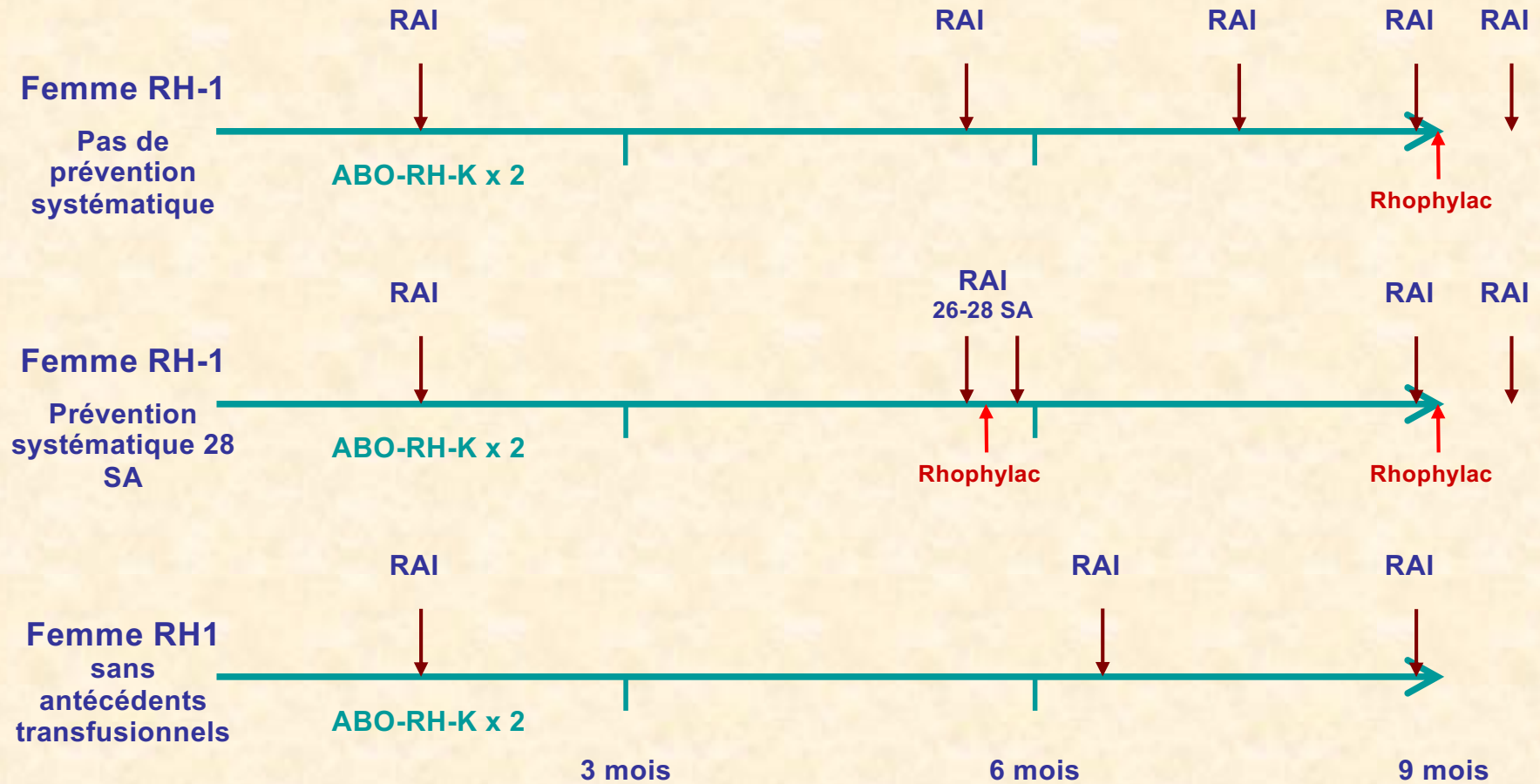
RHOPHYLAC® LFB

Schéma de prévention **ciblée** et **systématique**



Stratégie actuelle de dépistage de l'AIFM

La Recherche d'anticorps irréguliers (RAI)



Anticorps passif ou immunisation ?

30 % des identifications d'anticorps

N°	GENOTYPE	Rhesus						Kell				Duffy		Kidd		Lewis		MNS				P	Lutheran		Antigènes particuliers <i>special types</i>	RESULTATS RESULTS	
		D	C	E	c	e	Cw	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Fy ^a	Fy ^b	JK ^a	JK ^b	Le ^a	Le ^b	M	N	S	s	P ₁	Lu ^a	Lu ^b		N°	
		RH1	RH2	RH3	RH4	RH5	RH8	KEL1	KEL2	KEL3	KEL4	FY1	FY2	JK1	JK2	LE1	LE2	MNS1	MNS2	MNS3	MNS4	P1	LU1	LU2			
1/1P	R1wR1 : RH(1,2,-3,-4,5,8)	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	1/1P	+	
2/2P	R1R1 : RH(1,2,3,-4,5,-8)	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+	0	0	+	2/2P	+	
3/3P	R1R2 : RH(1,2,3,-4,5,-8)	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	3/3P	+	
4/4P	R2R2 : RH(1,-2,3,4,-5,-8)	+	0	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
5/5P	R0r : RH(1,-2,-3,4,5,-8)	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
6/6P	r'r : RH(-1,2,-3,4,5,-8)	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
7/7P	r'r : RH(-1,-2,3,4,5,-8)	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
8/8P	rr : RH(-1,-2,-3,4,5,-8)	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
9/9P	rr : RH(-1,-2,-3,4,5,-8)	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
10/10P	rr : RH(-1,-2,-3,4,5,-8)	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
11/11P																											
PATIENT																											



W = antigène faible/weak antigen

Ag HBS, Ac HIV 1+2, Ac HCV négatifs / HBsAg, HIV1+2 Ab HCV Ab negative

NOM / NAME:

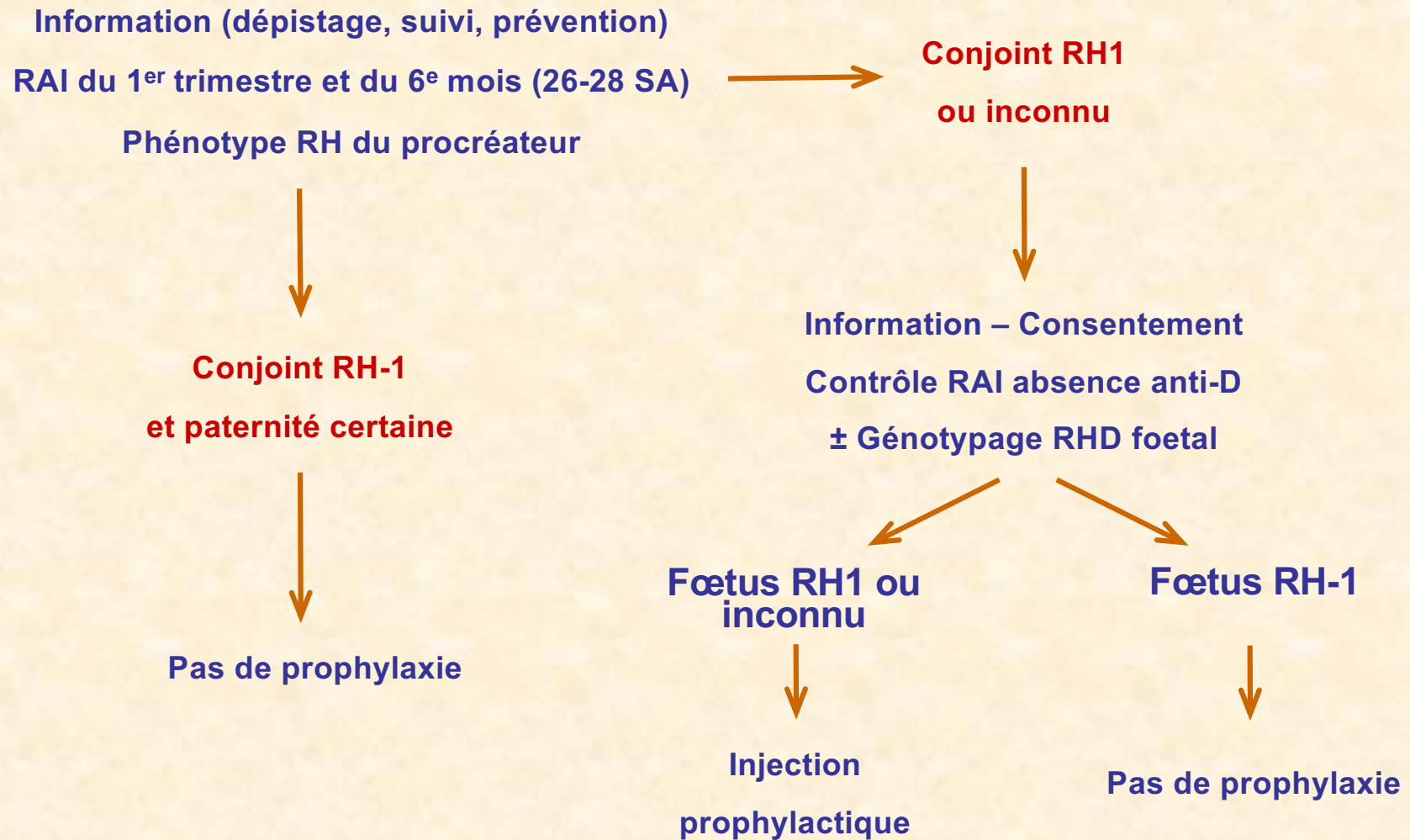
INTERPRETATION :

Anti-D

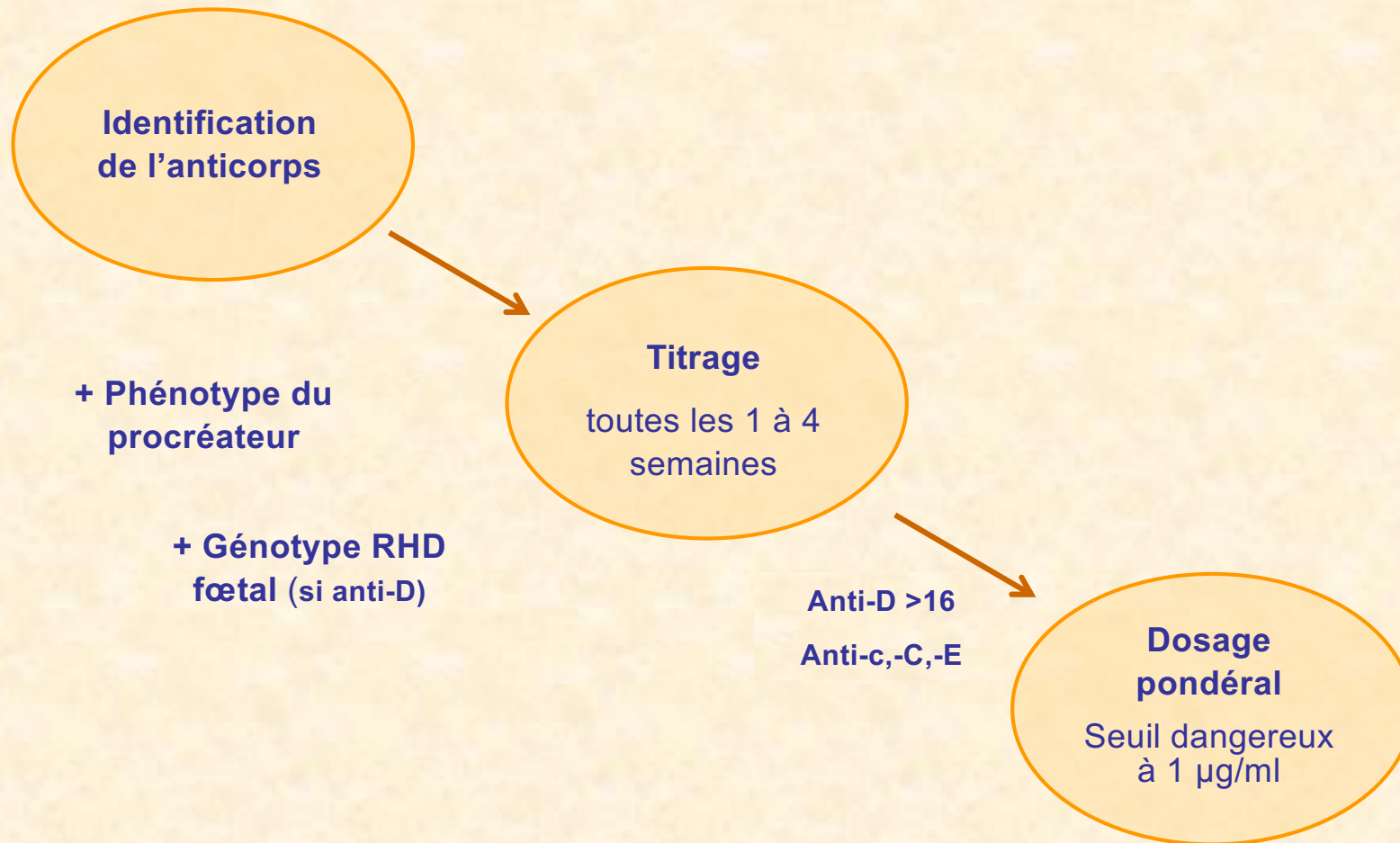
DATE D'ANALYSE / EXA

Notion d'injection, dose et date ? - Notion de RAI négative avant injection ?

