



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université Henri Poincaré, Nancy I

École de Sages-femmes Albert Fruhinsholz

*L'intérêt du génotypage fœtal dans la prévention de
l'allo-immunisation fœto-maternelle [RH : -1]*

Mémoire présenté et soutenu par
Alison SANZEY

Promotion 2012

Travail réalisé

Sous la direction de **Madame Mardjane Nadjafizadeh**,
sage femme cadre enseignante à l'Ecole de Sages Femmes de Nancy

Sous l'expertise de **Madame le Docteur Christine Andre-Botte**,
médecin à l'Etablissement Français du Sang de Nancy

Dédicaces

A Madame Mardjane Nadjafizadeh, directrice de ce mémoire, pour son écoute, le temps et l'attention consacrés à ce travail.

A Madame le Docteur Christine André-Botte, experte de ce mémoire, pour ses précieux conseils et son investissement.

A Louna, Elisa et Léo, mes petits anges, pour ces bonheurs au quotidien qui nous ont donné la force d'avancer

A mes parents, à Sabrina et Jessica mes deux sœurs.

A Sabine, Anne, Pauline et Amélie, pour tous les moments difficiles, les épreuves et les réussites partagés au cours de ces 4 années.

Sommaire

Liste de abréviations.....	4
Introduction	5
Partie 1.....	7
1. Les groupes sanguins.....	8
1.1. Le système ABO [2]	8
1.2. Le système Rhésus [3]	9
2. L'allo immunisation foeto maternelle [RH :1] [5]	12
2.1. Définition.....	12
2.2. Epidémiologie [6]	12
2.3. Physiopathologie	13
2.4. Conséquences périnatales de l'AIFM [14]	18
2.5. Suivi et traitement des AIFM	19
2.6. Suivi immunohématologique de la grossesse et prévention [10], [18]	22
3. Le génotypage fœtal.....	33
3.1. Découverte de l'ADN fœtal libre circulant dans le sang maternel.....	33
3.2. Caractéristiques de l'ADN fœtal libre	34
3.3. Rapport de l'HAS [34]	37
Partie 2.....	40
1. Méthodologie de recherche.....	40
1.1. Choix du thème.....	40
1.2. Objectifs de l'étude.....	40
1.3. Les hypothèses.....	41
1.4. Description de l'étude.....	41
2. Présentation des résultats	43
2.1. Présentation des résultats de la première sous-étude : « évaluation du suivi des recommandations ».....	43
2.2. Présentation des résultats de la deuxième sous étude : « évaluation de coûts »	49
Partie 3.....	53
1. Limites et biais des études.....	54
1.1. Limites de nos études	54
1.2. Biais de nos études	54
2. Le non suivi optimal des recommandations du CNGOF de 2005	56
3. Le génotypage fœtal : une étude de coûts.....	62
Conclusion.....	77
Bibliographie.....	79
Tables des matières.....	84

Liste des abréviations

AG : Age Gestationnel

AIFM : Allo-Immunsation Fœto-maternelle

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

CNGOF : Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français

CNRHP : Centre National de Recherche en Hémobiologie Périnatale

DAT : Diamètre Abdominal Transverse

DIM : Département d'Informations Médicales

EFS : Etablissement Français du Sang

HAS : Haute Autorité de Santé

HFM : Hémorragies Foeto-Maternelles

IgG : Immunoglobulines de type G

IgM : Immunoglobulines de type M

MRUN : Maternité Régionale Universitaire de Nancy

PCR : Polymerase Chain Reaction

PSL : Produits Sanguins Labiles

RAI : Recherche d'Agglutinines Irrégulières

RPC : Recommandations pour la Pratique Clinique

SA : Semaines d'Aménorrhées

STIC : Soutien aux Techniques Innovantes et Coûteuses

TK : Test de Kleihauer

Introduction

L'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D (anti [RH : 1]) est rare mais reste la plus fréquente des incompatibilités fœto-maternelles avec une prévalence de 0.9 pour mille. Elle concerne les femmes [RH :-1] enceintes d'un fœtus porteur de l'antigène D ([RH :1]). En France, chaque année, 160 000 à 180 000 femmes enceintes sont exposées au risque d'allo-immunisation.

Malgré une prophylaxie par injection d'Immunoglobulines spécifiques anti-D mise en place dans les années 70, cette pathologie n'est pas totalement abolie et concerne encore aujourd'hui 730 à 750 patientes par an en France.

Les moyens de dépistage et de diagnostic anténatal ont été et restent encore aujourd'hui invasifs : amniocentèse, cordocentèse, prélèvement de villosités choriales et peuvent être à l'origine d'une aggravation du processus d'allo immunisation voire d'une perte fœtale (de l'ordre de 1%).

C'est en raison de ces risques inhérents aux prélèvements invasifs que des procédures alternatives sont recherchées ; il a récemment été mis en évidence la présence d'ADN fœtal libre circulant dans le plasma maternel. Cette nouvelle source non invasive d'ADN fœtal laisse entrevoir de nouvelles perspectives de prise en charge de pathologies fœtales, notamment l'allo immunisation fœto-maternelle érythrocytaire grâce au génotypage fœtal rhésus sur sang maternel.

A travers notre expérience personnelle, nous avons pu constater que de nombreuses femmes [RH :-1] accouchaient d'enfants [RH :-1] également, et avaient été exposées inutilement à des produits dérivés du sang. Les données de la littérature précisent que près de 40% des patientes [RH :-1] seraient concernés par cette exposition inutile.

L'introduction du génotypage fœtal dans le suivi de ces patientes pourrait modifier nos pratiques quotidiennes en ciblant l'immunoprophylaxie aux patientes en ayant réellement besoin, sans en diminuer l'efficacité. Nous pensons que cela pourrait engendrer un allègement du suivi des patientes porteuses d'un fœtus [RH :-1], d'autant plus que les recommandations du CNGOF sont peu suivies et que les dernières données montrent que les allo-immunisations persistantes sont partiellement dues à des prophylaxies inadaptées.

Par ailleurs, les problèmes éthiques liés à l'injection de produits sanguins labiles sont importants mais les coûts engendrés sont également à prendre en compte lorsqu'une politique de prévention est mise en place. Nous supposons alors que l'utilisation du génotypage fœtal en routine quotidienne permettrait de réaliser des économies en terme de santé publique, à travers la diminution du nombre de RAI réalisées et du nombre de dose d'immunoglobulines spécifiques anti-D injectées et donc de diminuer le coût de la prévention de l'allo-immunisation.

Ainsi, nous évoquerons dans un premier temps l'allo-immunisation fœto-maternelle, sa physiopathologie, sa prévention et ses conséquences. Dans un même temps, nous exposerons les données actuelles de la littérature concernant le génotypage fœtal.

Dans un second temps, nous présenterons les résultats de notre étude sur le suivi des recommandations du CNGOF de 2005 par les praticiens de la Maternité Régionale Universitaire de Nancy. Puis, les résultats de notre deuxième étude relative aux coûts de la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle seront exposés.

Enfin, nous procéderons à la discussion et à l'analyse des résultats de nos études, notre objectif principal étant de mettre en parallèle les deux stratégies de prise en charge : avec ou sans génotypage fœtal.

Partie 1

...L'allo immunisation fœto-maternelle...ou comment une femme peut s'immuniser contre son bébé : mécanisme, conséquences, prévention et perspectives d'avenir...

1. LES GROUPES SANGUINS

Les groupes sanguins sont déterminés par un ensemble de molécules de surface cellulaire d'origine héréditaire et appelées antigènes. La majorité des antigènes de ces groupes sanguins peut être regroupée, sur des critères génétiques, au sein de systèmes [1].

Aujourd'hui on dénombre 30 systèmes de groupes sanguins (ABO, Rhésus, Kell, Duffy, MNS...) et 308 antigènes érythrocytaires.

Certains systèmes ont une large distribution tissulaire, comme le système ABO ; d'autres sont spécifiques aux globules rouges : c'est le cas du système Rhésus, qui nous intéresse dans l'allo-immunisation fœto-maternelle [RH : -1].

Certains systèmes dont les antigènes sont portés par les érythrocytes sont fortement immunogènes, en particulier ceux des systèmes Rhésus et Kell

1.1. Le système ABO [2]

Le système de groupe sanguin ABO a été le premier découvert en 1900 par Karl Landsteiner.

Il est défini par la présence ou non des antigènes A et B sur les hématies, leucocytes, plaquettes mais aussi sur la plupart des tissus et dans les sécrétions.

Dans le système ABO, les sujets possèdent des anticorps réguliers naturels dirigés contre l'antigène qu'ils n'expriment pas. Ils existent en dehors de toute stimulation fœto-maternelle ou transfusionnelle et n'ont aucune incidence fœtale.

Tableau I : Phénotype du système ABO [2]

Phénotype	Génotype	Antigène	Anticorps	Fréquence
A	A/A ou A/O	A	Anti B	45%
B	B/B ou B/O	B	Anti A	9%
AB	A/B	A et B	Absence d'anticorps	3%
O	O/O	Absence d'antigène	Anti A et Anti B	43%

1.2. Le système Rhésus [3]

Le système Rhésus a été découvert en 1940 par Karl Landsteiner et Alexander Wiener en immunisant des lapins avec des globules rouges d'un singe *Macacus Rhésus* et en identifiant dans leur sérum un anticorps actif sur les globules rouges de ces singes mais aussi sur les hématies de 85% des sujets humains testés.

Schématiquement, on distingue les sujets Rhésus D positif qui portent l'antigène D à la surface de leurs hématies et les sujets Rhésus D négatifs qui ne présentent pas l'antigène D, à savoir que les antigènes de ce système ne sont présents que sur les globules rouges. Les sujets Rhésus D négatifs, donc ne développant pas l'antigène D, représentent environ 15% de la population caucasienne ¹.

Ce système est constitué de deux gènes contigus *RHD* et *RHCE*, situés au niveau du chromosome 1p34-p36, correspondant à trois marqueurs membranaires : D ou rien (noté d), C ou c, E ou e. Ces 2 gènes *RHD* et *RHCE* sont des gènes homologues, c'est-à-dire présentant 96 % d'identité.

L'organisation très particulière de ces 2 gènes avec une orientation opposée "tête bêche" facilite les réarrangements géniques entre *RHD* et *RHCE* et l'apparition de gènes hybrides.

Ces gènes hybrides codent pour des protéines appelées variants RH qui sont à l'origine d'une modification de l'expression antigénique, sur lesquels nous reviendrons plus loin.

Le gène *RHD* code pour la protéine D [Rh :1] qui confère le rhésus positif lorsqu'elle est présente. A l'inverse, les sujets ne la possédant pas sont rhésus négatif [Rh:-1].

Le seconde gène *RHCE* porte les antigènes C, E, c, e en formant 4 combinaisons. Ces couples d'antigènes sont antithétiques : un sujet C- sera c+ est inversement.

¹ Population caucasienne : se dit d'une population présentant une couleur de peau claire et possédant des caractéristiques physiques de type européen.

Par la suite, nous n'utiliserons que la nouvelle nomenclature alphanumérique internationale du système rhésus :

Tableau 2 : Nouvelle nomenclature rhésus internationale [3]

	Ancienne	Nouvelle
Rhésus	D	RH1
	C	RH2
	E	RH3
	c	RH4
	e	RH5

Bien qu'il existe environ 50 antigènes dans le système Rhésus, les 5 précédemment cités sont les antigènes primordiaux, à connaître dans la pratique quotidienne.

Les antigènes du système Rhésus sont complètement développés à la naissance et surtout dès la 6^{ème} semaine de vie.

Dans le système Rhésus, on peut retrouver des anticorps immuns irréguliers car non systématique, en réponse à l'introduction d'un antigène étranger dans l'organisme (transfusion, grossesse...). Ils représentent 65 % des anticorps dépistés, et sont toujours capables de traverser activement le placenta : ils sont donc toujours potentiellement nocifs pour le fœtus si celui-ci possède l'antigène correspondant, susceptibles d'entraîner notamment des hémolyses in utero. L'Anti-D [RH :1] est encore l'anticorps le plus fréquemment rencontré et la cause de l'AIFM anti-érythrocytaire.

Les antigènes Rhésus et Kell étant connus immunogènes, il est recommandé de ne pas transfuser les femmes en âge de procréer avec des concentrés de globules rouges phénocompatibles pour ces systèmes.

Ceci permet en particulier d'éviter d'immuniser des femmes, qui développeraient par la suite un risque de pathologie périnatale en cas d'incompatibilité mère-enfant pour ces antigènes.

Il existe un fort polymorphisme de l'antigène D proposant différents variants. Plusieurs mécanismes moléculaires aboutissent à un phénotype [RH:-1] et à l'absence de production de la protéine RH1 [4] :

- ✓ antigène D délété : chez plus de 99% des sujets rhésus négatif, c'est la délétion complète du gène D qui en est l'explication. Le phénotype est alors négatif, et ne subsiste que le gène CE.
- ✓ antigène D partiel : il correspond à une expression partielle de l'antigène à la surface des hématies ; les sujets sont considérés [Rh :1] mais peuvent s'immuniser contre une fraction de l'antigène D qu'ils ne possèdent pas ; dès qu'une telle immunisation est constatée, ils seront considérés comme [Rh :-1].
- ✓ antigène D atténué (D^u) : il correspond à un affaiblissement quantitatif de son expression ; les sujets sont considérés [Rh:1] et ne s'immuniseront jamais.

Ces variantes peuvent être dues à une mutation nucléotidique, une substitution de séquence RhD par une séquence RhCE, à une insertion de nucléotides supplémentaires.

- ✓ pseudogène RhD Ψ : ce pseudogène est non fonctionnel : il y a introduction de 37 paires de base au niveau du gène, entraînant l'apparition d'un codon stop. La traduction du gène en protéine est donc impossible. Ce pseudogène est surtout fréquent chez les patients africains. Les sujets sont donc bien [Rh :-1] mais la recherche du gène D peut être infructueuse si elle ne couvre pas la région muette.
- ✓ gène hybride D-CE-D : il y a une conversion CE étendue sur le gène RHD aboutissant à un gène hybride.

2. L'ALLO IMMUNISATION FOETO MATERNELLE

[RH :1] [5]

2.1. Définition

L' AIFM Anti-D est rare mais reste la plus fréquente des incompatibilités fœto-maternelles. Elle concerne les femmes rhésus D négatif ([RH :-1]) enceintes d'un fœtus porteur de l'antigène D ([RH :1]).

Elle correspond à l'apparition d'anticorps anti Rh1 dans l'organisme maternel en réponse à la reconnaissance d'un antigène Rh1 dont il est dépourvu, provenant de l'organisme du fœtus.

Ces anticorps sont alors détectables lors des RAI et sont appelés anticorps irréguliers. Ils vont traverser la barrière placentaire, s'ils sont de type IgG, et avoir des conséquences plus ou moins graves sur le fœtus.

2.2. Epidémiologie [6]

En France en 2008, il y a eu 828400 naissances vivantes.(INSEE, 2008). En tenant compte du nombre des naissances qui est de 1.015 enfant par grossesse, le nombre de grossesse retenu est de 816162, auxquelles il faut ajouter le nombre de morts nés, 8838 en 2008 soit environ 825 000 grossesses. [7]. Pour obtenir le nombre de grossesses conçues, il s'agit d'inclure les fausses couches, les interruptions médicales et volontaires de grossesse, les grossesses extra utérines et les morts fœtales in utero. Cela porte à 1 300 000 :

- 15 à 20% des grossesses se terminent en fausses couches
- 227 050 interruptions volontaires de grossesse en France en 2007 [8]
- Les interruptions médicales de grossesse représentent 0.7% des grossesses avec nouveau-nés vivants ou morts : 5775 en 2008.

- L'incidence des grossesses extra utérines est de l'ordre de 100 à 175 pour 100 000 femmes entre 15 et 45 ans soit environ 2% des grossesses, ce qui équivaut à environ 16 000 en France en 2008. [9]
- 15% de la population caucasienne est [RH : -1], donc 15% des femmes enceintes sont également [RH :-1], soit environ 195 000 femmes enceintes exposées au risque d'allo immunisation rhésus. Attention cette valeur de 15% ne s'applique pas à toutes les régions du monde : 0.3% de la population asiatique et 7% de la population africaine seraient [RH :-1]. [6]
- La fréquence du gène RH1 étant de 0,6 dans la population française, le nombre annuel de femmes [RH :-1] avec fœtus [RH :1] serait de l'ordre de 115 000 (60%). [6]
- La prévalence de l'AIFM était de 10/1000 en 1971 contre 0.9/1000 en 2005 (RPC du CNGOF de 2005) ; on estime donc le nombre de femmes allo immunisées à 730-750 par an. [10]

2.3. Physiopathologie

2.3.1. Circonstances de survenue et passage transplacentaire des hématies fœtales [13], [14]

Pour que l'allo-immunisation se développe, il faut qu'il y ait contact entre le sang maternel, dépourvu de l'antigène D, et le sang fœtal, porteur de l'antigène D, aboutissant à une réaction immunitaire. On parle d'hémorragies fœto-maternelles.

Cette situation peut survenir à chaque trimestre de la grossesse et lors de l'accouchement mais sa fréquence de survenue dépend de l'âge gestationnel : 12% au premier trimestre, 45% aux deuxième et troisième trimestre, 60% à l'accouchement.

Le volume de l'HFM augmente également à l'approche du terme ; il n'excède pas 1 mL dans 96% des grossesses aux 1^{er} et 2^{ème} trimestre. 0.94% des femmes entre 30 et 39 SA ont un volume d'HFM supérieur à 2.5mL, 3% des accouchées supérieur à 5mL.

Les différentes causes de survenue d'HFM sont les suivantes [10]:

Tableau 3 : Circonstances pouvant induire des hémorragies fœto-maternelles au cours de la grossesse [10]

Au 1 ^{er} trimestre	Aux 2 ^{ème} et 3 ^{ème} trimestre
<ul style="list-style-type: none"> - Toute fausse couche ou menace de fausse couche - Toute interruption de grossesse médicale ou volontaire - Grossesse molaire - Grossesse extra-utérine - Métrorragies - Prélèvement ovulaire - Réduction embryonnaire - Traumatisme abdominal - Cerclage cervical 	<ul style="list-style-type: none"> - Interruption médicale de grossesse - Fausse couche tardive - Mort fœtale in utero - Version par manœuvres externes - Traumatisme abdominal - Placenta prævia, métrorragies - Intervention chirurgicale abdominale ou pelvienne - Menace d'accouchement prématuré - Prélèvement ovulaire - Accouchement voie haute ou basse

Il existe par ailleurs d'autres circonstances non obstétricales de survenue d'une immunisation : transfusion sanguine, greffe de tissu ou organe...

Le risque de développer une allo-immunisation chez une femme [RH: -1] est variable :

Tableau 4 : Risque de développer une allo immunisation chez une femme enceinte
[RH : -1]

Circonstances	Estimation du risque
Femme Rh-1 porteuse d'un fœtus Rh1	<ul style="list-style-type: none">- 1% avant la naissance du premier enfant (immunisation dans les deux derniers mois de grossesse)- 4 à 9% chez la femme ayant accouché (immunisation dans les 6 mois après accouchement)- 20% au cours de la deuxième grossesse avec un fœtus [RH :1] (si absence de prophylaxie)

Le diagnostic de l'HFM repose principalement sur deux examens et consiste à mettre en évidence des globules rouges fœtaux dans la circulation maternelle. Ces deux examens ne sont utilisés qu'à partir du 2^{ème} trimestre, le nombre d'hématies fœtales dans la circulation maternelle n'étant pas suffisant pour être comptabilisé.

Le plus utilisé est le test de Kleihauer-Betke qui est basé sur la différence de résistance à l'acidité de l'hémoglobine fœtale et l'hémoglobine maternelle, on compte ainsi les hématies fœtales intègres parmi les hématies maternelles dénaturées. Il faut néanmoins être vigilants, certaines hémoglobinopathies donnent des hématies alcooloresistantes et donc un aspect d'hématies fœtales circulantes. Il existerait cependant une variabilité inter observateur importante. Le résultat obtenu d'une hématie fœtale pour 10 000 hématies maternelles correspondrait à une HFM de 0.5mL.

Le deuxième examen utilisé est la cytométrie de flux qui utilise un double marquage de l'hémoglobine fœtale et des anticorps fœtaux. Elle distingue la chaîne γ de l'hémoglobine fœtale et l'anhydrase carbonique exprimée chez la mère. Ce test, utilisé en seconde intention, donne le compte absolu des hématies fœtales, et est souvent utilisé lorsque le test de Kleihauer est largement positif.

2.3.2. Réponse immunitaire primaire [13]

Elle survient après le premier contact avec l'antigène. Les premiers anticorps synthétisés sont des immunoglobulines de type M, ne passant pas la barrière placentaire. Leur apparition est lente : rarement avant 4 semaines, souvent entre 8-9 semaines, parfois même après 6 mois. C'est seulement après cette période de latence qu'apparaîtront les immunoglobulines de type G, plus durables et ayant la capacité de traverser la barrière placentaire.

Cette chronologie explique qu'une allo-immunisation primaire au cours d'une grossesse ne sera pas très délétère pour le fœtus (passage tardif des anticorps IgG). De plus, le volume de l'HFM est faible, l'HFM étant généralement maximale au moment de l'accouchement ; une RAI réalisée dans le post partum permettrait de savoir si une immunisation a eu lieu au moment de l'accouchement et de suivre différemment la grossesse suivante le cas échéant.

2.3.3. Réponse immunitaire secondaire [13]

Elle a lieu lors d'une seconde exposition au même antigène, souvent lors de la grossesse suivante. Elle est très rapide (24 à 48h après le contact) et aboutit essentiellement à la production des IgG par les lymphocytes ; la répétition de ces expositions augmente à chaque fois la rapidité de la réponse immunitaire.

2.3.4. Mode d'action des anticorps [13]

Les anticorps nouvellement synthétisés vont alors arriver dans la circulation fœtale, agglutiner les hématies porteuses de l'antigène et engendrer leur lyse.

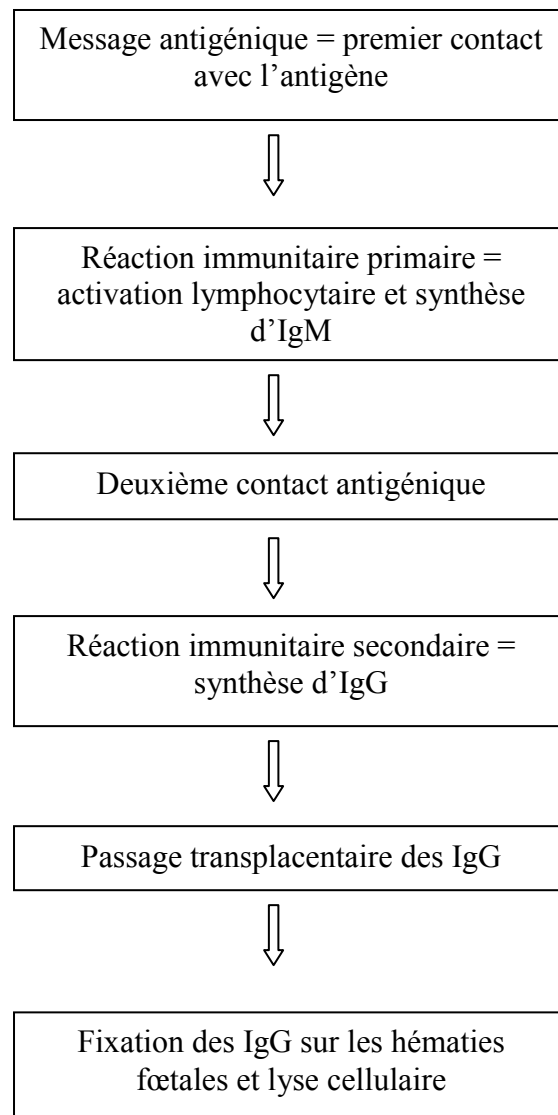
Le débit d'anticorps vers le fœtus dépend de la concentration maternelle en anticorps pathogènes et de la cinétique du transfert transplacentaire. Ce dernier s'effectue dès 16-17 SA mais reste faible jusqu'à 19 SA. Il augmente ensuite au cours de la grossesse pour aboutir en fin de grossesse à un taux d'IgG dans la circulation fœtale supérieur au taux maternel.

La fixation de l'anticorps sur la membrane érythrocytaire est fonction de la densité de l'antigène cible à la surface des hématies ainsi que de l'affinité de l'anticorps pathogène pour l'antigène. Ces deux processus expliquent la variabilité des atteintes pour un même taux d'anticorps.

L'hémolyse est réalisée par les macrophages du foie et de la rate qui captent les hématies par la partie Fc des anticorps fixés. L'importance de cette lyse est dépendante

de la concentration et de l'affinité des antigènes ainsi que de la structure de fragment Fc de l'immunoglobuline fixée ; le degré d'activation des macrophages est fonction de la sous-classe d'anticorps à laquelle appartient l'IgG.

Schématiquement, cela se résume ainsi :



2.4. Conséquences périnatales de l'AIFM [14]

L'hémolyse a pour conséquences deux processus en particulier :

- L'anémie, qui aura des retentissements importants pendant la vie fœtale
- L'hyperbilirubinémie qui a moins d'impact dans la vie intra utérine puisque l'organisme maternel se charge de l'éliminer. Le risque est néonatal, l'hyperbilirubinémie pouvant évoluer vers un ictère hémolytique voir nucléaire, avec toxicité irréversible sur les noyaux gris centraux.

Bien que le fœtus tolère une anémie relativement basse (jusqu'à 6 g/dL à 22SA ; la tolérance diminue avec l'AG), des mécanismes d'adaptation sont mis en place :

- Une hématopoïèse plus importante avec notamment une érythropoïèse augmentée, médullaire mais surtout extra médullaire. Ce phénomène peut provoquer une hépatosplénomégalie.
- L'anémie chronique entraîne une diminution du contenu en oxygène. Une adaptation circulatoire est nécessaire : augmentation du débit sanguin, redistribution du flux sanguin vers le cœur, le cerveau

En l'absence d'installation des mécanismes compensatoires, on assiste au développement d'un anasarque, au diagnostic essentiellement échographique, dont on distingue deux stades [16] :

✓ *Le stade précoce ou fonctionnel :*

Il présente un anasarque débutant (un ou plusieurs signes présents):

- Epanchement des séreuses (plèvre, péricarde...)
- Hydramnios
- Œdème cutané
- Hépatosplénomégalie (augmentation du DAT)
- Hypertrophie placentaire
- Diminution de la vitalité fœtale

A ce stade, la régression de l'anasarque peut être obtenu rapidement après traitement in utero.

✓ *Le stade tardif ou lésionnel*

L'anasarque fœto-placentaire est confirmé avec tous les signes précédemment évoqués, altération des échanges gazeux transplacentaires, troubles de la coagulation (thrombopénie, érythroblastose périphérique, diminution de la pO₂ veineuse ombilicale...) témoignant de lésions cellulaires.

Figure 1 : Ascite fœtale généralisée



Tiré de : *Le point sur le suivi des allo-immunisations érythrocytaires. Gynécologie Obstétrique et Fertilité, 2010 ; n°35, p.205-213*

L'anasarque peut s'expliquer par plusieurs facteurs :

- On a une érythropoïèse hépatique donc une diminution de la synthèse des protéines, menant à une diminution de la pression oncotique plasmatique et à une fuite d'eau du secteur vasculaire.
- L'hématopoïèse hépatique provoque une congestion hépatique à l'origine d'une hypertension portale.
- Des lésions capillaires et cellulaires sont observées, causées par l'hypoxie ; on a donc une augmentation de la perméabilité aux fluides et aux protéines.

2.5. Suivi et traitement des AIFM

2.5.1. Suivi et prise en charge des AIFM [16]

La surveillance des AIFM est principalement échographique, et permet de dépister les signes d'aggravation de l'anémie fœtale, qui conduiraient à une surveillance plus invasive.

Les échographies sont à réaliser tous les 15 jours voire toutes les semaines en situation à risque.

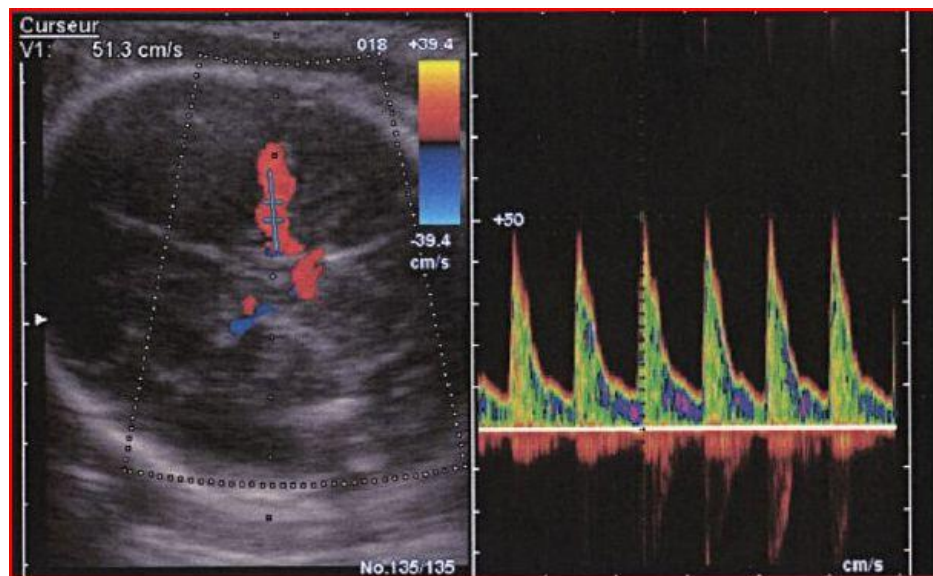
Outre la recherche d'épanchement des séreuses, d'un œdème cutané, d'une hypertrophie placentaire, l'échographie s'intéresse aux résistances placentaires qui sont diminuées et

à la vélocimétrie cérébrale. L'étude du pic de vitesse systolique de l'artère cérébrale moyenne permet de prédire le degré d'anémie. L'augmentation de la vitesse, liée à la diminution de la viscosité sanguine, est bien corrélée au taux d'hémoglobine [17]. Cet examen reste le plus fiable pour mettre en évidence une anémie fœtale. De plus, n'étant ni invasive, ni dangereuse, cette méthode fiable peut facilement être répétée.

L'interprétation des résultats se fait de la manière suivante :

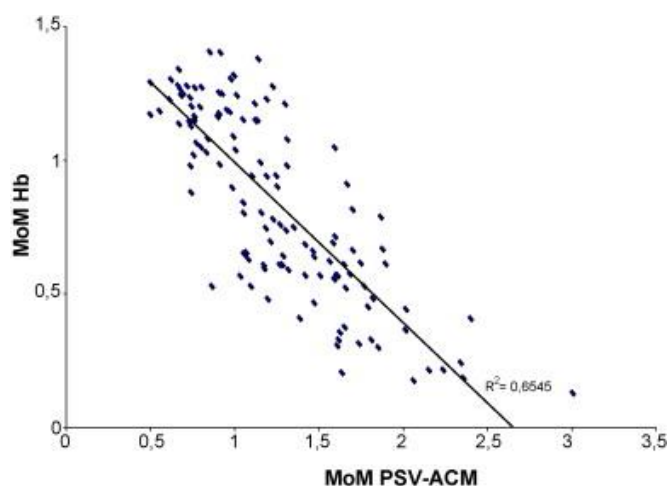
- Le fœtus est considéré comme significativement anémié à partir de 1,5 MoM. Il doit être vu par un service spécialisé et aura alors une ponction de sang fœtal pour doser son taux d'hémoglobine et immédiatement le transfuser si nécessaire.
- En cas de Rhésus avec un PSV situé entre 1 et 1,5 MoM, il faut impérativement faire un suivi rapproché toutes les semaines et même 2 fois par semaine si on est près de 1,5 MoM car on connaît la rapidité avec laquelle la situation peut décompenser.

Figure 2 : Mesure du pic systolique de vitesse dans l'artère cérébrale moyenne



Tiré de : *Le point sur le suivi des allo-immunisations érythrocytaires. Gynécologie Obstétrique et Fertilité*, 2010 ; n°35, p.205-213.

Figure 3 : Corrélation entre le PSV-ACM et le taux d'hémoglobine fœtale,
tous deux exprimés en multiples de la médiane



Tiré de : *Intérêt pratique du pic systolique de vélocité à l'artère cérébrale moyenne dans la prise en charge des anémies fœtales par allo-immunisation érythrocytaire. Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction ; 2008, Vol. 37, n° 2, p.163-169.*

En cas de doute, une amniocentèse peut être réalisée. Ce geste est de moins en moins utilisé car il met en évidence l'hyperbilirubinémie mais n'est pas le reflet direct de l'anémie fœtale. Elle est très rarement utilisée dans cette indication là. Outre la détermination du phénotype érythrocytaire du fœtus, nous pouvons évoquer à titre historique la détermination de l'indice optique de Liley. L'hyperbilirubinémie provoquée par l'hémolyse entraîne une augmentation de la densité optique dans le liquide amniotique. La différence entre la longueur optique mesurée et la valeur de référence constitue l'indice optique de Liley.

Le prélèvement de sang fœtal par cordocentèse est rarement réalisé pour cette indication mais une numération formule peut être réalisée sur un prélèvement réalisé dans le cadre d'un diagnostic prénatal son indication est rigoureuse et réservée aux formes sévères.

L'enregistrement du rythme cardiaque fœtal, qui devient sinusoïdal, et la diminution des mouvements actifs fœtaux ne sont pas des critères à prendre en compte en première intention puisqu'ils n'apparaissent généralement qu'à des stades déjà sévères de la maladie.

2.5.2. Thérapeutiques intra-utérines

Une anémie fœtale $\leq 7\text{g/dL}$ au deuxième trimestre et $\leq 8\text{g/dL}$ au troisième trimestre peut être traité in utero, et ce jusqu'à 34 SA.

Autrefois, il s'agissait de transfusion intra péritonéale (injection échoguidée d'hématies compatibles dans la cavité péritonéale), mais cette technique risquée est utilisée uniquement dans des situations extrêmes et pour des cas très limités.

On opte plus aisément pour les transfusions intravasculaires, notamment l'exsanguino transfusion qui consiste à remplacer totalement un culot globulaire après soustraction de la même quantité de sang. L'objectif est d'atteindre un taux d'hémoglobine à 14g/dL cas d'anasarque, 16g/dL si le fœtus n'est pas hydropique. La fréquence des exsanguino transfusion est environ une fois par mois.

Parfois, après 34 SA, l'extraction fœtale est recommandée.

2.5.3. Thérapeutiques postnatales

La bilirubine in utero est éliminée par l'organisme maternel. A la naissance, l'hémolyse se poursuit au-delà de 3 mois, parfois même jusqu'à 6 mois. Or, le nouveau né possède une immaturité hépatique l'empêchant d'éliminer sa bilirubine. Cela peut conduire à un ictère hémolytique.

Après l'accouchement, le nouveau né nécessite une surveillance clinique (teint, hépatosplénomégalie) et paraclinique (groupe sanguin, test de coombs, bilirubinémie, numération formule sanguine).

Le traitement de l'ictère se fait par photothérapie ou exsanguino transfusion dans les situations les plus extrêmes ou lorsque l'anémie est inférieure à 12g/dL .

2.6. Suivi immunohématologique de la grossesse et prévention [10], [18]

Il est déterminé légalement par l'Arrêté du 19 avril 1985 (JO du 30 mai 1985) relatifs aux examens pré et postnataux, par le décret n° 92-143 du 14 février 1992 (JO du 18 février 1992), relatifs aux examens obligatoires prénuptiaux, pré et postnataux, par l'arrêté du 26 avril 2002 (JO du 4 mai 2002) modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.

Pour mémoire, l'examen prénuptial n'est plus obligatoire, l'examen préconceptionnel pourrait bientôt le remplacer.

Les patientes rhésus négatif doivent être informées dès le début de grossesse ses modalités de surveillance liées à leur phénotype Rhésus D, des risques encourus et des traitements qu'elles pourront recevoir.

La surveillance immunohématologique a 4 objectifs :

- Dépister l'allo-immunisation
- Surveiller son évolution
- Assurer la sécurité transfusionnelle
- Réaliser la prophylaxie Rhésus.

2.6.1. Le dépistage

Détermination du typage érythrocytaire ABO-RH-KELL : si la patiente n'est pas en possession d'une carte de groupe sanguin valide, une première détermination doit être effectuée lors du premier examen prénatal, et une deuxième lors du 6^e ou du 7^e examen prénatal (soit au 8^e ou au 9^e mois de grossesse) de façon à disposer d'une carte ou d'un document de groupe sanguin « définitif » pour la délivrance.