Prévention primaire chez la femme RH-1 non immunisée

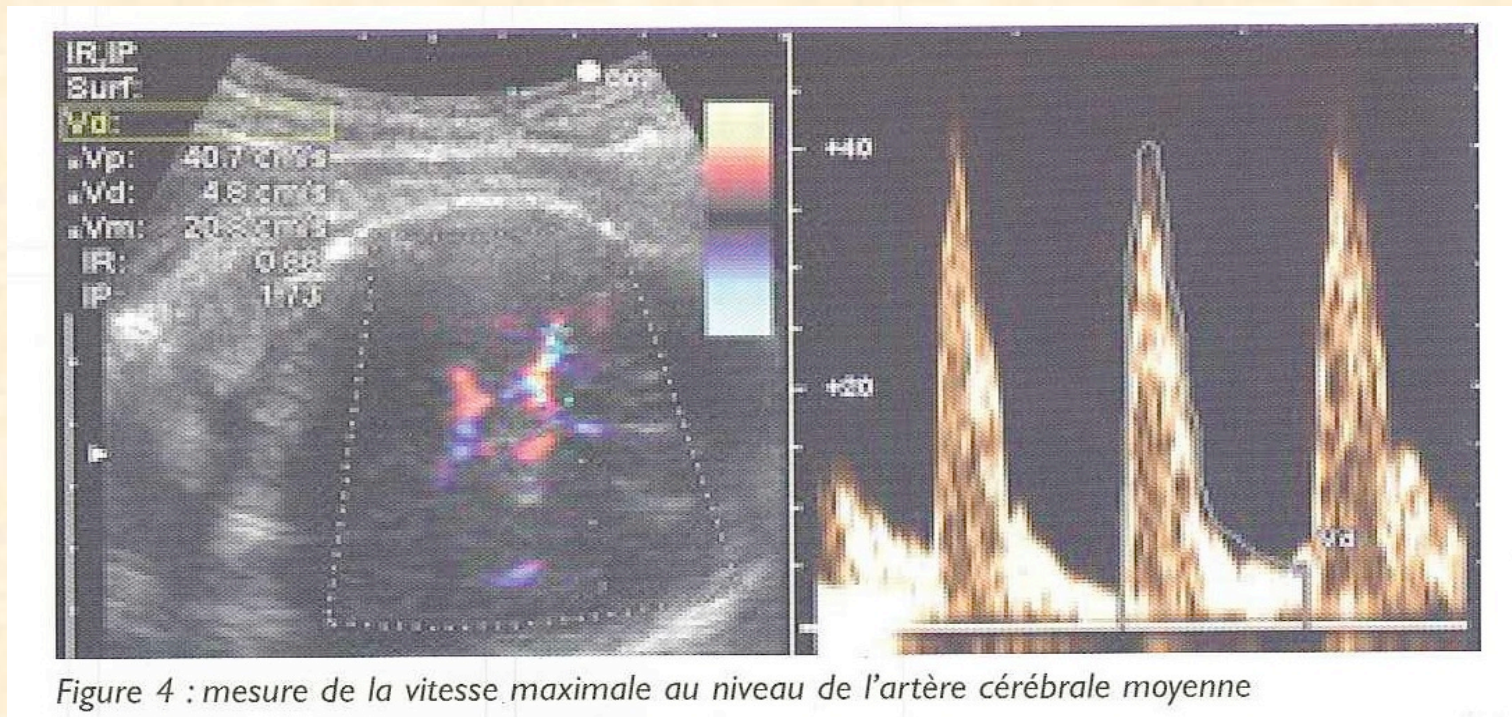


Suivi Immuno-Hématologique de l'immunisation



Surveillance clinique de l'atteinte foetale

- **Echographie** : signes d'anémie mais peu sensibles et tardifs
- **Doppler de l'artère cérébrale moyenne (VPS-ACM)**
- Rythme cardiaque foetal
- Amniocentèse pour génotypage et indice de Lilley
- Ponction de sang foetal



Prise en charge thérapeutique des grossesses immunisées

Mme Bou. Rh négatif - 3^e grossesse, **génotype fœtal RH1**

- Antécédent de **MFIU** per-partum par allo-immunisation anti-D. Absence de suivi.

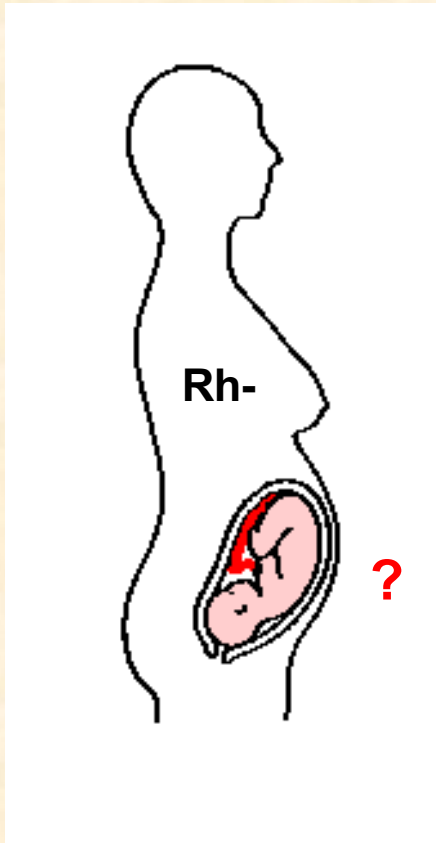
SA	19	21	25	27	28	29	30	30+5	3 semaines
Titre	128	128	128	256	128	256	256	512	
Pondéral (µg/ml)	4.00	3.63		3.74	3.51	3.95		4.45	
Echo	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	
VPS-ACM (MoM)	1.15	1.32	1.44	1.50	1.18	1.13	1.85	1.77	
Ht					19.4 → 25.3		20.4 → 26.3		
Hb (g/dl)								7.5	10.2
					↑ TIU		↑ TIU	↑ Extraction ET	↑ T

Prévention justifiée par le statut *RHD* foetal

Prévention systématique chez toutes les femmes Rh- (~160 000 / an) ?