Recherche des agglutinines irrégulières [19] : cela consiste à mettre le sérum du patient en contact avec un panel de globules rouges-test phénotypés dans tous les systèmes de groupes sanguins et à utiliser les différentes techniques d'agglutination. Cela permet de conclure à la présence ou l'absence d'un anticorps irrégulier. En cas de résultat positif, il faut alors identifier l'anticorps présent et le titrer sans attendre. Il faut savoir que la fréquence des RAI positives augmente avec la multiparité.

Après identification et titrage du ou des anticorps impliqués, l'EFS adresse au clinicien qui suit la patiente un courrier qui dicte le suivi à adopter en matière de fréquence de RAI notamment.

A chaque nouveau prélèvement sanguin, les échantillons précédents sont ré-analysés pour avoir un suivi de l'évolutivité du taux de l'agglutinines irrégulières.

Le dosage pondéral est également réalisable et permet d'apprécier la concentration en anticorps.

Avant de préciser s'il existe un risque de maladie hémolytique néonatale, il faut savoir :

- Identifier les anticorps à risques : Rhésus et Kell surtout, mais aussi Duffy, Kidd et MNS
- si le fœtus est porteur de l'antigène correspondant à l'anticorps maternel.

La recherche du phénotype du conjoint peut à ce moment aussi être réalisée ; or, la paternité n'est jamais certaine. C'est une relation de confiance qui doit être établie entre le soignant et la patiente, cette dernière devant confirmer la paternité avant d'envisager l'abstention de prophylaxie .

Une des particularités de l'antigène D est qu'il n'est pas antithétique avec un autre antigène, il est soit présent soit absent. On ne pourra donc pas dire si le papa est homozygote ou hétérozygote.

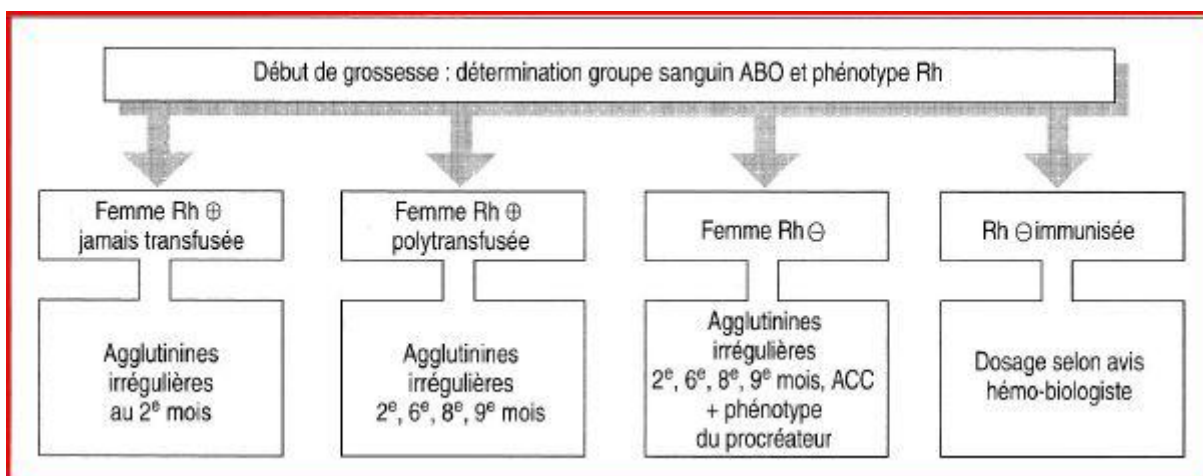
La réalisation de la RAI dépend du statut immunologique de la patiente et son calendrier s'établit de la manière suivante [19] :

- Patiente [RH :1] sans antécédent transfusionnel : avant la fin du 3^{ème} mois ; au cours du 8^{ème} ou 9^{ème} mois, et avant l'accouchement en cas de besoin transfusionnel
- Patiente [RH :1] avec antécédent transfusionnel : avant la fin du 3^{ème} mois ; au cours des 6^{ème}, 8^{ème} et 9^{ème} mois et avant l'accouchement en cas de besoin de transfusionnel
- Patiente [RH :-1] : avant la fin du 3^{ème} mois, au cours des 6^{ème}, 8^{ème} et 9^{ème} mois ; avant l'accouchement en cas de besoin transfusionnel ; dans les 8 semaines suivant l'accouchement. Il ne faut également pas omettre qu'une RAI doit être réalisée avant toute injection de gamma globulines (il n'est cependant pas nécessaire d'en attendre le résultat, en cas d'urgence). Si une injection de gamma globulines est réalisée à 28 SA, les RAI suivantes ne sont pas obligatoires, ou seulement dans les quatre dernières semaines de grossesse à visée transfusionnelles.

Les recommandations du CNGOF recommande une abstention de RAI au 8^{ème} mois en cas d'injection de Rhophylac® ; or, ce dernier protège uniquement les allo immunisations anti D et d'autres immunisations peuvent se développer et ont besoin d'être contrôlées.

- Patientes immunisées : RAI régulières, dosage et titrage des anticorps.

Figure 4: Calendrier des RAI en fonction du statut immunologique de la patiente



Tiré de : *La prévention d'allo-immunisation Rhésus D fœto-maternelle, Vocation sage femme* ; 2008, n°20, p.21.

2.6.2. La prophylaxie

2.6.2.1. Historique [10]

En France, la politique de prévention de l'AIFM a démarré en 1970 avec l'injection d'immunoglobulines issues de plasma de donneurs immunisés mais elle était limitée aux situations à risques et non systématique.

Cette prévention ciblée a permis de réduire de 6 à 10 fois le nombre AIFM en 30 ans. Or, 25% des AIFM surviendraient sans aucun facteur de risque. De plus, les études menées par le CNGOF montrent que « l'incidence d'immunisation est de 0,8 % à 2,2 % avec une prévention « ciblée seule » contre 0,1 % à 0,7 % avec une prévention « systématique et ciblée ». » Ainsi, la prévention systématique et ciblée permet une réduction de 60 à 80% du taux d'AIFM par rapport à la prévention ciblée seule.

C'est ainsi qu'en 2005 le CNGOF a publié ses nouvelles RPC en ce qui concerne l'AIFM, en collaboration avec la Société Française de Médecine Périnatale et le Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale.

2.6.2.2. Définition

La prophylaxie de l'AIFM consiste en l'injection par voie intraveineuse ou intramusculaire de gamma globulines anti D qui vont neutraliser les hématies rhésus positif fœtales arrivées dans l'organisme maternel, avant le déclenchement du processus d'immunisation.

Le produit actuellement utilisé est Rhophylac®, sur lequel nous insisterons plus loin. Il faut savoir qu'une nouvelle molécule est à l'étude actuellement, nous ne savons pas aujourd'hui si elle viendra remplacer Rhophylac®, ou bien le concurrencer

2.6.2.3. Prophylaxie au 1^{er} trimestre

Il n'existe pas de limite inférieure d'âge gestationnel pour réaliser la prophylaxie. Une injection unique de 200µg suffit pour tous les événements détaillés plus loin. Il faut savoir par ailleurs qu'une dose de 200µg de gamma globulines a une action pendant 9 semaines à compter de la date d'injection. Le risque reste modéré puisqu'il n'existe que peu d'hématies fœtales à ce terme, le risque de passage est faible à cause de l'épaisseur des villosités, et l'expression de l'antigène Rhésus est tardive (environ 8 SA). Un test de Kleihauer n'est pas utile puisque les 200 µg de gamma globulines suffisent à éliminer la totalité des hématies fœtales passées à ce terme de la grossesse (avant 15 SA) et le TK à ce terme n'est pas assez sensible.

2.6.2.4. Prophylaxie au 2^{ème} trimestre

Les circonstances pouvant aboutir à une immunoprophylaxie au deuxième trimestre sont listées plus loin. La réalisation d'un test de Kleihauer est à ce moment nécessaire pour quantifier la quantité d'hématies fœtales ayant traversé la barrière placentaire et ainsi adapter la dose de gamma globulines à injecter, de la manière suivante :

**Figure 5 : Adaptation de la dose de gamma globulines en fonction du
résultat du test de Kleihauer :**

KLEIHAUER (HF/10.000 HA)	Dose de 200 µg		Dose de 300 µG		Voie d'administration
	Doses	µg	Doses	µg	
0-4	1	200	1	300	IV directe
5-24	1	200	1	300	
25-44	2	400	1	300	
45-64	2	400	2	600	Perfusion sur 4 heures
65-84	3	600	2	600	
85-104	3	600	2	600	
105-124	4	800	3	900	
125-144	4	800	3	900	
145-164	5	1000	3	900	
165-184	5	1000	4	1200	
185-204	6	1200	4	1200	
205-224	6	1200	4	1200	
225-244	7	1400	5	1500	
245-264	7	1400	5	1500	
265-284	8	1600	5	1500	
285-304	8	1600	6	1800	

Tiré de : *Laboratoires LFB, Monographie Rhophylac®*, 2005.

2.6.2.5. Prophylaxie au 3^{ème} trimestre

Toute femme enceinte rhésus négatif, porteuse d'un fœtus connu ou présumé rhésus positif, doit se voir proposer une injection de 300µg de gamma globulines anti D de manière systématique (c'est-à-dire sans facteur de risque identifié), ayant une action pour 12 semaines.

En cas d'oubli, l'injection peut être faite jusqu'à 32-34SA. A défaut, la RAI du 8^{ème} mois doit être maintenue.

Une RAI doit être réalisée au maximum 1 semaine avant toute injection de gamma globulines, pour s'assurer qu'une immunisation rhésus n'est pas en cours.

2.6.2.6. Pour l'accouchement

Le phénotype RH de l'enfant est réalisé soit sur sang de cordon soit par prélèvement sanguin ultérieur. En même temps, un TK est réalisé chez la maman pour quantifier l'HFM, au minimum 30 minutes après la délivrance de même qu'une RAI

En cas de rhésus fœtal positif, l'administration de gamma globulines est réalisée, en fonction du résultat du TK suivant le tableau précédent, dans les 72 heures suivant l'accouchement. Un contrôle Kleihauer et RAI doit être réalisé dans les 24h qui

suivent : un complément d'immunoglobulines doit être réalisé si le Kleihauer est positif et/ou la RAI est négative.

Figure 6: Schéma thérapeutique de Rhophylac®

Tableau 2 : Schéma thérapeutique de Rhophylac®		
Situations à risque	Posologie	Test de Kleihauer
Premier trimestre		
Risque modéré de passage d'hématies fœtales Fausse couche spontanée ou menace de fausse couche Interruption de grossesse quels que soient le terme et la méthode utilisée Grossesse molaire Grossesse extra-utérine Métrorragies Choriocentèse Réduction embryonnaire Traumatisme abdominal Cerclage cervical	200 µg Rhophylac® intramusculaire (IM) ou intraveineuse (IV)	Pas de test de Kleihauer
Deuxième et troisième trimestres		
Risque modéré de passage d'hématies fœtales Métrorragies Cerclage du col utérin Menace d'accouchement prématuré nécessitant un traitement	200 µg Rhophylac® IM ou IV	Pas de test de Kleihauer
Risque important de passage d'hématies fœtales Interruption médicale de grossesse Fausse couche spontanée tardive Mort fœtale <i>in utero</i> Version par manœuvres externes Traumatisme abdominal ou pelvien Intervention chirurgicale abdominale ou pelvienne Prélèvement ovulaire	200 µg Rhophylac® IM ou IV	Test de Kleihauer
Accouchement (quelle que soit la voie)		
Si enfant Rhésus D positif	200 µg Rhophylac® IM ou IV	Test de Kleihauer
Prévention systématique entre 28 et 30 semaines : 300 µg Rhophylac® IM		
Source : Laboratoires LFB. Monographie Rhophylac®, 2005.		

Tiré de : Laboratoires LFB, Monographie Rhophylac®, 2005.

2.6.3. Rhophylac®, le seul produit utilisé à ce jour [20], [21], [22]

Actuellement en France, un unique produit est utilisé pour la prophylaxie de l'AIFM : Rhophylac®, commercialisé depuis 2006, bien qu'une nouvelle molécule soit depuis peu à l'étude.

2.6.3.1. Fabrication et sécurité

Rhophylac® est fabriqué à partir de pools de plasma humain prélevé chez des donneurs et donneuses hyperimmunisés contre l'antigène D.

Ce plasma subit plusieurs étapes :

- Cryoprécipitation/centrifugation
- Traitement solvant/détergent (inactivant les virus enveloppés)

- Chromatographies échangeuses d'ions (éliminant les IgA, enrichissant et concentrant les Ig anti-D)
- Nanofiltration (étape de sécurisation éliminant virus enveloppés ou non)
- Association à de l'albumine pour obtenir deux possibles fractions d'Ig anti-D : 200 µg/2mL ou 300 µg/2mL.

Les plasmas prélevés sont avant toute chose soumis au dépistage des marqueurs viraux : antigène HBs, anticorps anti-VIH 1+2 et anti-VHC et au dépistage par amplification des acides nucléiques (VIH, VHB, VHC, VHA, Parvovirus B19)

2.6.3.2. Délivrance et traçabilité

Rhophylac se présente sous la forme d'une seringue pré-remplie. Il peut être administré soit par voie intramusculaire (généralement lors de la prévention systématique) soit par voie intraveineuse (après une situation à risque de passage d'hématies fœtales).

Par voie intraveineuse, l'élimination des hématies fœtales est immédiate ; en 2 heures la moitié a été éliminée et la totalité des hématies fœtales ont disparu au bout de 8 heures.

Par voie intramusculaire, il existe un temps de latence de 6 heures, et les hématies fœtales ont disparu au bout de 12 heures.

La sage femme est autorisée depuis l'arrêté du 4 mars 2005 à prescrire les immunoglobulines anti [RH :1]. [23]

Etant un produit dérivé du sang humain, il nécessite une traçabilité. Les informations suivantes sont retrouvées sur les étiquettes à conserver : dénomination du médicament, nom de l'entreprise qui le fabrique, numéro du lot, code barre, numéro d'AMM du médicament.

Elle concerne également la déclaration de tout effet indésirable rencontré suite à l'administration d'immunoglobulines anti [RH:1] au Centre Régional de Pharmacovigilance.

Une traçabilité de qualité a été définie par la circulaire du 9 Avril 1998 relative à l'information et à la traçabilité concernant les produits sanguins labiles et les produits dérivés du sang.

2.6.3.3. Indications

- Prévention de l'AIFM anti-D chez les femmes enceintes rhésus négatif
- « Traitement des sujets Rh(D)-négatif après transfusion incompatible de sang Rh(D)-positif ou d'autres produits contenant des hématies Rh(D)-positif.

2.6.3.4. Effets indésirables [24]

Peuvent être rencontrés « hyperthermie, malaise, céphalées, réactions cutanées, frissons, nausées, vomissements, hypotension artérielle, tachycardie et réaction de type allergique ou anaphylactique incluant dyspnée et choc ».

Bien que le risque de transmission virale est aujourd'hui faible et la sécurité biologique hautement réglementées, on ne peut pas éliminer l'existence de virus inconnus à ce jour que l'on injecterait. L'exposition à des produits dérivés du sang n'est pas sans risques, il est alors utile de l'éviter dès lors que cela est possible, le génotypage foetal RhD pouvant mettre en évidence ces situations.

D'autres produits sont utilisés lors de la fabrication de Rhophylac®, notamment des conservateurs. Ainsi, le thimérosal a longtemps été utilisé et, contenant du mercure, a été incriminé (à raison ou à tort) dans l'augmentation du risque d'autisme. On retrouve des protéines humaines, d'autres immunoglobulines tels que des anti-C et des anti-E. Ce qui a été mis en évidence pour l'autisme pourrait l'être pour d'autres pathologies. Il s'agirait d'un argument de plus en faveur de l'instauration du génotypage foetal RhD en routine.

2.6.4. Coût de la prévention [25]

Peu d'études ont été menées en France pour connaître réellement le coût de la prévention systématique mais nous retrouvons quelques évaluations dans la littérature internationale.

L'une d'entre elles a été utilisée par le CNGOF en 2005 avant la publication des nouvelles RPC. Il s'agit de l'étude de Chilcott et al. (« The economics of routine antenatal anti-D prophylaxis for pregnant women who are rhesus negative », BJOG, 2004)

En prenant 790000 naissances en France en 2004, 15% de femmes rhésus négatif, 85.16 euros pour une dose de 300 µg d'immunoglobulines et 2.9 euros le tarif d'une injection par une infirmière, cela chiffre à 10 220 000 euros par an le surcoût de la prévention systématique par rapport à la prévention ciblée seule.

Ce chiffre reste néanmoins à prendre avec précaution car il existe de grandes différences entre les systèmes de santé français et anglais, l'étude étant basée sur ce dernier.

2.6.5. Alternatives

Trois problèmes se posent quant à l'utilisation des immunoglobulines d'origine humaine :

- Risque de pénurie : la seule source de cette thérapie est constituée par des volontaires nord américains rhésus D négatifs et hyperimmunisés
- Risque éthique
- Risque lié à l'injection de produits dérivés du sang, et donc la possibilité de transmission de virus

C'est pour répondre aux limites constituées par ces arguments que les chercheurs se sont penchés sur d'autres prises en charge et thérapeutiques.

2.6.5.1. Les immunoglobulines monoclonales anti-D [26]

➤ Préparation

1^{ère} étape : sélection de lymphocytes B producteurs d'anticorps humains anti-D. les lymphocytes B sont isolés de ces prélèvements, soit par immortalisation avec un EBV, ou par fusions avec des cellules de myélome. Les clones producteurs d'anti D sont sélectionnés sur la base de la spécificité et de l'activité fonctionnelle des anticorps sécrétés.

2^{ème} étape : Deuxième étape : l'obtention des anticorps humains recombinants. Le matériel génétique codant spécifiquement pour les chaînes H et L des anticorps anti D humains sont isolés depuis les clones de lymphocytes B précédemment sélectionnés.

On y insert alors un vecteur d'expression qui contient les éléments de régulation nécessaires à la sécrétion d'anticorps.

Le vecteur est utilisé pour transfecter différentes lignées cellulaires sélectionnées pour la production d'anticorps monoclonaux humains recombinants anti D.

Puis une lignée cellulaire est sélectionnée pour ses capacités à produire de façon stable un anti D recombinant (ceci va également permettre la définition des conditions de production en milieu sans sérum et en bioréacteur).

On obtient ensuite un anticorps avec un degré de pureté avoisinant les 99,9% par une purification comportant plusieurs étapes de chromatographie avec des étapes d'inactivation et d'élimination virale.