Mais environ 40 % ont un enfant Rh- (65 000)

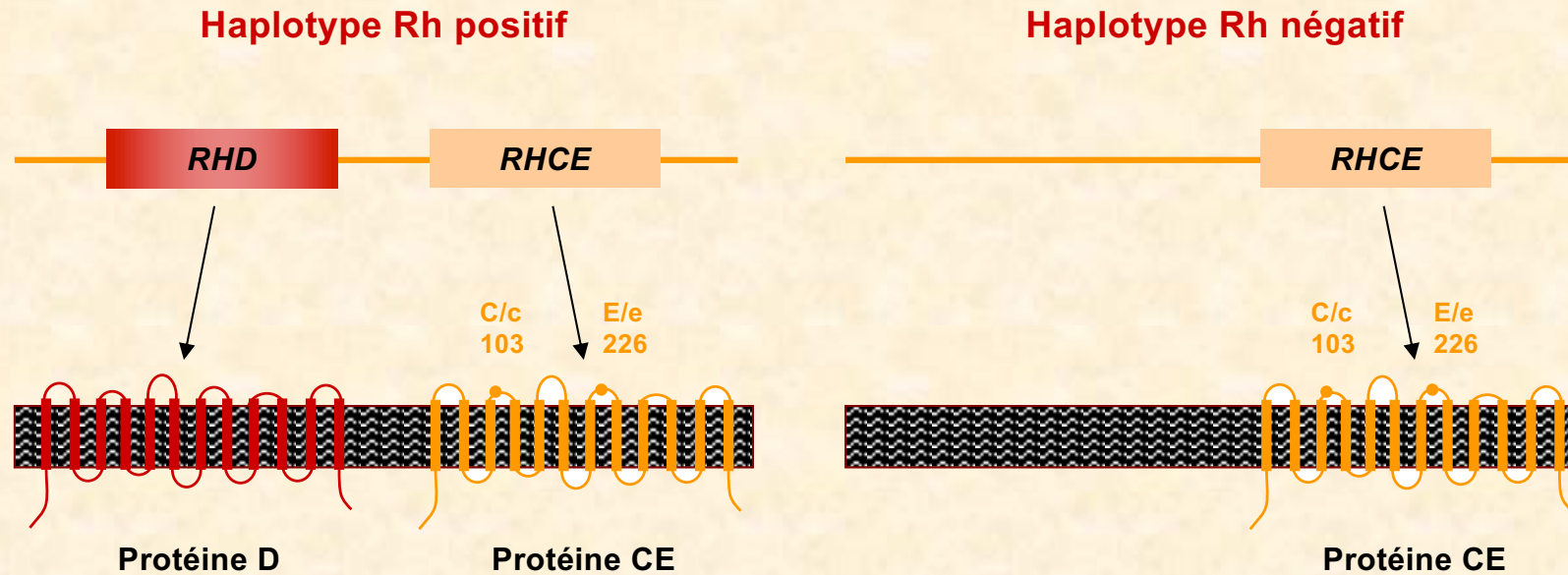
- ⇒ Problème de coût : 105 € la dose
- ⇒ Problème de sécurité : médicament dérivé du sang / agents infectieux



Moyens de détermination du statut *RHD* foetal

- ⇒ Phénotype paternel homozygote ou hétérozygote :
détermination statistique du « génotype le plus probable »
- ⇒ Phénotype foetal par cordocentèse ou biopsie trophoblaste :
risque d'HFM et risque foetal très élevés
- ⇒ Génotype foetal sur liquide amniotique à 17 - 20 SA :
risque élevé
- ⇒ Génotype foetal sur plasma maternel +++

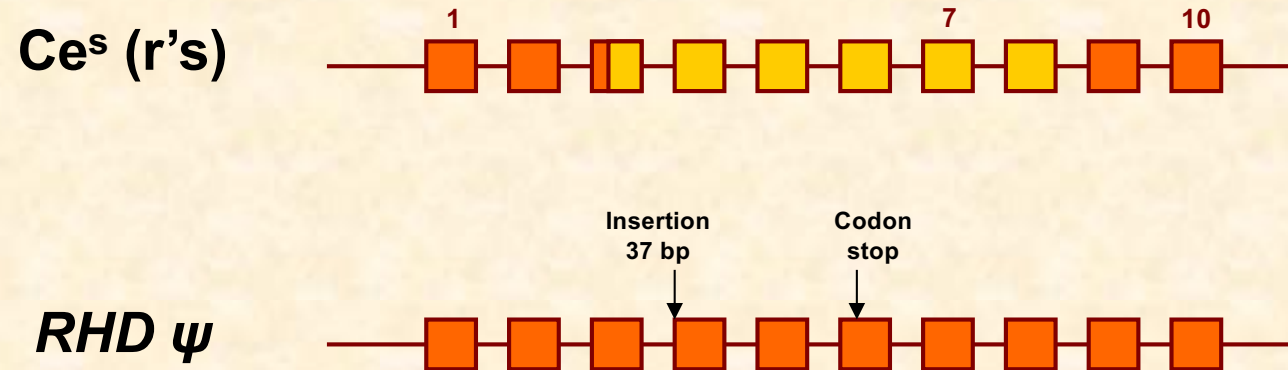
Les génotypes *RHD* positifs et négatifs « classiques »



Génotypes largement majoritaires chez les **caucasiens**

(fréquence de pseudogènes très faible (1/5000))

2 pseudogènes aberrants silencieux



Fréquents chez les **africains** (9 % de Rh -)

Discordance génotype / phénotype

Présence du gène *RHD* - Absence de l'antigène D

L'ADN foetal dans le plasma maternel

(Lo et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet, 1997)

- ⇒ **Origine placentaire** probable (corrélation ADN foetal / β HCG)
- ⇒ Détectable dès la **7^{ème} SG**. Augmente avec le temps avec des fluctuations importantes
(**1^{er} T** - 25 copies/ml, 3.4% ADN total; **3^{ème} T** - 90 copies/ml, 6.2% ADN total)
- ⇒ **Demi-vie très courte** (~16 h). Pas d'interférence avec la grossesse précédente.
- ⇒ **ADN fragmenté** (125 – 300 bp)

Nécessité d'une technique très sensible pour son analyse

Méthode de génotypage

⇒ **Extraction** sur colonnes **QIAamp® MinElute Virus Vacuum Kit** (Qiagen)

⇒ **Amplification** par PCR Temps réel sur **LightCycler® + Kit LC Taqman® Master** (Roche)

⇒ Kit de génotypage **Free DNA Fetal Kit® RhD** (IJB, marquage CE)

⇒ **Exon 7 RHD** (amorces et sonde)

⇒ **Exon 10 RHD** (amorces et sonde)

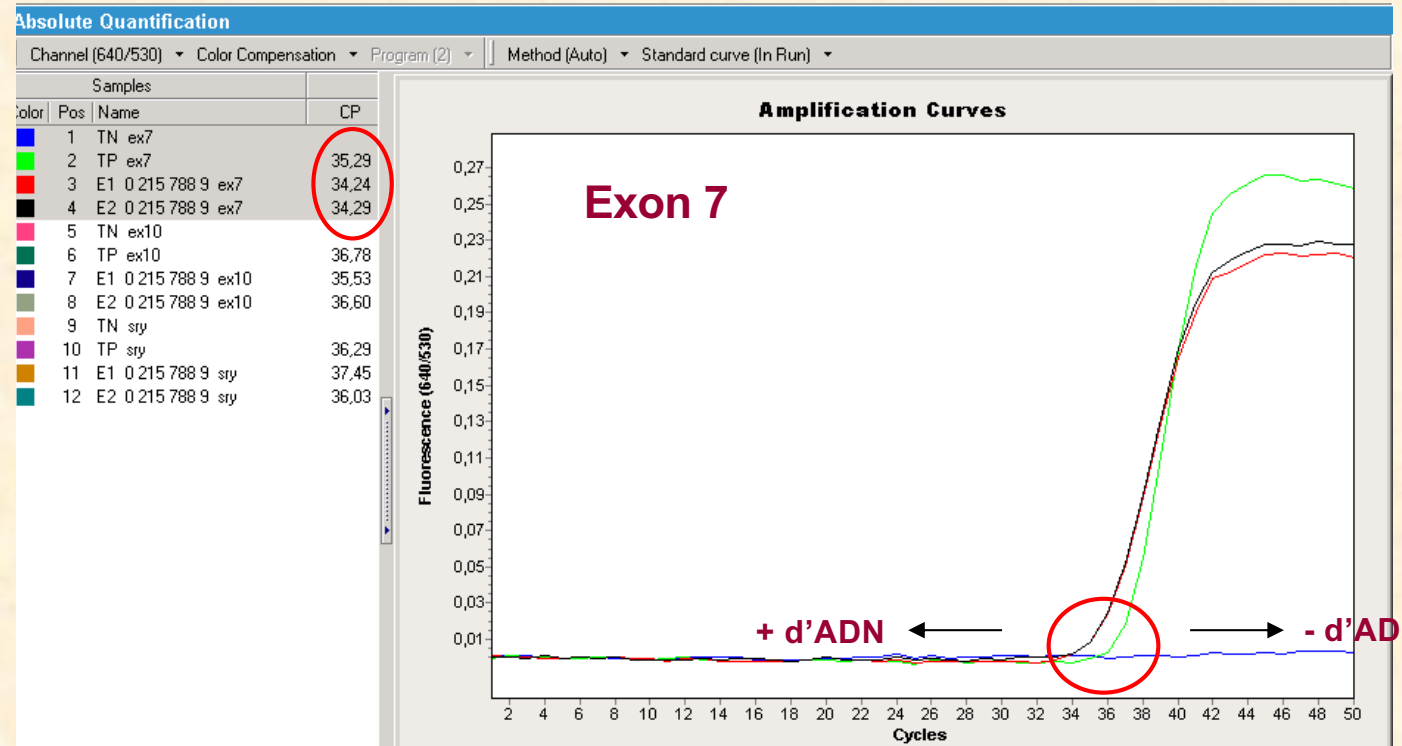
Séquences spécifiques et conservées (120 bp)
peu influencé par mutations et hybrides



⇒ Contrôle Maize DNA + exon *IVR2* Maize (amorces et sonde)

⇒ ADN contrôle *RHD* positif et négatif

Format de résultats



Crossing points (Cp) sur 20 témoins positifs :