➤ ***Les études***

- Russe : mal connue
- Britannique : ce sont les anticorps BRAD-3 (une immunoglobuline G 3) et BRAD-5 (immunoglobuline G 1). Les essais cliniques ont montré que ces anticorps sont capables d'induire une immunosuppression chez des sujets [RH :-1] ayant reçu des globules rouges [RH :1]. Cependant, la clairance des globules rouges [RH :1] est moins rapide avec cette thérapeutique qu'avec les anticorps polyclonaux déjà utilisés (Rhophylac®).
- Suisse : efficacité dans la prévention de l'immunisation mais clairance des hématies [RH :1] beaucoup plus faible qu'avec Rhophylac®
- France : C'est un anticorps humain recombinant sélectionné sur la base de son activité fonctionnelle. Il présente une forte liaison aux récepteurs FcγRCIII des immunoglobulines G, entraînant ainsi une activation des cellules effectrices NK, d'où une lyse des hématies Rhésus D positif. Les premiers essais cliniques menés sur ces anticorps monoclonaux semblent mettre en évidence une clairance aussi efficace qu'avec les anticorps polyclonaux utilisés actuellement.

Les résultats cliniques sont assez prometteurs et on peut envisager l'arrivée des Ig monoclonales dans nos pratiques quotidiennes. Néanmoins, une étude à grand échelle est nécessaire.

2.6.5.2. Le génotypage fœtal

Le génotypage fœtal est aussi une perspective d'avenir qui pourrait venir modifier nos pratiques quotidiennes. Il fait l'objet d'une dernière partie complète.

3. LE GENOTYPAGE FŒTAL

Les moyens de dépistage et de diagnostic anténatal ont été et restent encore aujourd'hui invasifs : amniocentèse, cordocentèse, prélèvement de villosités choriales et peuvent être à l'origine d'une aggravation du processus de l'allo immunisation voire d'une perte fœtale.

Depuis longtemps, les recherches vont en ce sens afin de trouver une alternative non invasive. Dès 1893, des cellules trophoblastiques avaient été retrouvées dans les poumons de patientes décédées d'une éclampsie.

Depuis, malgré les avancées scientifiques et les difficultés liées à la nécessité d'isoler et d'enrichir les cellules fœtales, elles n'ont pu être utilisées à bon escient en diagnostic prénatal. Il en va de même quant à l'utilisation de cellules fœtales isolées suite à un lavage utérin ou cervical.

Les hématies passent la barrière placentaire, et nous savons les quantifier ; or, anucléées, elles ne peuvent être utilisées dans le diagnostic prénatal de maladie chromosomique ou génétique.

Les recherches se sont donc portées sur les cellules trophoblastiques, les érythroblastes, les lymphocytes et les cellules souches nucléées.

Dans ces RPC de 2005, le CNGOF évoque la perspective à court terme : le génotypage fœtal sur sang maternel. [10]

Une étude multicentrique intitulée GENIFERH (« Genotypage Non Invasif Fœtal Rhésus D ») est en cours dans le cadre d'un STIC (Soutien aux Techniques Innovantes et Coûteuses). Cette étude a plusieurs objectifs : intérêt médical du test marqué CE, aspect économique et analyse des conditions cliniques et biologiques de faisabilité optimale du test en pratique systématique.

3.1. Découverte de l'ADN fœtal libre circulant dans le sang maternel

En 1997, Lo et al. ont mis en évidence la présence d'ADN fœtal libre circulant (non cellulaire) au sein de la circulation maternelle. Ils se sont inspirés de l'existence d'ADN d'origine néoplasique chez des patients atteints de cancer et des similitudes entre la grossesse et une tumeur (« corps étranger » dans l'organisme). Ceci a été réalisé par

extraction de l'ADN total à partir du sang d'une mère portant un fœtus de sexe masculin, suivi de l'amplification d'une séquence spécifique du chromosome Y.

3.2. Caractéristiques de l'ADN fœtal libre

3.2.1. Origine [27], [30]

L'origine de cet ADN n'est pas encore totalement élucidée mais son turn over extrêmement rapide suggère que des quantités importantes sont sécrétées continuellement dans la circulation maternelle.

On estime qu'il existe une cellule fœtale par millilitres de sang maternel. Longtemps, on a pensé que l'origine de cet ADN provenait de l'apoptose de ces cellule ; cependant, Zhong et al. ont montré que cela ne pouvait être la source unique puisqu'il n'y a pas de corrélation entre le nombre d'érythroblastes fœtaux et la quantité d'ADN circulant.

L'augmentation croissante de la quantité d'ADN avec le terme suggère une origine placentaire, confirmé par la corrélation entre le taux de bêta-HCG sérique maternel et la quantité d'ADN fœtal. [30]

Le placenta par sa taille et son activité cellulaire importante est la source logique de cet ADN fœtal ; Flori et al. (2004) ont d'ailleurs prouvé que l'ADN était issu des cellules cyto- et syncytiotrophoblastiques. Néanmoins, le mécanisme par lequel cet ADN est relargué dans la circulation maternelle reste méconnu. [27]

3.2.2. Cinétique et quantité d'ADN

Il a été démontré que la quantité d'ADN circulant augmente pendant la grossesse. En début de grossesse, l'ADN fœtal représente 3.4% de l'ADN plasmatique totale, soit environ 25 copies/mL et 6.2% au cours du troisième trimestre.

Guibert et al. ont montré, chez des patientes ayant eu recours à une fécondation in vitro, que **l'ADN fœtal était détectable dans le sérum maternel dès le 34^{ème} jour de grossesse** [31].

Enfin, il a été démontré que l'ADN fœtal était rapidement éliminé de la circulation maternelle après la délivrance. Cet élément est capital puisque l'étude de cet ADN n'est pas compromise par l'ADN qui proviendrait d'une grossesse antérieure.[28]

3.2.3. Mise en évidence et analyse [28]

Le phénotype RH résulte le plus souvent (dans la population caucasienne) d'une délétion complète du gène RH1. La mise en évidence d'une séquence [RH :1] (absente du génome maternel chez une patiente [RH :-1]) est évocatrice d'un ADN fœtal.

L'analyse de l'ADN fœtal ne nécessite qu'une extraction à partir du sérum maternel, mais la quantité d'ADN restant faible, les techniques doivent être sensibles et fiables.

L'extraction a pour objectif d'extraire et de purifier les acides nucléiques libres à partir d'échantillons de plasma maternel. On obtient un extrait contenant environ 90% d'ADN maternel, et 10 % d'ADN fœtal. Les patientes rhésus négatif ne possèdent pas le gène rhésus D. S'il est identifié, le fœtus est donc rhésus positif.

La technique d'analyse retenue est celle de la PCR en temps réel qui détecte et mesure l'accumulation du produit amplifié au cours de l'amplification, contrairement à la PCR classique. La méthode détecte les produits de PCR par détection de fluorescence. Hromadnikova et al. ont montré que la PCR temps réel ciblée sur plusieurs exons (7 et 10 en général) du gène Rhésus D à partir du sang maternel peut atteindre 100% de sensibilité et 100% de spécificité entre 12 et 41 SA.

La PCR s'opère sur deux régions spécifiques du gène RH1 : en général, l'exon 7 et l'exon 10, car les mieux conservés du gène RH1. Un fœtus est génotypé [RH :1] quand la PCR est positive pour ces deux exons. A l'inverse, un fœtus est génotypé [RH :-1] quand aucune PCR n'est détecté

Cette détermination est réalisée en France depuis plusieurs années : une trousse diagnostique (ou kit) « Free DNA fetal kit rhésus D » pour PCR en temps réel bénéficie d'un marquage CE depuis juillet 2007.

Quelques cas particuliers :

- Lorsque la PCR est positive sur un seul des exons, nous sommes en présence d'un variant du gène rhésus ; le génotype RH1 du fœtus reste indéterminé.
- Pour les grossesses gémellaires, le test montre soit l'absence totale du gène RhD chez les deux fœtus soit la présence du gène RH1 pour au moins un des deux fœtus, sans pouvoir assurer si les deux sont [RH :1].
- Difficultés d'interprétation si la mère possède un gène RH1 muté non exprimé.

3.2.4. Résultats

Depuis la découverte par Lo et al. en 1997 de l'ADN fœtal circulant, les études se sont multipliées. Il a été prouvé à plusieurs reprises la fiabilité du génotypage fœtal RhD. De nombreuses études retrouvent une spécificité et une sensibilité de 100% avec 100% de concordance entre le résultat du génotype fœtal établi sur sang maternel et le résultat établi sur prélèvement de sang au cordon : on peut notamment citer les travaux de Lo et al., Costa et al., Hromadnikova et al., Gonzales et al. . [33]

3.2.5. Limites [28]

- L'ADN fœtal circulant n'est pas contenu dans un noyau cellulaire donc des analyses chromosomiques ne sont pas réalisables.
- L'ADN fœtal est dilué au sein d'un ADN majoritairement maternel, il est donc difficile de l'isoler spécifiquement ; comme évoqué précédemment, seules les séquences absentes ou différentes du génome maternel pourront être étudiées.
- L'utilisation en routine du génotypage fœtal ne sera pas possible tant que l'acte ne sera pas inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale.
- La présence du gène RhD, notamment dans les populations africaines ou afro antillaises, ne suffit pas à la déduction immédiate du phénotype [RH:1]. Il convient de s'assurer que le gène RHD est fonctionnel, donc de rechercher les variants les plus fréquents avant d'en déduire le phénotype. Les conséquences cliniques et sérologiques de ces variants de l'antigène RH1 sont multiples et complexes à analyser en routine en raison de l'absence de parfaite corrélation entre le phénotype RH et le génotype RH et peut donc donner lieu à des résultats faussement positifs.

3.3. Rapport de l'HAS [34]

Suites aux demandes du Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale, du Collège National des Gynécologues Obstétriciens Français et du Laboratoire Cerba ont effectué une évaluation de la détermination prénatale du génotypage RHD fœtal à partir de sang maternel.

Trente trois études, comportant au moins 10 patientes, évaluant la performance diagnostique

de la détermination du génotype *RHD* fœtal sur sang maternel ont été retenues.

Le groupe de travail de l'HAS a finalement tiré les conclusions suivantes :

- La détermination du génotypage fœtal RhD répond aux indications suivantes :
 - « la prise en charge des grossesses de femmes RH : -1 (D négatif) dans le cadre de l'immunoprophylaxie, pour cibler les populations devant bénéficier d'immunoglobulines anti-RH1 »
 - « en cas d'immunisation, la sélection des femmes RH :-1 (D négatif) devant bénéficier d'un suivi spécialisé plus lourd. »
- Le test peut être proposé à partir de 11SA. Dans le cadre d'un résultat négatif, il faut effectuer un 2^{ème} prélèvement 15 jours plus tard pour confirmer ce résultat, les conséquences d'un faux négatif ayant beaucoup plus d'impact clinique qu'un faux positif.
- « La mise en place systématique d'un contrôle de qualité interne d'extraction et d'amplification de l'ADN est indispensable pour limiter les résultats faussement négatifs. »
- Dans les populations africaines, où les variants et notamment le pseudogène *RHD γ* est fréquent, la détection, par PCR de ce dernier entre autres, permettrait de réduire le nombre de faux positifs et d'améliorer la spécificité de la détermination.
- Des contrôles de qualité internes et externes sont nécessaires avant d'utiliser cette technique en routine. Déjà, après l'accord des participants de l'étude multicentrique GENIFERH, le CNRHP a mis en place un contrôle aux 5 laboratoires composant l'étude. Les résultats des 3 contrôles ont été en accord avec ceux attendus, bien que les 5 laboratoires utilisent des techniques d'extraction et d'amplification différentes. [35]

- Le groupe d'études précise enfin qu'il faudra attendre les résultats de l'étude GENIFERH pour avoir davantage d'informations encore.

Un changement dans nos pratiques peut être attendu, nous nous sommes alors demandés dans quelles mesures les recommandations actuelles étaient-elles suivies.

En ces périodes où l'aspect économique en santé occupe une place importante, la généralisation du génotypage fœtal pourrait-elle permettre des économies en termes de santé publique ?

Partie 2

Présentation des résultats

1. METHODOLOGIE DE RECHERCHE

1.1. Choix du thème

L'allo-immunisation fœto-maternelle [RH :1] est rare mais reste la plus fréquente des incompatibilités fœto-maternelles. Depuis 1970 et le début de la prophylaxie, son incidence a considérablement diminué, divisant par 10 sa survenue en 30 ans. Les nouveaux progrès de la science vont plus loin et nous permettent d'étudier le fœtus, de manière non invasive, ce que nous trouvons remarquable, et pourrait permettre d'utiliser la prophylaxie à bon escient uniquement.

Nous avons donc souhaité réfléchir et travailler sur cette nouvelle possibilité de génotypage fœtal qui pourrait entraîner un changement radical dans nos pratiques à l'avenir.

1.2. Objectifs de l'étude

L'étude a été subdivisée en deux « sous études » ayant des objectifs différents.

1.2.1. Première sous étude : « évaluation du suivi des recommandations »

Au travers de mon expérience personnelle, j'ai pu constater que certains professionnels de périnatalité tels que des sages femmes et des gynécologues obstétriciens ne suivaient pas toujours les recommandations du CNGOF de 2005 quant à la prévention de l'AIFM et au suivi de grossesse des patientes rhésus négatif.

Il en va d'une part des injections de Rhophylac® : mauvais dosage, non respect de la RAI obligatoire préalable, abstention de prophylaxie non justifiée dans le dossier médical.

D'autre part, le nombre de RAI et l'indication de leur réalisation ne sont pas toujours adéquats.

L'objectif de cette étude est de montrer que malgré des recommandations claires du CNGOF et rédigées 6 ans en arrière, elles ne sont pas appliquées par tous. La mise en place du génotypage fœtal dans nos suivis de grossesse pourrait simplifier voire améliorer l'observance des recommandations, les patientes porteuses d'un fœtus rhésus négatif aurait le même suivi que les patientes rhésus positif.

1.2.2. Deuxième sous étude : « évaluation de coûts »

Par le biais de cette étude, l'objectif est de montrer qu'il existe un gaspillage de produits dérivés du sang à travers l'administration non spécifique de Rhophylac® à toutes les femmes rhésus négatif. Un second objectif est la mise en évidence du nombre d'injections et de la quantité d'examens médicaux réalisés inutilement quand la simple connaissance du groupe sanguin rhésus fœtal permettrait de les éviter.

Par ailleurs, nous souhaiterions évaluer les coûts d'une grossesse avec et sans génotypage fœtal, en confrontant le coût du génotypage fœtal et le coût des Rhophylac® et RAI réalisés inutilement (fœtus [RH : -1]).

1.3. Les hypothèses

- L'utilisation du génotypage fœtal rhésus permettrait d'alléger le suivi de grossesse des patientes porteuses d'un fœtus [RH :-1].
- La généralisation de ce test pourrait entraîner une diminution des coûts en réduisant le nombre d'injections de Rhophylac®, produit sanguin labile rare et non dénué de risques ,et de RAI réalisées.

1.4. Description de l'étude

1.4.1. Première sous étude : « évaluation du suivi des recommandations »

➤ Méthodes

Un premier recueil de données a été réalisé. Le codage employé au sein du Département d'Informations Médicales (DIM) de la Maternité Régionale Universitaire de Nancy est tel que l'accessibilité aux dossiers de patientes rhésus négatif n'est possible qu'à travers le codage des injections de Rhophylac® réalisées dans le post partum, donc seuls les dossiers de patientes ayant accouché d'un enfant rhésus positif sont accessibles.

➤ Population

Les dossiers ont été choisis ainsi en accord avec le DIM : les 100 dernières patientes [Rh :-1] ayant accouché à la Maternité de Nancy en date du 30/06/2011.

➤ **Type d'étude**

La méthodologie générale de cette étude est descriptive avec un recueil de données prospectif

Pour ce premier recueil, les données suivantes ont été relevées :

- Groupe sanguin ABO rhésus maternel
- RAI, indications et terme de réalisation
- Test de Kleihauer ou recherche d'hématies fœtales
- Immunoglobulines spécifiques anti-D (ici Rhophylac® est le seul utilisé à ce jour), indications et terme de réalisation

1.4.2. Deuxième sous étude : « évaluation de coûts »

➤ **Méthodes**

Ce second recueil de données a été possible grâce à la collaboration de l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Nancy qui a pu nous procurer, dans le respect du secret médical via le Département d'Informations Médicales de la Maternité Régionale Universitaire de Nancy une liste de patientes, dont ils avaient déterminé le groupe sanguin rhésus.

➤ **Population**

Une liste de 167 patientes [RH :-1] dont la détermination du groupe sanguin rhésus a été prescrite par un praticien de la Maternité Régionale Universitaire de Nancy au cours de l'année 2010 a été fournie au hasard via les listes de patientes disponibles à l'EFS.

➤ **Type d'étude**

La méthodologie générale de cette étude est descriptive avec un recueil de données prospectif Pour ce deuxième recueil, les données suivantes ont été relevées :

- Groupe sanguin ABO rhésus maternel
- Immunoglobulines spécifiques anti-D, indications et terme de réalisation
- RAI, indications et terme de réalisation
- Groupe sanguin rhésus du bébé

2. PRESENTATION DES RESULTATS

2.1. Présentation des résultats de la première sous-étude : « évaluation du suivi des recommandations »

Sur les 100 dossiers prévus, 98 ont été analysés puisque 2 présentaient des patientes rhésus positif.

Quatre dossiers ont été exclus des résultats pour les raisons suivantes :

- Patiente non suivie qui s'est présentée pour accoucher à 40 SA
- Patiente ayant subi une IMG pour Tétralogie de Fallot à 27 SA
- Patiente césarisée à 27 SA pour pré-éclampsie sévère
- Patiente ayant accouché prématurément à 28 SA

En effet, ces patientes n'ont pu présenter un suivi de grossesse normal et aurait été un biais pour notre étude.

➤ ***La prophylaxie systématique et ciblée***

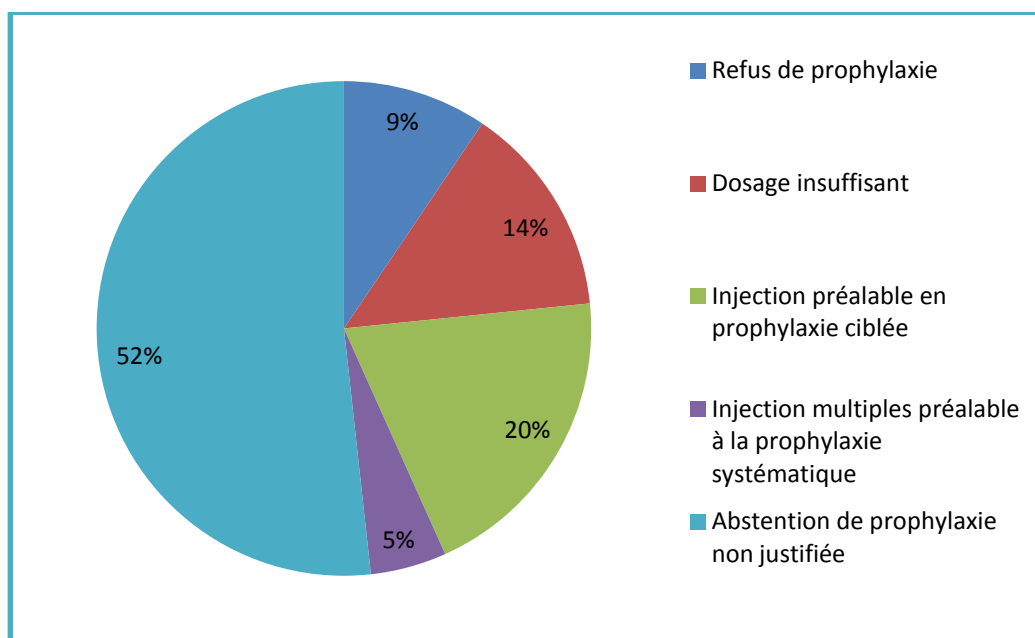
❖ *Patientes ayant bénéficié de la prophylaxie systématique*

73 patientes ont reçu la prophylaxie de l'AIFM par injection d'immunoglobulines anti D à un dosage de 300µg/mL entre 26 et 33 SA.

Cela représente 78% des patientes de notre étude.

❖ *Patientes n'ayant pas bénéficié de la prophylaxie systématique ou ayant bénéficié d'une prophylaxie inadaptée*

Figure 7 : Répartition des motifs ayant pour conséquence une abstention de prophylaxie systématique ou une prophylaxie systématique non appropriée



21 patientes n'ont pas reçu de la prophylaxie systématique pour diverses raisons :

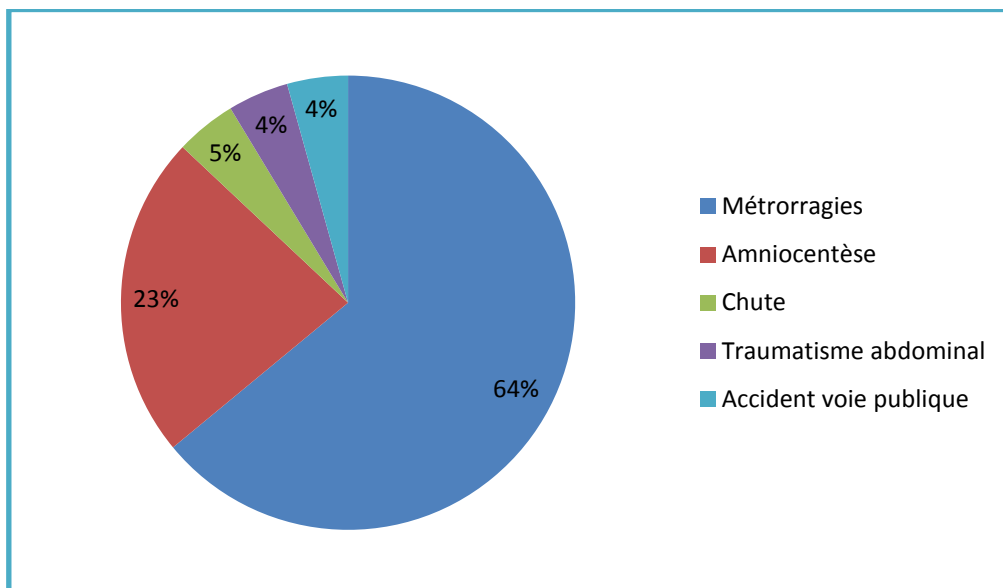
- 2 patientes ont refusé la prophylaxie et le refus est notifié dans le dossier médical.
- 3 patientes ont reçu une injection de Rhophylac® de 200µg/mL, dosage réservé normalement aux situations à risque d'HFM ou au post partum lorsque le Kleihauer est négatif.
- 2 patientes ont reçu une dose de 200µg/mL respectivement à 25SA et 28 SA suite à des métrorragies.
 - 1 autre patiente a également reçu une dose de 200µg/mL à 24SA pour traumatisme abdominal.
 - 1 dernière patiente a reçu ce même dosage à 22SA suite à une amniocentèse.
 - Après ces différents événements, ces 4 patientes n'ont pas bénéficié d'une prophylaxie systématique.

- 1 patiente a reçu 3 doses de 200µg/mL à 6SA, 14SA et 20 SA pour des métrorragies et le praticien suivant la patiente n'a pas jugé nécessaire de réaliser la prophylaxie systématique.

Toutefois, pour 11 patientes soit 12% de notre population totale et 52% de la sous population, l'abstention de prophylaxie n'est pas justifiée. On peut envisager plusieurs raisons : refus de la patiente, oubli du praticien, conjoint rhésus négatif...sans grande assurance.

❖ *Patiente ayant bénéficié d'une prophylaxie ciblée*

Figure 8 : Répartition des situations à risque d'HFM conduisant à une prophylaxie ciblée.



- 20 patientes ont reçu une prophylaxie ciblée.
- 5 d'entre elles ont reçu plusieurs injections de Rhophylac® suite à diverses mises en situations à risque d'HFM :
 - 1^{ère} patiente : métrorragies et amniocentèse pour HT21 à 1/136
 - 2^{ème} patiente : 2 épisodes de métrorragies
 - 3^{ème} patiente : 2 épisodes de métrorragies sur placenta prævia
 - 4^{ème} patiente : 3 épisodes de métrorragies
 - 5^{ème} patiente : chute et amniocentèse pour RCIU.

- 1 patiente a reçu une dose de 300µg/mL de Rhophylac®, dosage traditionnellement réservé à l'immunoprophylaxie, et ce malgré un test de Kleihauer négatif.
- Les différentes indications rencontrées sont les suivantes :
 - Métrorragies : ont justifié 14 prophylaxies ciblées
 - Amniocentèse : ont justifié 5 prophylaxies ciblées
 - Chute : a justifié 1 prophylaxie ciblée
 - Accident de la voie publique : a justifié 1 prophylaxie ciblée
 - Traumatisme abdominal : a justifié 1 prophylaxie ciblée

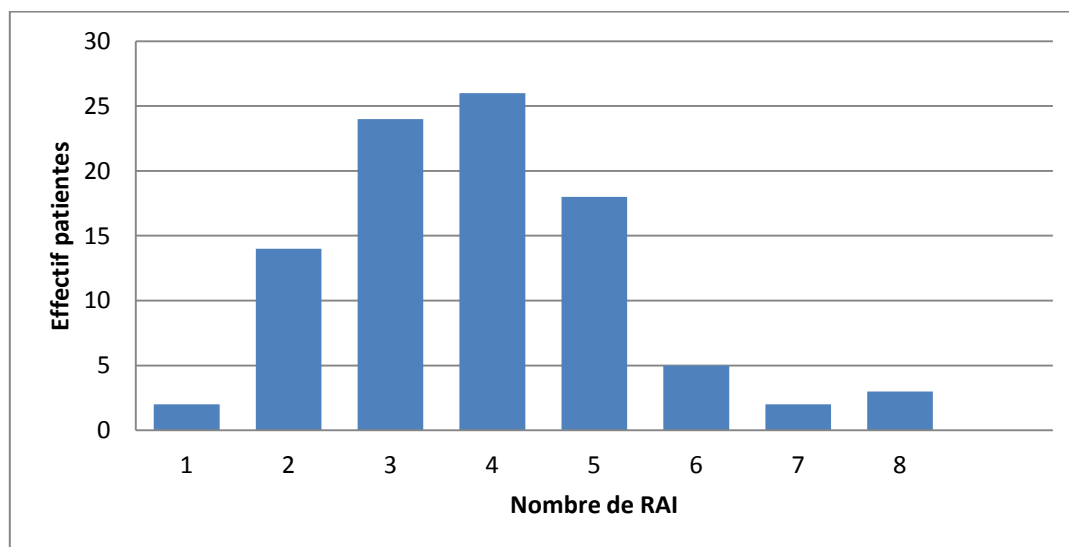
➤ **Nombre de RAI réalisées lors du suivi de grossesse de patientes [Rh :-1]**

❖ **Nombre total de RAI réalisées**

N'ont été comptabilisées que les RAI intervenant dans le suivi des grossesses physiologiques, selon les recommandations du CNGOF de 2005.

N'ont pas été comptabilisées les RAI faisant suite à une situation à risque d'HFM

Figure 9 : nombre total de RAI réalisées au cours du suivi de grossesse



❖ *Les RAI « obligatoires »*

- Lors de la déclaration de grossesse

Une RAI doit être réalisée au 1^{er} trimestre avant la déclaration de grossesse, c'est à dire avant 15 SA.

72 patientes ont bénéficié d'une RAI au cours du premier trimestre.

- Avant injection de Rhophylac®

Une RAI doit être réalisée avant toute injection de Rhophylac®, afin de pouvoir conclure à une absence d'allo immunisation fœto-maternelle. En effet, la RAI se positive après injection de gammaglobulines anti D, il n'y a alors pas de moyen pour différencier si le résultat positif est lié à l'injection ou à une AIFM récente. L'Etablissement Français du Sang exige une RAI datant de moins de 8 jours pour conclure à l'absence d'AIFM avant l'injection d'immunoglobulines anti D.

On considère ici que toute injection systématique liée à la prophylaxie est réalisée généralement à 28SA.

Seules 40 patientes sur les 73 ayant bénéficié d'une prophylaxie systématique ont eu une RAI dans les 8 jours précédents l'injection de Rhophylac®.

- En ce qui concerne la RAI du 8^{ème} mois

Il existe 2 cas de figure :

- Si une injection de Rhophylac® a été réalisée en prophylaxie systématique, la RAI du 8^{ème} mois n'est plus obligatoire, le risque de survenue d'AIFM étant aboli par la prophylaxie
- En cas d'abstention de prophylaxie systématique, la RAI du 8^{ème} mois est maintenue, la survenue d'une AIFM est toujours envisageable.

**Tableau 5 : Réalisation d'une RAI à 8 mois en fonction de la survenue ou non
d'une prophylaxie à 28 SA**

	RAI non réalisée à 8 mois	RAI réalisée à 8 mois	Totaux
Prophylaxie à 28 SA	48 (66%)	25 (34%)	73
Abstention de prophylaxie à 28 SA	11 (52%)	10 (48%)	21

Près de la moitié des patientes n'ayant pas bénéficié d'une prophylaxie systématique ont eu une RAI au 8^{ème} mois de grossesse.

Un tiers des patientes ayant bénéficié d'une prophylaxie systématique ont eu une RAI au 8^{ème} mois de grossesse.

- La RAI réalisée à l'accouchement

Une RAI de moins de 72heures est exigée pour l'accouchement des patientes ([Rh :1] et [Rh : -1] confondues) à la Maternité Régionale Universitaire de Nancy, à visée transfusionnelle en perpartum.

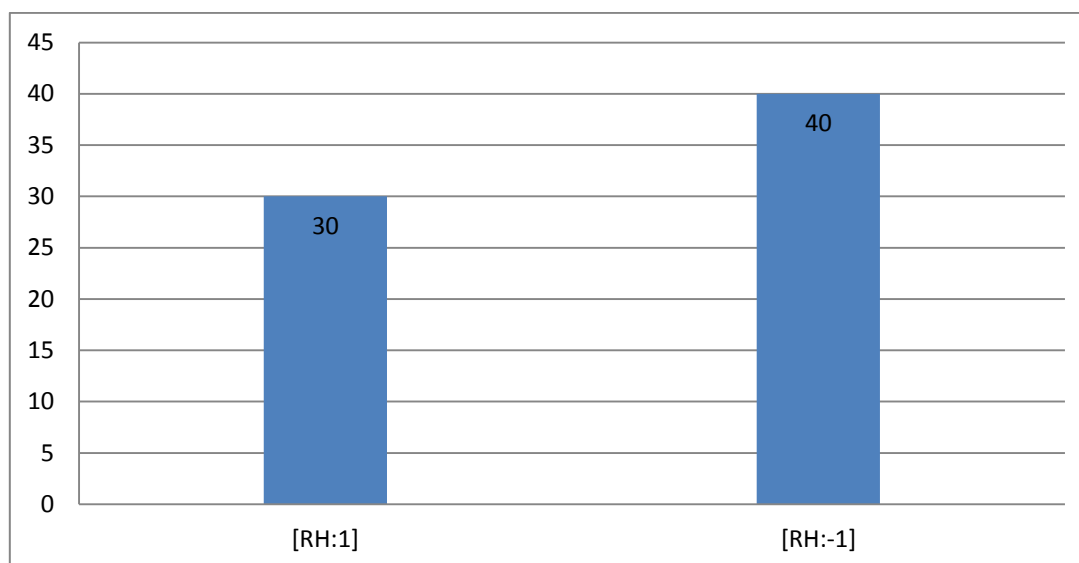
Pour 96 patientes sur 98, une RAI est retrouvée dans les 72 heures précédant l'accouchement, soit 98%.

2.2. Présentation des résultats de la deuxième sous étude : « évaluation de coûts »

70 dossiers sont inclus dans les résultats suivants.

➤ *Rhésus du nouveau-né à la naissance*

Figure 10 : Répartition des rhésus des nouveau-nés au sein de notre population



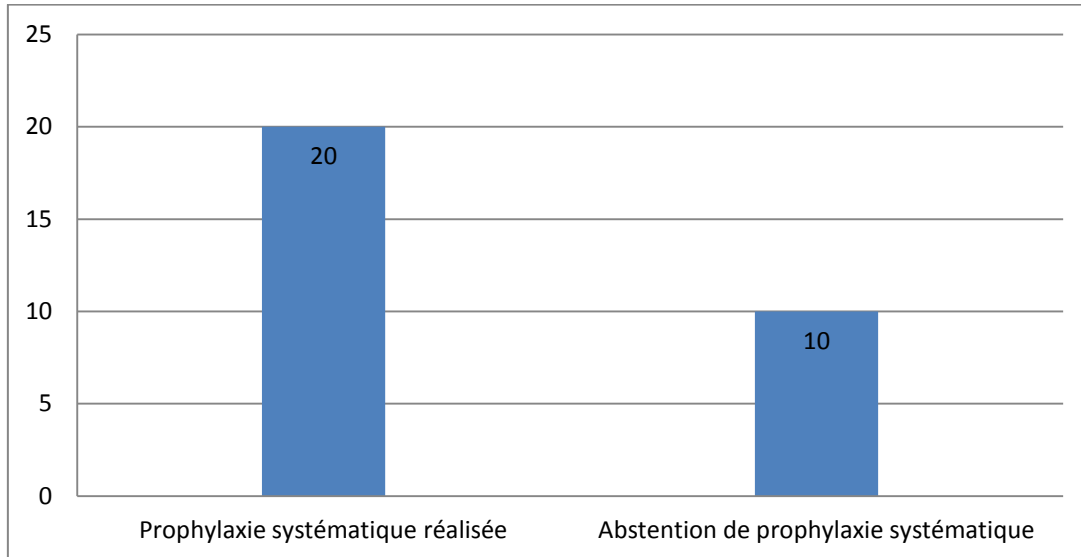
Environ 40% des enfants de mère [RH :-1] sont eux même [RH :-1], ce qui correspond aux données retrouvées dans la littérature.

Pour les résultats suivants, on appellera sous population l'ensemble des patientes dont le bébé est [RH : -1].

➤ **La prophylaxie systématique et ciblée**

❖ **La prophylaxie systématique**

Figure 11 : proportion de prophylaxie systématique au sein de notre population



Les 2/3 des patientes de notre sous population ont reçu une prophylaxie systématique, par injection d'une dose d'immunoglobulines spécifiques anti-D de 300µg/mL, entre 24 SA et 32 SA.

Dans 9 cas sur 10, un père [RH :-1] également justifie l'abstention de prophylaxie.

❖ **La prophylaxie ciblée**

Une prophylaxie ciblée a été réalisée pour 2 patientes de notre sous population.

La situation à risque d'HFM rencontrée et motivant ces prophylaxies ciblées est dans les 2 cas un épisode de métrorragies.

Aucune de ces patientes n'a subi plusieurs situations à risque d'HFM, mais l'une d'elles a reçu une dose de 600µg d'immunoglobulines spécifiques suite à une HFM massive liée à un épisode de métrorragies..

➤ **Kleihauer**

Un test de Kleihauer fait suite à toute situation à risque d'HFM pour quantifier cette dernière, et adapter la dose d'immunoglobulines à injecter.

Dans notre population, chacune des patientes de notre sous-population a bénéficié d'un test de Kleihauer 2 heures après la délivrance du placenta. De plus, 2 tests de Kleihauer supplémentaires ont été réalisés chez les patientes ayant subi une situation à risque d'HFM en cours de grossesse, soit un total de 32 tests de Kleihauer réalisés.

On ne comptabilise pas ici les tests de Kleihauer réalisés pour une autre indication que celle de la possibilité de survenue d'une allo-immunisation [RH :-1], notamment dans les cas de diminution des mouvements actifs fœtaux.

➤ **Les RAI réalisées**

❖ *Nombre total de RAI réalisées dans notre sous population*

Tableau 6: Nombre de RAI réalisées par patiente rhésus négatif de notre sous population au cours d'une grossesse

Nombre de RAI	0	1	2	3	4	5	6	7
Effectif	4	9	11	5	0	0	0	1

On ne comptabilise pas ici les RAI du 3ème et 9ème mois qui sont communes aux femmes rhésus positif.

On constate que pour 25 patientes sur 30 soit plus de 80% de notre sous-population, au moins un examen de RAI a été réalisée.