exon 7 : 36.2 ± 0.6

exon 10 : 36.5 ± 0.7

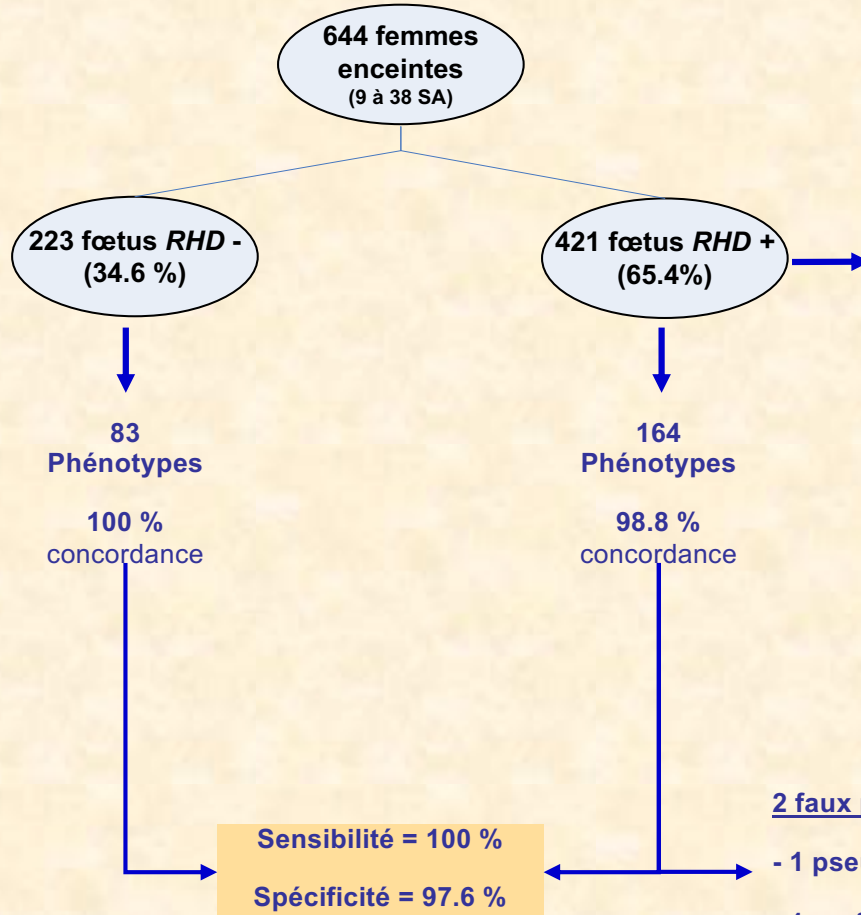
IVR2 : 34.7 ± 0.8

Interprétation des résultats - Limites de la méthode

<i>Résultats</i>		<i>Interprétation RHD</i>	<i>Conclusion</i>
<i>exon 7</i>	<i>exon 10</i>		
+	+	Génotype <i>RHD</i> positif	Génotype fœtal <i>RHD</i> positif
- (1 seul prélèvement après 12 SA)	-	Génotype <i>RHD</i> négatif	Génotype fœtal <i>RHD</i> négatif (à vérifier sur nouveau prélèvement 2 semaines après)
- (second prélèvement)	-	Génotype <i>RHD</i> négatif	Génotype fœtal <i>RHD</i> négatif
-	+	Génotype indéterminé (variant possible type Ce^s (RhD -), DIVb ou DBT (RhD +))	Génotype <i>RHD</i> fœtal indéterminé
+	+++ CP précoce	Mère <i>RhD</i> négatif avec allèle hybride Ce^s	Génotype fœtal <i>RHD</i> positif
-	+++ CP précoce		Génotype <i>RHD</i> fœtal indéterminé
+++ CP précoce	+++ CP précoce	Gène maternel silencieux de type <i>RHD</i>ψ Génotype fœtal indéterminé	Génotype <i>RHD</i> fœtal indéterminé

(Les témoins négatifs, positifs et maïs sont présumés conformes)

Résultats

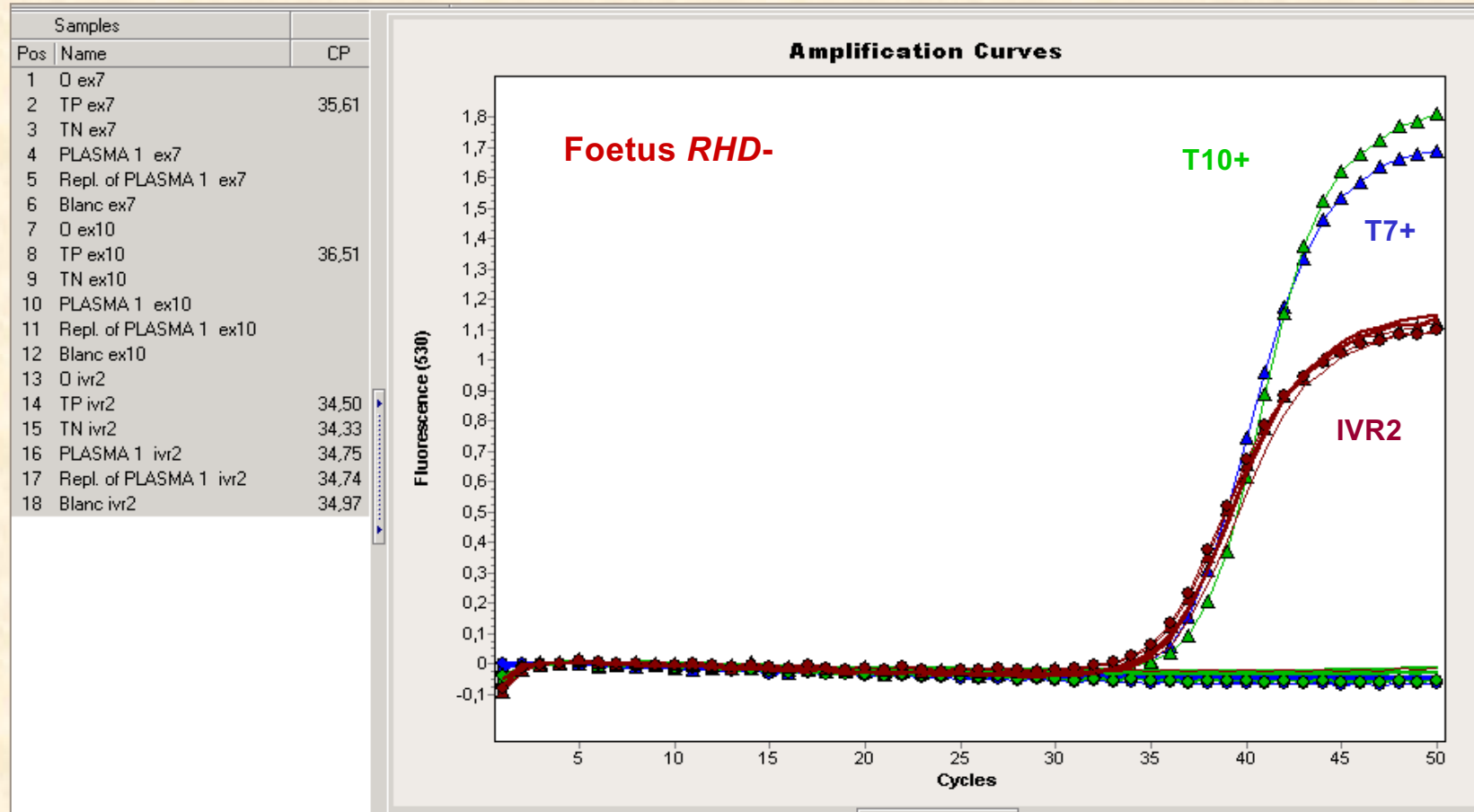


Ex 7 (Cp)	Ex 10 (Cp)	n	
> 34	> 34	401	Présence du gène <i>RHD</i>
-	> 34	1	Variant probable chez l'enfant. Phénotype RH1?
-	< 34	1	Variant d(C)ce ^s chez une africaine
> 34	< 34	5	Variant d(C)ce ^s (3 africaines, 1 antillaise, 1 européenne)
< 34	< 34	13	Pseudogène <i>RHD</i> _ψ probable chez 7 africaines, 1 variant type DEL, 1 D partiel type DVI, 1 D faible, 3 variants probables