➤ **En conclusion de notre sous étude « évaluation de coûts »**

On part du principe qu'en connaissant le groupe sanguin rhésus fœtal en début de grossesse, certains examens ci-dessus n'auraient pas été réalisés :

- Immunoglobulines spécifiques anti-D (Rhophylac® ici) : aucune n'aurait été injectée : sur 70 patientes, 22 doses de 300 µg/mL auraient été économisées (20 en prophylaxie systématique, 2 en prophylaxie ciblée suite à une HFM massive nécessitant 600 µg/mL), 1 dose de 200 µg/mL en prophylaxie ciblée.
- RAI : seules les RAI communes à toutes les patientes auraient été réalisées (3^{ème} et 9^{ème} mois). On peut donc considérer que 47 RAI ont été réalisées alors que le risque d'AIFM [RH :-1] était nul.
- Kleihauer : 32 tests de Kleihauer auraient été évités.

Tableau 7 : Proportion des actes réalisés inutilement au sein de notre sous-population

Actes inutiles réalisés	Rhophylac 300 µg/mL	Rhophylac 200 µg/mL	RAI	Kleihauer
Effectif	22	1	47	32

Partie 3

Discussion

1. LIMITES ET BIAIS DES ETUDES

1.1. Limites de nos études

La gestion du temps et les imprévus ont été les facteurs limitant à la bonne avancée de notre travail.

Nos premiers objectifs ont été d'avoir accès à des dossiers médicaux de 2 différents centres : la Maternité Régionale Universitaire de Nancy (n'utilisant pas le génotypage fœtal) et l'Institut Montsouris de Paris (utilisant le génotypage fœtal). Les contacts ayant été rompus avec l'équipe parisienne, nous avons dû revoir nos objectifs.

Les dossiers issus du premier recueil de données réalisé en août 2011 ont été sélectionnés ainsi par l'intermédiaire du DIM : « patiente ayant reçu au moins une dose de Rhophylac® pendant la grossesse ». Or, le codage utilisé à la Maternité de Nancy est tel que seules les doses injectées en post partum sont identifiables ; la fin du recueil de données nous donnant 100% de fœtus rhésus positif, nous fit réfléchir et nous nous sommes rendus compte que l'intitulé de la demande n'était pas compatible avec les données auxquelles nous pouvions avoir accès au DIM.

Une liste anonymisée de patientes [RH : -1] nous a été fournie à partir des données conservées à l'EFS de Nancy. L'envoi de cette liste a été réalisé par l'intermédiaire de logiciels d'envoi de courriels sécurisés avec le DIM. Etant donné que cette liste regroupe toutes patientes ayant eu une détermination du groupe sanguin par un praticien de la Maternité Régionale de Nancy, elle contient des patientes suivies en gynécologie, pour orthogénie, transférées pour une pathologie obstétricale mais n'ayant pas accouché à la Maternité....Au total, 145 dossiers ont été ouverts pour pouvoir obtenir une liste de 70 dossiers exploitables pour notre étude.

1.2. Biais de nos études

- Les dossiers utilisés sont issus de la Maternité Régionale Universitaire de Nancy : maternité de niveau III, non nécessairement représentative de la population générale.
- La Détermination du typage érythrocytaire ABO-RH-KELL est faite pendant la grossesse en l'absence de carte déjà établie. La grossesse est

souvent l'occasion pour les jeunes femmes, en âge de procréer, d'établir une carte de groupe sanguin. Ainsi, la détermination a eu lieu pour toutes les patientes de notre population au cours de la grossesse, on peut s'attendre à avoir une population majoritairement de primigestes, ou tout au moins de primipares.

2. LE NON SUIVI OPTIMAL DES RECOMMANDATIONS DU CNGOF DE 2005

Dans la présentation des résultats de notre sous étude « évaluation du suivi des recommandations », nous avons constaté que le suivi des patientes [Rh :-1] n'était pas homogène et que les praticiens n'intervenaient pas tous de la même manière, malgré les recommandations du CNGOF.

Il faut tout d'abord préciser que des recommandations ne sont en aucun cas des « obligations », chaque praticien est libre de les suivre ou non. Il ne faut cependant pas omettre que nous avons toutes et tous un devoir de formation continue : se tenir informé des nouveaux protocoles, traitements et des évolutions de la médecine est impératif.

➤ **Concernant la prophylaxie systématique**

Près de 20% des patientes n'ont pas reçu de prophylaxie, dont pour la moitié d'entre elles, la cause de l'abstention de prophylaxie est non documentée dans le dossier médical.

Plusieurs hypothèses s'offrent à nous :

- La patiente a refusé l'injection, mais le refus n'est pas notifié : cela peut être justifié par un défaut d'informations, le fait qu'il s'agisse de PSL, non accepté dans toutes les cultures et/ou religion.
- Le praticien n'a pas proposé l'injection à la patiente; plusieurs arguments sont audibles :
 - Le géniteur est connu comme étant également [RH :-1], la patiente confirmant la paternité de ce dernier, elle peut être considérée comme non à risque d'allo-immunisation fœto-maternelle [RH :-1]
 - Le fait qu'une politique de prévention systématique ait un coût important et qu'on ait peu de recul sur la prévention systématique.
 - Le fait que les immunoglobulines anti-D soient un produit sanguin labile, donc non dénué de risques de transmission virale notamment et avec un manque de recul sur les différents effets indésirables potentiels.[38]

C'est ici, à notre sens, l'évaluation de la balance bénéfices/risques qui permet aux praticiens de préconiser ou non la prophylaxie systématique.

Il nous semble important d'évoquer la préparation et les effets indésirables des immunoglobulines spécifiques anti-D, qui peuvent être un frein pour les praticiens :

❖ *La sécurité virale*

Celle-ci est assurée par une suite de procédures appliquées à chaque donneur et chaque échantillon prélevé ; c'est à la seule condition du respect de ces précautions que l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé peut délivrer l'Autorisation de Mise sur le Marché d'un tel produit. Le CNGOF précise toutefois que « la transmission de virus non encore émergents est possible ».

❖ *Les risques de réaction de type allergique et les manifestations à type d'hypersensibilité*

Peu d'accidents allergiques graves ont été décrits dans la littérature ; les autres effets rencontrés sont ceux décrits dans la monographie LFB à type de prurit, urticaires...

❖ *Les risques de réaction hémolytiques après une hémorragie fœto-maternelle importante*

Un contexte d'hyperthermie peut être retrouvé lorsque la clairance des globules rouges rhésus positif est importante.

➤ ***Concernant le nombre de RAI réalisées lors du suivi de grossesse de patientes [RH :-1]***

Il existe dans les résultats de notre étude une grande variabilité du nombre de RAI réalisées, pouvant aller de 1 à 8. Les recommandations du CNGOF conseillent 4 RAI pour les grossesses non incidentées par une situation à risque d'HFM : 3^{ème} mois, 6^{ème} mois, 8^{ème} mois et 9^{ème} mois.

Cette variabilité vient peut être d'un défaut de connaissances ou de diffusion des recommandations.

Afin d'améliorer la surveillance des femmes enceintes rhésus négatif, un rappel de l'immunologie de la grossesse, par des recommandations pour la pratique clinique ou

par conférence de consensus par exemple, et une meilleure diffusion des textes légaux [37] permettraient probablement de diminuer les prescriptions inutiles de RAI.

L'aspect organisationnel du suivi des patientes peut également être en cause dans cette importante variabilité : les consultations en urgence génèrent généralement des bilans, on peut voir des doublons pour ces derniers lors des consultations programmées, et inversement : certains examens ne sont pas faits en urgence lorsqu'ils sont supposés déjà être réalisés ou à réaliser lors du suivi de grossesse.

Il serait bon également de rappeler que chacune des RAI préconisées par le CNGOF dans ses recommandations à une indication précise :

Tableau 8 : indication des RAI réalisées en cours de grossesse

Terme	Indication	Population concernée
3 ^{ème} mois	Connaissance du statut immunologique des patientes	Toute patiente confondue
6 ^{ème} mois	Assurer de l'absence d'AIFM avant injection d'immunoglobulines	Patientes [RH :-1]
8 ^{ème} mois	- Vérifier que la dose d'Ig prescrite est suffisante en cas d'HFM massive - S'assurer qu'une autre immunisation n'est pas en cours	Patientes [RH :-1]
9 ^{ème} mois	Visée transfusionnelle en peripartum	Toutes patientes confondues

❖ *La RAI avant injection de Rhophylac*

Concernant la RAI exigée par les textes de lois [37] 8 jours avant la prophylaxie systématique des 28 SA, elle n'a été réalisée que pour un peu plus de la moitié des patientes dans les 8 jours précédents l'injection. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- Les praticiens n'ont pas connaissance de la nécessité d'être assuré de l'absence d'immunisation avant l'injection.
- Les praticiens reçoivent parfois les patientes avant 28 SA ; dans ce cas, les immunoglobulines et la RAI sont prescrites et un intervalle de date pour la réalisation de ces examens est précisé à la patiente. L'information peut être mal formulée ou mal assimilée par la patiente.

❖ *La RAI du 8^{ème} mois*

Pour la RAI du 8^{ème} mois, les résultats de notre étude sont discordants avec les recommandations du CNGOF. Pour exemple, certaines patientes n'ayant pas reçu de prophylaxie systématique donc à risque de développer une AIFM n'ont pas de RAI alors que la prévention, elle, serait souhaitable et inversement. Aucune tendance particulière ne se dégage de notre étude. Il semble y avoir un flou quant à cette RAI du 8^{ème} mois.

En fait, les recommandations du CNGOF de 2005 recommandent l'abstention de RAI si une prophylaxie systématique a eu lieu alors que le décret n° 92-143 du 14 février 1992 relatif aux examens obligatoires prénuptiaux, pré et postnataux exige une RAI au 8^{ème} mois et n'a pas été réactualisé avec la mise en place de la politique de prévention systématique.

De plus, certaines agences régionales de santé ont émis leurs recommandations quant à cette RAI à réaliser au 8^{ème} mois.

En l'absence de consensus, les praticiens peuvent effectivement être partagés entre les différents suivis.

❖ *La RAI à l'accouchement*

On constate qu'il y a un bon suivi des recommandations quant à la RAI nécessaire à l'accouchement. Cela peut être expliqué par le fait qu'elle est incluse au sein d'un bilan sanguin complet précédant l'accouchement, et notamment le bilan pré-anesthésique. Elle est de plus commune à toutes les patientes, [RH :-1] et [RH :1] confondues, le risque d'oubli est donc moindre.

➤ **Conclusion de la sous étude « évaluation du suivi des recommandations »**

Globalement, il ne ressort aucune homogénéité quant au suivi des patientes [Rh :-1] au sein de notre population. Les recommandations pour la pratique clinique en matière d'allo-immunisation fœto-maternelle rhésus du CNGOF de 2005 ne sont pas toujours appliquées.

Bien qu'il n'existe aucun registre national exhaustif des AIFM, on constate que leur fréquence a considérablement diminué depuis le début de la politique de prévention ciblée dans les années 1970 et avec la politique de prévention systématique de 2005. Néanmoins, il existe des AIFM résiduelles. Elles seraient essentiellement dues à des préventions oubliées ou inadaptées (doses et/ou délais), à des grossesses méconnues (fausses couches précoces...), à des échecs de préventions apparemment adaptées. [10] Il apparaît donc important d'être rigoureux quant au suivi des patientes rhésus négatif et l'application stricte des protocoles est nécessaire pour espérer réduire encore davantage l'incidence de la maladie.

Par ailleurs, nous savons que le risque de survenue d'HFM est majoré à l'accouchement et le volume de l'HFM peut y être conséquent. Une RAI réalisée dans le post partum a selon nous tout son intérêt : elle permettrait de mettre en évidence une immunisation [RH :-1] ou autre survenue lors de l'accouchement. Cette immunisation n'a plus d'impact pour cette grossesse mais pourrait avoir un retentissement sur le fœtus conçu lors d'une grossesse ultérieure, et donc la connaissance de cette immunisation permettrait de prendre en charge spécifiquement la patiente dès le début de la grossesse.

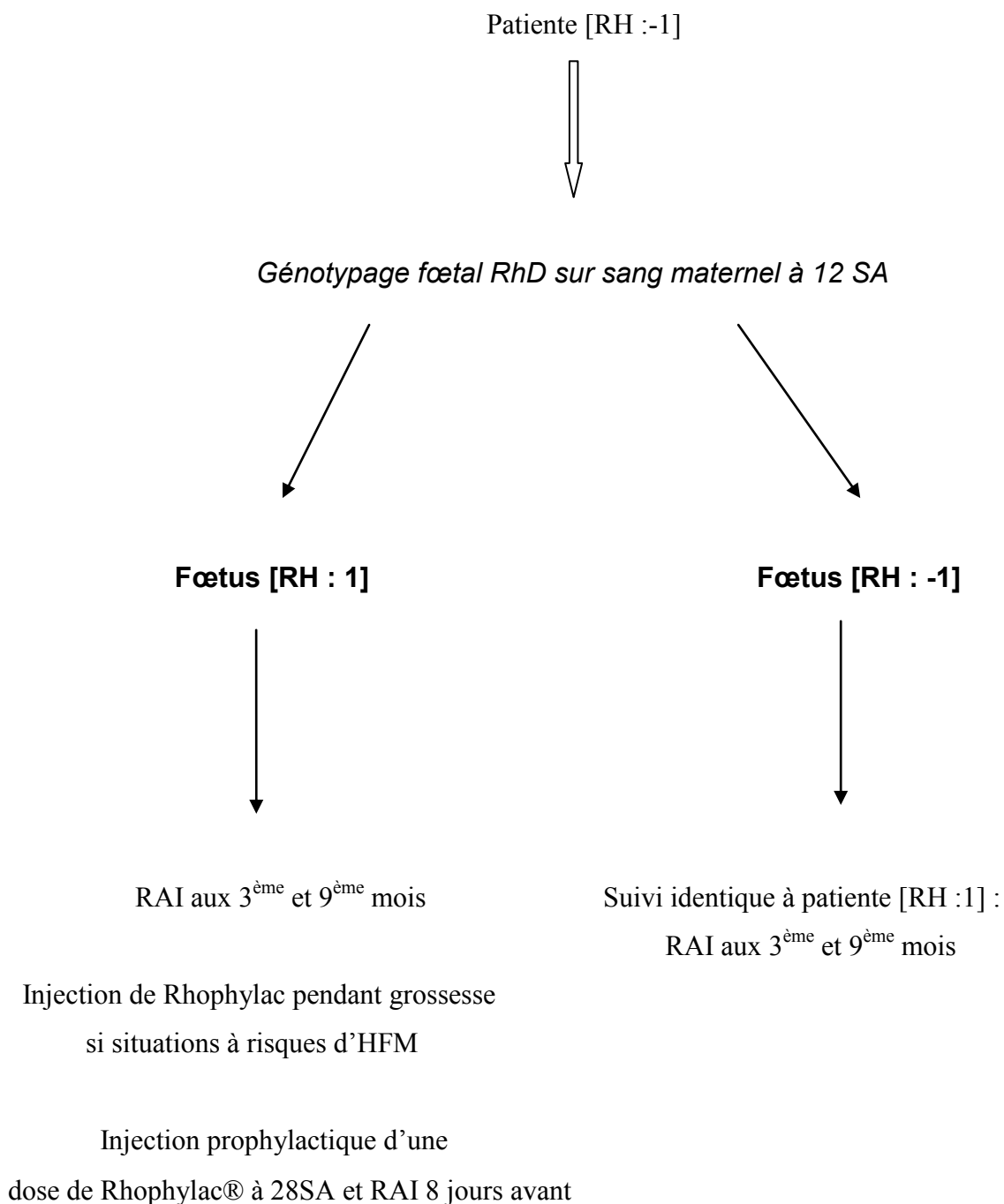
C'est alors que l'introduction du génotypage fœtal dans le suivi de grossesse des patientes [RH :-1] peut avoir son intérêt. En effet, environ 40% de femmes [RH :-1] sont enceintes d'un enfant [RH :-1]. [6] Ces patientes ne sont alors pas à risque d'incompatibilité fœto-maternelle rhésus, donc leur suivi de grossesse peut être similaire à celui des patientes [RH :1].

La connaissance du rhésus D fœtal en début de grossesse (génotypage fœtal vers 12 SA) classerait les patientes [RH :-1] en deux groupes :

- Patientes dont le fœtus est [RH :1], et dont le suivi est tel qu'exposé dans les recommandations du CNGOF : RAI, Rhophylac®...

- Patientes dont le fœtus est [RH :-1] et dont le suivi ne nécessite pas d'injections d'immunoglobulines anti-D et un suivi RAI allégé..

Ainsi, un nouveau schéma de suivi des patientes rhésus D négatif pourrait être établi de la manière suivante :



3. LE GENOTYPAGE FOËTAL : UNE ETUDE DE COUTS

Le deuxième recueil de données nous a permis de constater que nombreux sont les examens (injections d'immunoglobulines spécifiques anti-D, bilan sanguin) réalisés alors qu'ils n'ont pas d'intérêt : ce n'est en effet pas une grande révélation de dire qu'en connaissance du groupe sanguin fœtal, ces examens n'auraient pas été prescrits. Cependant, bien que la mise en place du génotypage fœtal permettrait de réaliser des économies en produits sanguins labiles, on ne peut pas affirmer qu'elle favoriserait des économies en terme de santé publique. Certaines patientes verraient en effet un allègement de leur suivi (pas d'injection d'immunoglobulines anti-D, diminution du nombre de RAI réalisées...), mais toutes bénéficieraient du génotypage fœtal rhésus sur sang maternel. Une étude de coûts est donc nécessaire.

➤ *Scénarii de prise en charge*

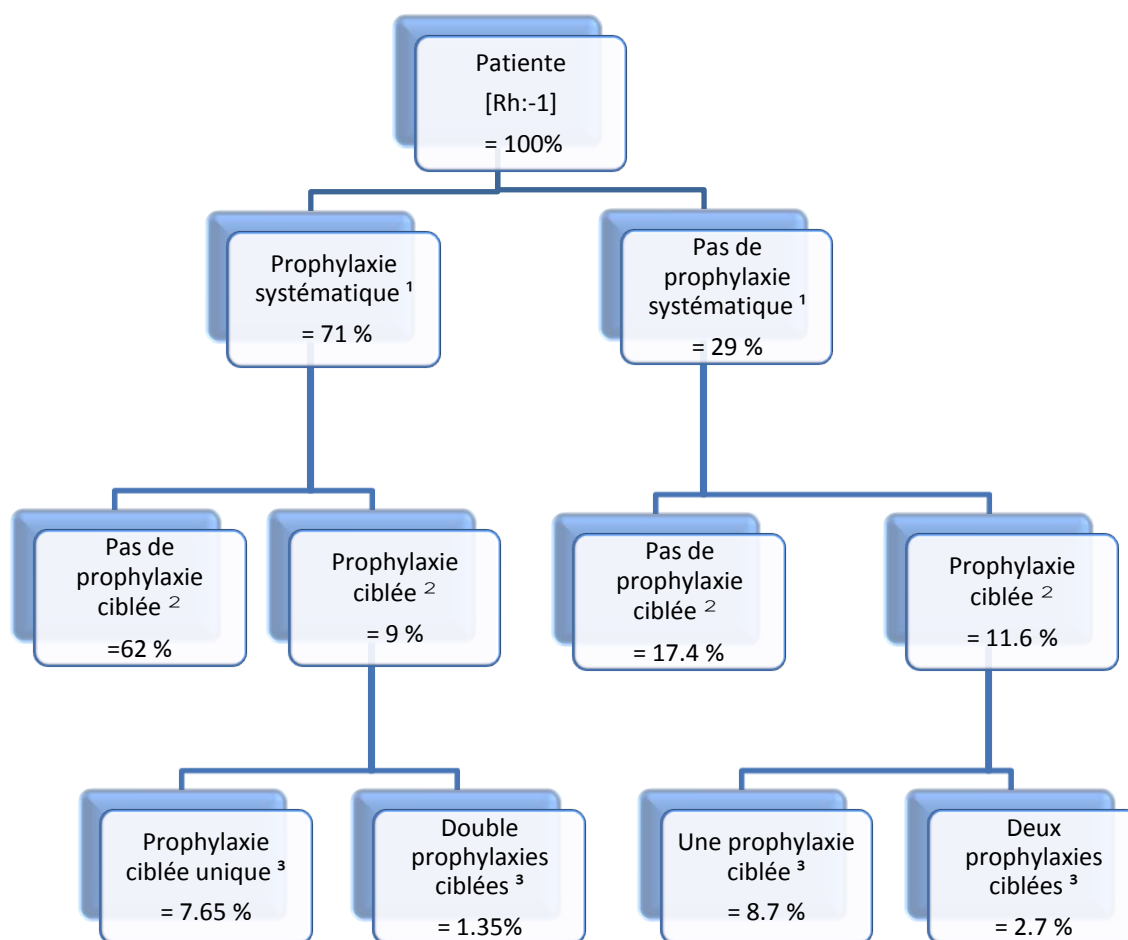
Pour réaliser notre étude de coûts, nous nous sommes appuyés sur les données observées dans notre étude pour établir les 2 scénarii de prise de charge suivant:

❖ *Prise en charge sans génotypage fœtal*

La prise en charge que nous considérons ici est celle suivant les recommandations pour la pratique clinique du CNGOF de 2005.

On rappelle que l'effectif de notre population s'élève à 70, incluant 40 patientes dont le fœtus est [RH :1], 30 dont le fœtus est [RH :-1].

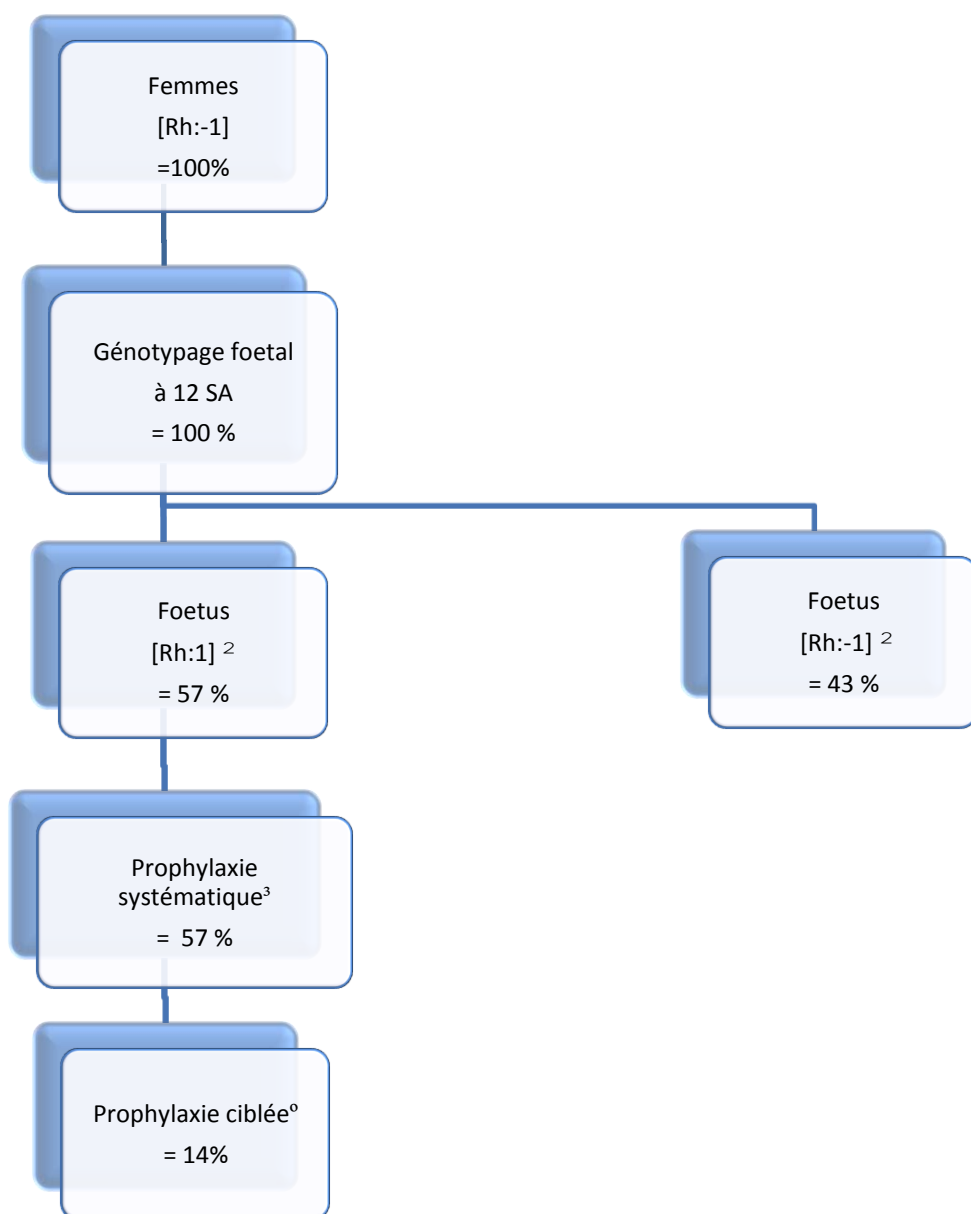
Figure 12 : Scénario de prise en charge n°1 : stratégie sans génotypage fœtal



- ¹: le premier étage de notre scénario distingue notre population en 2 sous-populations : celle ayant reçu une prophylaxie systématique à 28 SA, celle ne l'ayant pas reçu.
- ²: la distinction suivante (au 2^{ème} étage) provient du fait que parmi nos 2 sous-populations de patientes, certaines patientes recevront ou non une prophylaxie ciblée, qu'elles aient reçu ou non une injection systématique.
- ³: parmi les patientes ayant reçu une prophylaxie ciblée, certaines ne recevront qu'une dose d'immunoglobulines spécifiques anti-D, d'autres plusieurs doses en fonction des situations à risque d'HFM rencontrées.

❖ *Prise en charge avec génotypage foetal*

Figure 13 : Scénario de prise en charge n°2 : stratégie avec génotypage foetal



¹: on estime ici que toutes les patientes [RH :-1] bénéficient du génotypage foetal rhésus sur sang maternel.

²: notre population sera divisée en 2 sous-populations de patientes: celle dont le fœtus est [RH :-1] ; celle dont le fœtus [RH :1]

³: on estime que toutes les patientes porteuses d'un fœtus [RH :1] recevront une prophylaxie systématique, suivant les recommandations du CNGOF de 2005.

° : On sait que 12% des grossesses sont incidentées par une situation à risque d'HFM au 1^{er} trimestre, 45% le sont au 2^{ème} et également au 3^{ème} trimestre [13]. Les grossesses de patientes [RH :-1] représentent 15% des grossesses totales. Ainsi, si on ramène les données aux 15% de grossesses de patientes [RH :-1], on a 0.6% des grossesses incidentées au 1^{er} trimestre, 6.75% au 2^{ème} trimestre et 6.75% au 3^{ème} trimestre, soit environ 14% au sein de notre population.

➤ **Evaluation des coûts**

Le coût des actes de biologie est fixé dans la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale [39]:

- RAI : B42 (11.34 euros)
- Identification des agglutinines irrégulières : B65 17.55 euros
- Test de Kleihauer : B70 (18.90 euros)

Le coût des doses d'immunoglobulines anti-D est fixé par convention entre le Comité économique des produits de santé (Ceps) et le laboratoire pharmaceutique qui les commercialise :

- 85.16 euros pour les doses de 300 µg/mL
- 61.57 euros pour les doses de 200 µg/mL

A cela, pourrait s'ajouter le coup d'une injection par une infirmière libérale: 4.35 euros.

- Ainsi, pour nos branches « prophylaxie systématique », cela revient à :

Tableau 9 : coût de revient en euros de la prophylaxie systématique par Rhophylac® par patiente

Coût d'une dose de 300 µg/mL	85.16
B42 (RAI)	11.34
B65 (identification des anticorps)	17.55
Coût de l'injection	4.35
Total	118.14

- Pour les branches « prophylaxie ciblée », nous obtenons :

Tableau 10 : coût de revient en euros de la prophylaxie ciblée par Rhophylac® par patiente

Coût d'une dose de 200 µg/mL	61.57
B42 (RAI)	11.34
B65 (identification des anticorps)	17.55
B70 (test de Kleihauer)	18.90
Coût de l'injection	4.35
Total	113.71

- Pour les RAI seules :

Tableau 11 : coût de revient en euros d'une RAI au cours de la grossesse

B42 (RAI)	11.34
B65 (identification des anticorps)	17.55
Total	28.89

- Pour la branche « génotypage fœtal », aucun calcul n'est à faire ; la difficulté réside dans le fait que le génotypage fœtal n'est pas inscrit à la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM). Il est possible pour nous de considérer le génotypage comme un acte de biologie moléculaire (B700) à 189 euros. Les laboratoires fixent actuellement le prix de cet acte et son coût est variable : **de 54 à 189 euros** [40]. Les conclusions de l'étude GENIFERH pourrait aboutir à l'inscription du génotypage fœtal à la NABM.

Quelques points particuliers :

- D'autres postes de coûts auraient pu intégrer notre logique comptable : le temps infirmier utilisé pour la réalisation de ces actes par exemple, le coût inhérent au stockage des produits sanguins labiles....

Les coûts totaux sont donc estimés à :

- Pour le scénario n°1 : stratégie sans génotypage fœtal :

Tableau 12 : Effectifs et coûts inhérents à la prévention de l'AIFM avec une stratégie sans génotypage fœtal

Population	Effectif	Coûts (en euros)
Toutes patientes [RH :-1] confondues	70	0
Prophylaxie systématique	50	5907
Prophylaxie ciblée unique après prophylaxie systématique	6	852.58
Prophylaxies ciblées multiples après prophylaxie systématique	1	227.42
Prophylaxie ciblée unique en dehors d'une prophylaxie systématique	6	682.26
Prophylaxies ciblées multiples en dehors d'une prophylaxie systématique	2	454.84
RAI	47	1357.83
Total		9481.93

Ce coût de 9481.93 euros correspond au suivi de prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle pour 70 patientes.

A la Maternité Régionale de Nancy, on sait qu'il y a 3600 accouchements par an. 15% de la population est [RH :-1], soit environ 540 patientes.

Le coût de la prévention à la Maternité Régionale de Nancy pour ces 540 patientes est estimé à 73146 euros.

- Pour le scénario n° 2 : stratégie avec génotypage fœtal (les coûts seront calculés avec le coût minimum et le coût maximum pour lesquels le génotypage fœtal est pratiqué à ce jour, c'est-à-dire 54 et 189 euros)

Tableau 13 : effectifs et coûts inhérents à la prévention de l'AIFM avec une stratégie avec génotypage fœtal

Population	Effectif	Coûts (en euros)
Génotypage fœtal sur sang maternel	70	3780 / 13230
Prophylaxie systématique (pour fœtus [RH :1])	40	4725.6
Prophylaxie ciblée	10	1137.1
RAI	80	2311.2
Total		11953.2 / 21403.9

Ces coûts correspondraient au suivi de la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle pour 70 patientes. En suivant le même raisonnement que précédemment, cette prévention incluant le génotypage fœtal sur sang maternel aurait un coût allant de 91 800 euros à 165 240 euros pour les 540 patientes [RH :-1] suivies annuellement à la Maternité Régionale de Nancy.

➤ **Comparaison de prise en charge**

Au total, pour notre population, la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle [RH :-1] revient à :

- 135 euros par patiente pour le scénario de prise en charge sans génotypage fœtal.
- De 170 à 306 euros par patiente pour le scénario de prise en charge avec génotypage fœtal.

Exemples de prise en charge :

- Exemple 1 : Grossesse avec fœtus [RH :-1] incidentée par une situation à risque d'HFM

Terme	Sans génotypage fœtal		Avec génotypage fœtal	
	Actes	Coûts	Actes	Coûts
12 SA	RAI	B42, 11,34€	RAI	B42, 11,34€
12 SA	Abstention		Génotypage fœtal: [RH:-1]	B700, 54 à 189€
16 SA	Métrorragies			
	RAI	B42, 11,34€	Abstention	
	TK	B70, 18,90€		
	Rhophylac® 200µg/mL	61,57 €		
	Injection	4,35 €		
28 SA	RAI+ identification	B42+B65, 28,89€	Abstention	
	Rhophylac® 300µg/mL	85,16 €		
	injection	4,35 €		
39 SA	RAI + identification	B42+B65, 28,89€	RAI + identification	B42+B65, 28,89€
	Total		Total	
	254,79 €		94,23 à 229,23€	

- Exemple 2 : Grossesse avec fœtus [RH :-1] non incidentée par une situation à risque d'HFM

Terme	Sans génotypage fœtal		Avec génotypage fœtal	
	Actes	Coûts	Actes	Coûts
12 SA	RAI	B42, 11,34€	RAI	B42, 11,34€
12 SA	Abstention		Génotypage fœtal: [RH:-1]	B700, 54 à 189€
28 SA	RAI+ identification Rhophylac® 300µg/mL injection	B42+B65, 28,89€ 85,16 € 4,35 €	Abstention	
39 SA	RAI + identification	B42+B65, 28,89€	RAI + identification	B42+B65, 28,89€
	Total		Total	
	158,63 €		94,23 à 229,23€	

- Exemple 3 : Grossesse avec fœtus [RH :1] incidentée par situation à risque d'HFM

Terme	Sans génotypage fœtal		Avec génotypage fœtal	
	Actes	Coûts	Actes	Coûts
12 SA	RAI	B42, 11,34€	RAI	B42, 11,34€
12 SA	Abstention		Génotypage fœtal: [RH:1]	B700, 54 à 189€
28 SA	RAI+ identification	B42+B65, 28,89€	RAI + identification	B42+B62, 28,89€
	Rhophylac® 300µg/mL	85,16 €	Rhophylac® 300µg/mL	85,16 €
	injection	4,35 €	injection	4,35 €
39 SA	RAI + identification	B42+B65, 28,89€	RAI + identification	B42+B65, 28,89€
Total			Total	
		158,63 €		
			212,63 à 347,63€	

Nous constatons que l'inclusion du génotypage fœtal augmente les coûts de la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle avec les 2 tarifs actuels appliqués par les laboratoires.

La différence est peu significative quand il s'agit de la borne inférieure de 54 euros. En revanche, la borne supérieure de 189 euros ferait supporter un supplément de 175 euros par patiente, soit une augmentation proche de 100%.

Les conclusions de l'étude GENIFERH pourraient aboutir à l'inscription du génotypage fœtal sur sang maternel à la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale, et son coût devrait se situer entre ces deux extrêmes.

L'économie de près de 40% de doses d'immunoglobulines spécifiques anti-D liées à l'introduction du génotypage fœtal dans nos pratiques ne compenserait pas les coûts liés à cette nouvelle technique.

En outre, nous sommes tous actuellement concernés par le déficit de la Sécurité Sociale, et chacun doit faire des efforts pour pallier ce déficit, autant du point de vue des professionnels que du point de vue des patients. Introduire de nouvelles pratiques qui augmenteraient le coût de la prévention n'est certainement pas d'actualité. Cependant, il faudrait faire un parallèle entre les finances utilisées pour la prévention versus les finances utilisées pour le traitement et la prise en charge des patientes allo-immunisées par absence ou défaut de prévention.

Bien que l'aspect économique ne soit pas un argument de poids en faveur de l'introduction du génotypage fœtal en routine quotidienne, d'autres aspects, et pas les moindres, nous semblent importants et pourraient contribuer prochainement à sa mise en place:

- **l'aspect éthique** : les immunoglobulines spécifiques proviennent de donneurs hyperimmunisés et rémunérés nord-américains et pourraient se faire de plus en plus rare. Les stocks s'épuisent et cet écoulement des stocks pourrait être minimisé en injectant spécifiquement aux patientes réellement dans le besoin. Par ailleurs, il n'est pas impossible qu'un virus émergent pathogène, actuellement inconnu, fasse son apparition et soit transmis par l'intermédiaire de ces injections. Le CNGOF rappelle bien dans ses recommandations pour la pratique clinique que : « dans tous les cas, l'exposition inutile à des produits dérivés du sang doit être évitée autant que possible ».
- **l'aspect médical** : l'utilisation du génotypage fœtal pourrait faciliter le suivi des patientes [RH :-1] par les obstétriciens et sages femmes : le suivi du calendrier de la prévention anténatale de routine anti-D (PARAD) se limiterait à certaines patientes (dont le fœtus est [RH :1] et une meilleure observance des recommandations pourrait en découler.
- **l'aspect psychologique des patientes** : cet aspect peut paraître moindre par rapport aux précédents, mais la connaissance du groupe sanguin fœtal en début de grossesse permettrait aux praticiens d'informer chaque patiente

spécifiquement, et de ne pas alerter inutilement celles qui ne courent aucun risque d'AIFM [RH :-1].

La diminution du nombre d'examens réalisés peut assurer un certain confort maternel et contribuer à l'instauration d'un climat en faveur de la physiologie.