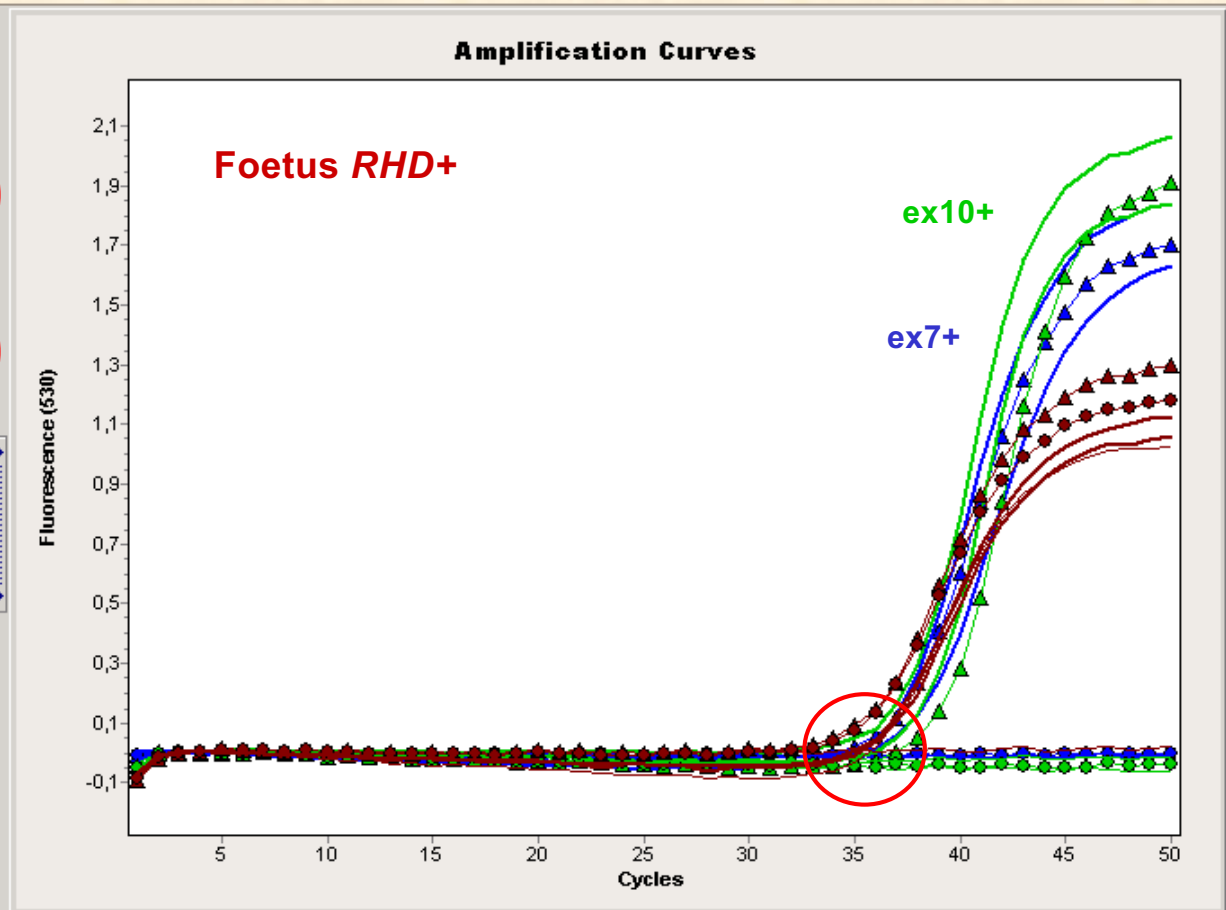
2 faux positifs :

- 1 pseudogène *RHD*_ψ probable chez un enfant africain (Cp Ex7 : 36.7; Ex10 : 36.5)
- 1 greffe hépatique donneur RH1 (Cp Ex7 : 36.9; Ex10 : 36.4)

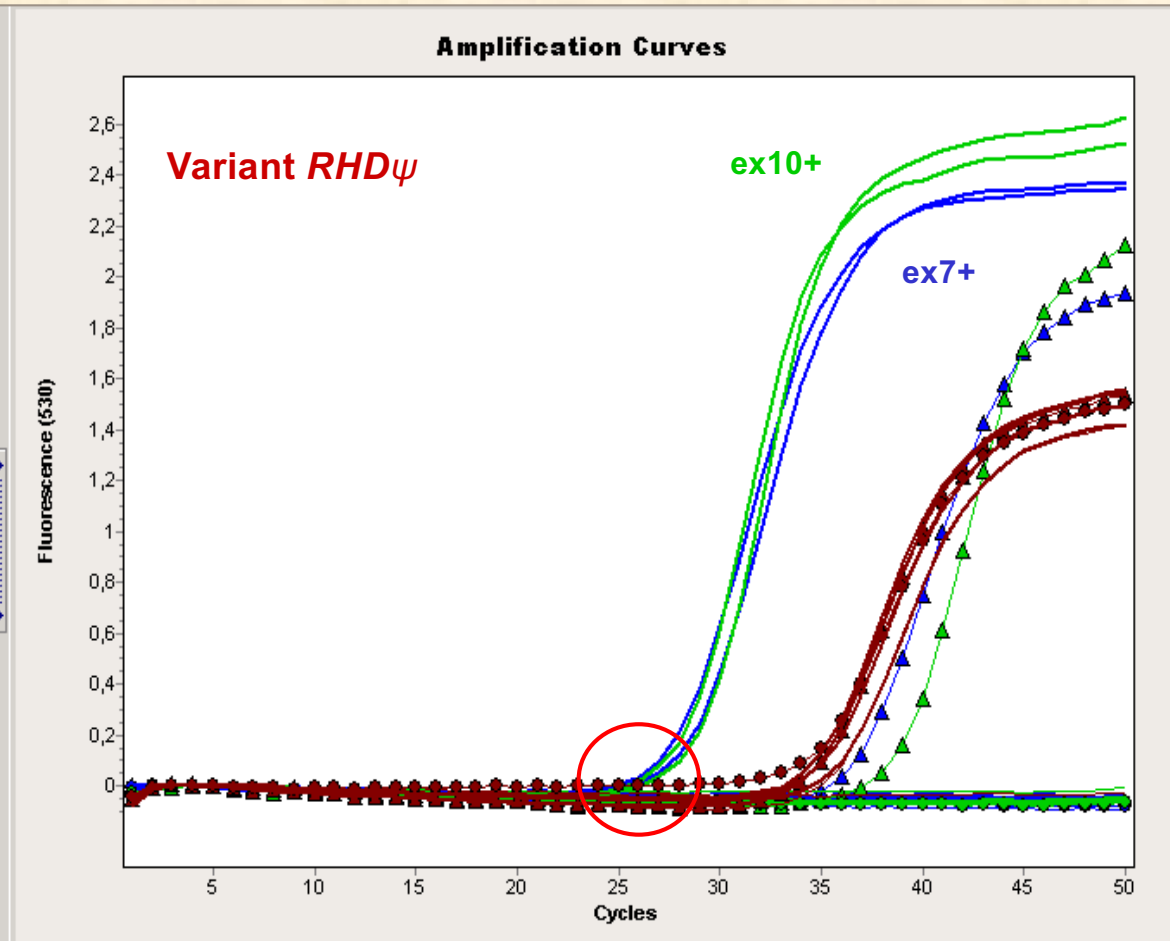
Résultats typiques



Samples		
Pos	Name	CP
1	0 ex7	
2	TP ex7	36,16
3	TN ex7	
4	PLASMA 2 ex7	35,91
5	Repl. of PLASMA 2 ex7	37,07
6	Blanc ex7	
7	0 ex10	
8	TP ex10	37,91
9	TN ex10	
10	PLASMA 2 ex10	36,26
11	PLASMA 2 ex10	36,98
12	Blanc ex10	
13	0 ivr2	
14	TP ivr2	34,75
15	TN ivr2	34,65
16	PLASMA 2 ivr2	35,15
17	Repl. of PLASMA 2 ivr2	35,28
18	Blanc ivr2	34,90



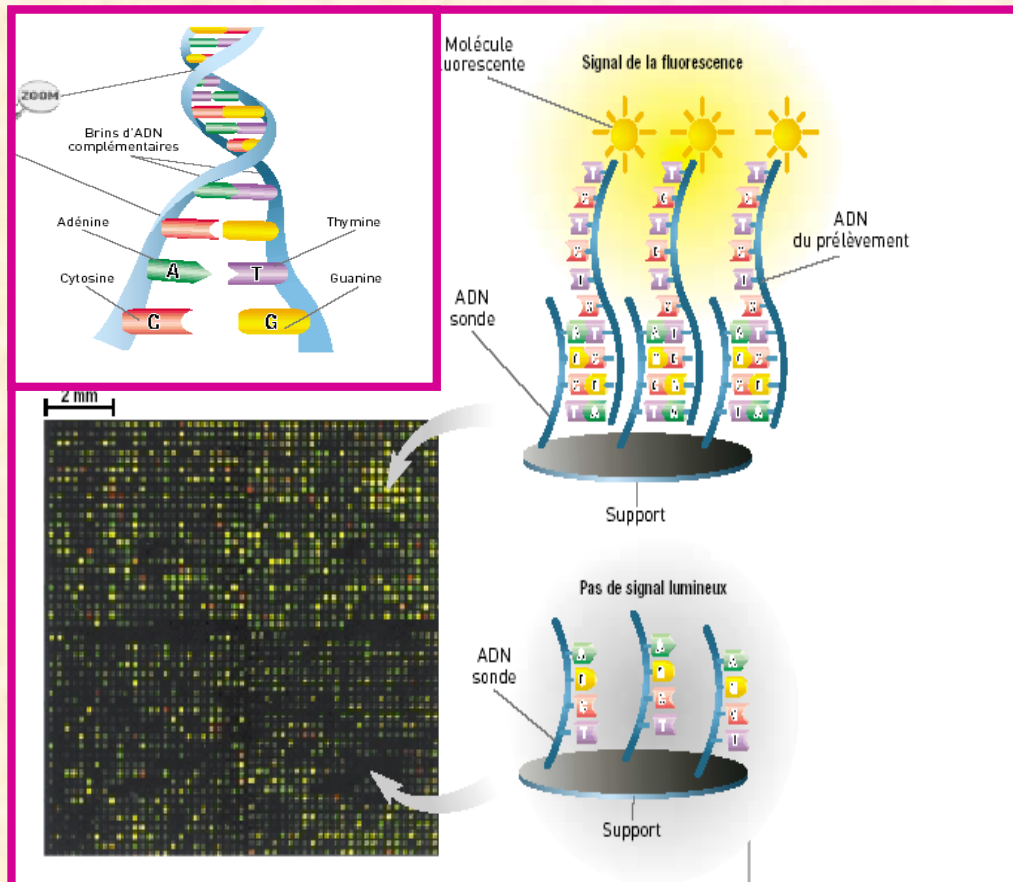
Samples		
Pos	Name	CP
1	0 ex7	
2	TP ex7	35,72
3	TN ex7	
4	PLASMA 4 ex7	
5	Repl. of PLASMA 4 ex7	
6	PLASMA 5 ex7	27,60
7	Repl. of PLASMA 5 ex7	26,82
8	Blanc ex7	
9	0 ex10	
10	TP ex10	37,75
11	TN ex10	
12	PLASMA 4 ex10	
13	Repl. of PLASMA 4 ex10	
14	PLASMA 5 ex10	27,85
15	Repl. of PLASMA 5 ex10	27,06
16	Blanc ex10	
17	0 ivr2	
18	TP ivr2	33,69
19	TN ivr2	33,95
20	PLASMA 4 ivr2	33,63
21	Repl. of PLASMA 4 ivr2	34,66
22	PLASMA 5 ivr2	33,57
23	Repl. of PLASMA 5 ivr2	33,90
24	Blanc ivr2	34,52



- ⇒ **Nombreuses publications** depuis la découverte de Lo *et al.* en 1997
- ⇒ **Spécificité > 95 %**. Pièges subtils (greffons *RHD+*)
- ⇒ **Applications**
 - ⇒ Justification de la prévention des AIFM,
 - ⇒ Justification de la prévention dans les situations à risque d'HFM,
 - ⇒ Pronostic foetal chez les femmes déjà immunisées,
 - ⇒ Diagnostic du **sexe foetal** (SRY) et Maladies liées à l'X (Hémophilie, Duchenne ...)
- ⇒ **Rapports isolés** : Steinert, thalassémies, HbE, Huntington, translocations chromosomiques,
- ⇒ Très récemment, **diagnostic de mutations ponctuelles** (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) : **Finning et al.** *Fetal genotyping for the K and Rh C, c, and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma. Transfusion, 2007*

Perspectives

- ⇒ **Automatisation et traçabilité** (extraction MagnaPure, amplification en microplaque)
- ⇒ **Témoin ADN foetal**
- ⇒ **Détection spécifique des variants *RHD***
- ⇒ **Nanotechnologies ?**



C. Fournier-Wirth, J. Coste.
Fitting new technologies into the safety paradigm: use of microarrays in transfusion
J. Biologicals 2007