De plus, les patientes semblent parfois inquiètes à l'idée de recevoir des produits dérivés du sang, en particulier quant aux risques de transmission virale ; le nombre de patientes concerné serait alors plus restreint.

Conclusion

La généralisation de l'utilisation d'immunoglobulines spécifiques anti-D dans la prévention anténatale de l'allo-immunisation fœto-maternelle [RH :-1] de 2005 concerne chaque année près de 195 000 patientes [RH :-1].

Or, parmi ces futures mères, 40% sont porteuses d'un fœtus [RH :-1], qui ne sont donc pas à risque de développer une allo-immunisation fœto-maternelle [RH :-1]

Une technique novatrice pourrait bientôt faire son apparition dans nos pratiques quotidiennes : le génotypage fœtal sur sang maternel, qui permettrait une prévention spécifique uniquement indiquée chez les patientes dont le fœtus est [RH :1]

En effet, la mise en évidence d'ADN fœtal libre dans la circulation maternelle permet de déterminer la présence du gène RhD fœtal dans le plasma maternel.

Il s'agit de la première technique de diagnostic prénatal non invasive, qui ne majore pas le risque de perte fœtale ni d'aggravation du processus d'allo-immunisation.

L'intérêt d'une généralisation du génotypage fœtal à toutes les patientes [RH :-1] semble évident: il permet d'alléger le suivi des patientes dont le fœtus est [RH :-1] (pas d'injection d'immunoglobulines, nombre de RAI réalisées moindre) et de ne réserver l'exposition à des produits dérivés du sang qu'aux patientes [RH :-1] porteuses d'un fœtus [RH :1]. De plus, par rapport à ce sujet, il ne semble pas exister d'homogénéité de pratique dans le suivi de ces patientes par les obstétriciens et les sages femmes. L'inclusion du génotypage fœtal dans le suivi des grossesses pourrait permettre une meilleure observance des recommandations par les praticiens.

Le principal écueil à cette technique réside dans le fait que actuellement l'acte n'est pas inscrit à la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale, donc non remboursé par la Sécurité Sociale et avec un coût fixé indépendamment par les laboratoires. En raison de ce frein économique, il ne peut donc pas faire l'objet d'une proposition systématique aux patientes.

Par ailleurs, malgré l'économie de 40% de doses d'immunoglobulines spécifiques anti-D, les coûts liés à cette nouvelle technique ne seraient pas compensés et le coût global de la prévention de l'allo-immunisation pourrait augmenter à court terme. Cependant, d'un point de vue médical et d'un point de vue éthique à travers notamment

la raréfaction des immunoglobulines d'origine humaine, la généralisation du génotypage fœtal sur sang maternel semble raisonnable.

Pour pallier cette éventuelle pénurie de produits dérivés du sang, une nouvelle perspective d'avenir pourrait faire son apparition : les anticorps monoclonaux anti-D. Les bénéfices résident essentiellement dans le fait que la sécurité biologique est totale et que le risque de rupture de stock est impossible. Les résultats cliniques obtenus actuellement sont prometteurs, mais une étude à grande échelle est nécessaire pour pouvoir généraliser l'emploi des anticorps monoclonaux anti-D.

BIBLIOGRAPHIE

- [1]MIQUEL,E., CAVELIER,B., BONNEAU,J.C., ROUGER,P. Incompatibilités fœto-maternelles érythrocytaires (IFME) : de la surveillance immunohématologique des femmes enceintes à la maladie hémolytique du nouveau-né (MHNN). *Transfusion clinique et biologique*, 2005 ; vol.12, n°1, p.45-55.
- [2]ANDRE BOTTE, C. Enseignement théorique : « Groupes sanguins, anticorps, sécurité transfusionnelle, allo-immunisation fœto-maternelle. » Ecole de Sages Femmes de Nancy, 21 septembre 2010.
- [3]RIGAL,D., MEYER, F., MAYRAND , E., DUPRAZ, F. Les allo-immunisations fœto-maternelles anti-érythrocytaires : état de l'art en 2008. *Revue francophone des laboratoires*, 2008 ; n°402, p.52-62.
- [4]CHIARONI,J., FERRERA,V., DETTORI, I., ROUBINET,F. Groupes sanguins érythrocytaires. *Hématologie*, 2005 13-000-R-50,
- [5]LEBLANC, R.M. Comment déterminer le génotypage fœtal rhésus D sur prélèvement sanguin maternel. *OptionBio*, 2007 ; n°384, p.15.
- [6]BRANGER, B., WINER, N. Epidémiologie de l'allo immunisation D pendant la grossesse. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 2006 ; n°35 (suppl 1) :1S87-1S92
- [7]INSEE. Statistiques d'état civil sur les naissances en 2008. [en ligne]. Disponible sur http://www.insee.fr/fr/themes/document.asp?ref_id=sd20081 [consulté le 16/06/11]
- [8]DREES. Les interruptions volontaires de grossesses en 2007. Etudes et résultats [en ligne]. Disponible sur <http://www.sante.gouv..fr/IMG/pdf/er713.pdf>
- [9]BOUYER, J. Epidémiologie de la grossesse extra-utérine. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 2003 ; vol. 32, n°57, p.8-17.

- [10]Collège National Des Gynécologues et Obstétriciens Français. *Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D fœto-maternelle (2005)* [en ligne]. Disponible sur : <http://www.cngof.asso.fr> [consulté le 12/04/11].
- [11]CHEUTET, S., BRETELLE, F., DEMEESTER, A., GAMERRE, M. Diagnostic des hémorragies fœto-maternelles et test de Kleihauer. *La revue Sage-femme*, 2007 ; n°6, p.5-13.
- [12]HUISSOUD, C., DIVRY, V., RUDIGOZ, R. Hémorragie fœto-maternelle : le point de vue du clinicien. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 2009 ; n°38, p.286-297.
- [13]EMC. *Allo immunisation fœto-maternelle érythrocytaire* [en ligne]. Disponible sur : <http://em-premium.com> [consulté le 5 septembre 2011]
- [14]DENIS, V. La prévention de l'allo-immunisation Rhésus D fœto-maternelle. *Vocation sage femme*, 2008 ; n°66, p.20-24.
- [15]POISSONIER, M. Allo-immunisation fœto-maternelle érythrocytaire. In : DUMEZ, Yves *Médecine fœtale et diagnostic prénatal*. 2° éd. Rueil Malmaison : Doin, 2004, p.105-110.
- [16]CARBONE, B., CASTAIGNE, V., CYNOBER, E. et al. Le point sur le suivi des allo-immunisations érythrocytaires. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*, 2010 ; n°35, p.205-213.
- [17]HERMANN, M., POISSONNIER, M., GRANGE, G. et al. Intérêt du pic systolique de vélocité de l'artère cérébrale moyenne en fin de grossesse après exsanguino-transfusion itératives. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 2011 ; n°40, p.675-681.
- [18]MANNESSIER, L. La surveillance immunohématologique de la femme enceinte et la nouvelle politique de prévention de l'allo-immunisation anti-RH1. *Transfusion clinique et biologique*, 2007 ; n° 14, p.112-119.
- [19]EMILE, C. Recherche d'agglutinines irrégulières. *Vocation sage femme*, 2008 ; n°66 : 36-38.

[20]NOYE, S., KHATOU, F. Incompatibilité fœto-maternelle Rhésus D : de la découverte à nos jours. *Vocation sage femme*, 2009 ; vol.8, n°74, p.16-18.

[21]LFB®. Monographie Rhophylac®. 2006 ; p.3-37.

[22]HAS. Commission de transparence de l'HAS pour RHOPHYLAC 200 microgrammes/2 ml, solution injectable en seringue pré remplie et RHOPHYLAC 300 microgrammes/2 ml, solution injectable en seringue pré remplie ; 27 octobre 2004.

[23]Ministère de la santé et de la solidarité. Liste des médicaments renfermant ou non des substances vénéneuses autorisés aux sages femmes pour leur usage professionnel ou leur prescription auprès des femmes. Arrêté du 12/10/2005 modifiant l'arrêté du 23/02/2004. *Journal Officiel*, 8/11/2005, p.1-2.

[24]LINET, T. Prévention par Rhophylac et grossesse : une autre lecture. *Vocation sage femme*, 2008 ; n°66, p. 25-29.

[25]RAVINET, J., CARBONNE, B. Analyse économique de la prévention de l'immunisation anti-D. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 2006 ; n°35, p.104-111.

[26]CORTEY, A., BROSSARD, Y., BELIARD, L., BOUREL, D. Prévention d'allo-immunisation fœto-maternelle : perspectives. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 2006 ; n°35, suppl. 1, p.119-122.

[27]COSTA, J., BAZIN, A. Approche non invasive du diagnostic prénatal biologique : du génotypage rhésus D à la trisomie 21. *La revue sage femme*, 2008 ; vol.8, n°33, p.130-133.

[28]COSTA, J., BENACHI, A. Diagnostic prénatal par prélèvement de sang maternel. *Gynécologie/Obstétrique*, 2005 ; n°5, p.31-40.

[29]COSTA, J. Nouvelle approche non invasive de diagnostic prénatal : l'analyse de sang maternel. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 2003 ; n°32, p.48-49.

- [30]LAMORIL, J., BOUIZEGARENE, P., AMEZIANE, N. et al. Les acides nucléiques solubles dans le sang : intérêt et perspectives. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 2004 ; n°19, p.3-12.
- [31]OHASHI, Y. et al. Correlation of fetal DNA and human chorionic gonadotropin concentrations in second trimester maternal serum. *Clinical chemistry*, 2002 ; n°48, p.386-388.
- [32]GUIBERT, J., BENACHI, A. et al. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum : detection by real-time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Human Reproduction*, 2003; vol. 18, n°8 ; p.1733-1736
- [33]GONZALEZ, C. et al. Application of fetal DNA detection in maternal plasma : a prenatal diagnosis unit experience. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2005 ; n°53, p. 307-314.
- [34]HAS. Détermination prénatale du génotype RHD fœtal à partir du sang maternel. *Rapport d'évaluation technologique* ; 2011.
- [35]DA SILVA, N.R., DOURIEUX, S., TSOCHANDARIDIS, M. et al. Expérience pilote d'un contrôle de qualité externe pour le génotypage RhD fœtal sur sang maternel. *Séances Orales / Transfusion Clinique Et Biologique*, 2011 ; n°18, p.328-337.
- [36]CNGOF. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus D foetomaternelle. Texte intégral et texte court des recommandations. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 2006; n°35, Suppl 1, p.135-181.
- [37]Décret no 92-143 du 14 février 1992 relatif aux examens obligatoires prénuptial, pré et postnatal.
- [38]CORTEY, A., BROSSARD, Y. Prévention de l'allo immunisation rhésus-D fœto-maternelle : effets indésirables et informations des patientes. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 2006 ; n°35, suppl 1, p.112-118.

[39]Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés. Nomenclature des actes de biologie médicale. Juin 2011.

[40]BROSSARD, Y., CORTEY, A., MAILLOUX, A et al. La prévention anténatale de routine anti-D (PARAD), situation en 2009. In LANSAC, J. DARAI, E. LUTON, D. , Mises à jour en gynécologie et obstétrique et techniques chirurgicales. Paris : édition Vigot ; 2009. p. 91-104

Table des matières

Dédicaces.....	2
Sommaire.....	3
Liste des abréviations.....	4
Introduction	5
Partie 1.....	7
1. Les groupes sanguins.....	8
1.1. Le système ABO [2]	8
1.2. Le système Rhésus [3]	9
2. L'allo immunisation foeto maternelle RH1 [5]	12
2.1. Définition.....	12
2.2. Epidémiologie [6]	12
2.3. Physiopathologie	13
2.3.1. Circonstances de survenue et passage transplacentaire des hématies foetales [13], [14]	13
2.3.2. Réponse immunitaire primaire [13]	16
2.3.3. Réponse immunitaire secondaire [13]	16
2.3.4. Mode d'action des anticorps [13]	16
2.4. Conséquences périnatales de l'AIFM [14]	18
2.5. Suivi et traitement des AIFM	19
2.5.1. Suivi et prise en charge des AIFM [16]	19
2.5.2. Thérapeutiques intra-utérines	22
2.5.3. Thérapeutiques postnatales	22
2.6. Suivi immunohématologique de la grossesse et prévention [10], [18]	22
2.6.1. Le dépistage	23
2.6.2. La prophylaxie	25
2.6.2.1. Historique [10]	25
2.6.2.2. Définition	26
2.6.2.3. Prophylaxie au 1 ^{er} trimestre	26
2.6.2.4. Prophylaxie au 2 ^{ème} trimestre	26
2.6.2.5. Prophylaxie au 3 ^{ème} trimestre	27
2.6.2.6. Pour l'accouchement	27
2.6.3. Rhophylac®, le seul produit utilisé à ce jour [20], [21], [22]	28
2.6.3.1. Fabrication et sécurité	28
2.6.3.2. Délivrance et traçabilité	29
2.6.3.3. Indications	30
2.6.3.4. Effets indésirables [24]	30
2.6.4. Coût de la prévention [25]	30
2.6.5. Alternatives	31
2.6.5.1. Les immunoglobulines monoclonales anti-D [26]	31
2.6.5.2. Le génotypage fœtal	32
3. Le génotypage fœtal.....	33
3.1. Découverte de l'ADN fœtal libre circulant dans le sang maternel	33

3.2.	Caractéristiques de l'ADN fœtal libre	34
3.2.1.	Origine [27], [30].....	34
3.2.2.	Cinétique et quantité d'ADN	34
3.2.3.	Mise en évidence et analyse [28].....	35
3.2.4.	Résultats	36
3.2.5.	Limites [28]	36
3.3.	Rapport de l'HAS [34]	37
Partie 2.....		39
1. Méthodologie de recherche		40
1.1.	Choix du thème.....	40
1.2.	Objectifs de l'étude.....	40
1.2.1.	Première sous étude : « évaluation du suivi des recommandations ».....	40
1.2.2.	Deuxième sous étude : « évaluation de coûts »	41
1.3.	Les hypothèses.....	41
1.4.	Description de l'étude.....	41
1.4.1.	Première sous étude : « évaluation du suivi des recommandations ».....	41
➤	Méthodes	41
➤	Population.....	41
➤	Type d'étude	42
1.4.2.	Deuxième sous étude : « évaluation de coûts »	42
➤	Méthodes	42
➤	Population.....	42
➤	Type d'étude	42
2. Présentation des résultats		43
2.1.	Présentation des résultats de la première sous-étude : « évaluation du suivi des recommandations ».....	43
➤	La prophylaxie systématique et ciblée.....	43
❖	Patientes ayant bénéficié de la prophylaxie systématique	43
❖	Patientes ayant bénéficié d'une prophylaxie ciblée.....	45
➤	Nombre de RAI réalisées lors du suivi de grossesse de patientes [Rh :-1]	46
❖	Nombre total de RAI réalisées	46
❖	Les RAI « obligatoires »	47
○	Lors de la déclaration de grossesse	47
○	Avant injection de Rhophylac®	47
○	En ce qui concerne la RAI du 8 ^{ème} mois	47
○	La RAI réalisée à l'accouchement	48
2.2.	Présentation des résultats de la deuxième sous étude : « évaluation de coûts »	49
Partie 3.....		54
1. LIMITES ET BIAIS DES ETUDES		54
1.1.	Limites de nos études	54
1.2.	Biais de nos études	54
2. Le non suivi optimal des recommandations du CNGOF de 2005		56
➤	Concernant la prophylaxie systématique	56
❖	La sécurité virale.....	57

❖	Les risques de réaction de type allergique et les manifestations à type d'hypersensibilité	57
❖	Les risques de réaction hémolytiques après une hémorragie fœto-maternelle importante	57
➤	Concernant le nombre de RAI réalisées lors du suivi de grossesse de patientes [RH :-1]	57
❖	La RAI avant injection de Rhophylac.....	58
❖	La RAI du 8 ^{ème} mois	59
❖	La RAI à l'accouchement	59
➤	Conclusion de la sous étude « évaluation du suivi des recommandations » 60	
3.	Le génotypage fœtal : une étude de coûts	62
➤	Scénarii de prise en charge	62
❖	Prise en charge sans génotypage fœtal	62
❖	Prise en charge avec génotypage fœtal	64
➤	Evaluation des coûts	65
➤	Comparaison de prise en charge	69

L'intérêt du génotypage fœtal dans la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle [RH :-1].

Présenté et soutenu par : *Mademoiselle Alison SANZEY*

Sous la direction de : *Madame Mardjane NADJAFIZADEH, sage femme cadre enseignante*

Sous l'expertise de : *Madame le Docteur Christine ANDRE-BOTTE*

Résumé :

Les avancées de la science ont permis de mettre en évidence de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel. Ces progrès offrent de nouvelles perspectives de diagnostic prénatal non invasif, notamment en matière d'allo immunisation fœto-maternelle rhésus.

Instaurée en 2005, la prévention systématique par immunoglobulines anti-D a permis une meilleure prise en charge des patientes rhésus négatif. Néanmoins, ces produits sanguins labiles sont rares et posent des problèmes éthiques. Le génotypage fœtal rhésus sur sang maternel permettrait de connaître le groupe sanguin rhésus fœtal en début de grossesse et de réaliser l'immunoprophylaxie, spécifiquement aux patientes porteuses d'un fœtus rhésus positif.

Dans le cadre de cette étude, il a été réalisé dans un premier temps une évaluation du suivi des recommandations avant de procéder dans un second temps à une évaluation de coûts, en mettant en parallèle les deux stratégies de suivi des patientes rhésus négatif envisageables : avec ou sans génotypage fœtal.

Mots clés :

Allo-immunisation fœto-maternelle [Rh :-1] ; génotypage fœtal rhésus à partir de sang maternel ; évaluation de coûts ; immunoprophylaxie; immunoglobulines

Summary :

In 1997, scientists gave rise to fetal free DNA in maternal blood. It offers us new future prospects in prenatal diagnosis, especially in rhesus blood system incompatibility.

A systematic prevention with polyclonal antibodies has been introduced in 2005; but polyclonal antibodies are rare and suggest ethical problems. Fetal RhD genotyping make us discover fetus blood-type at the beginning of the pregnancy. That's how only mothers whose fetus is rhesus positive will receive specifically polyclonal antibodies.

Within our study, we first carried out an evaluation of the follow -up of CNGOF recommendations. Then we tried to lead an assessment of the costs that the daily use of fetal RhD genotyping would imply

Key words :

Rhesus blood system incompatibility ; Fetal RhD genotyping from maternal blood ; assessment of the costs ; immunoprophylaxis ; polyclonal antibodies

