

# Les conférences scientifiques du SJBMM-IdF

Deuxième édition  
23 juin 2014



# Maladie Hémolytique du Nouveau-Né MHNN

*Dr Huguet-Jacquot*

*UF de biologie du CNRHP (responsable Dr Mailloux)*  
**Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale**  
**Pôle de Biologie médicale et Pathologie**  
**HUEP – AP-HP**

# DEFINITION

Etat hémolytique présent chez le fœtus & le nouveau-né s'exprimant :

- Chez le fœtus: par une anémie si le processus hémolytique est marqué. S'il est sévère, on observe une **anasarque foeto-placentaire** suivie de peu par une mort foetale *in utero* (**MFIU**);
- Chez le Nouveau-né :
  - par une anémie déjà présente à la naissance ou se constituant durant les premiers mois de vie.
  - par un ictère hémolytique, souvent précoce (premier jour de vie) et rapidement intense, pouvant conduire à une encéphalopathie bilirubinique, mortelle ou gravement séquellaire : **L'ICTERE NUCLEAIRE**

# ETIOLOGIES DE L'HEMOLYSE

- Anomalies membranaires du G.R.  
*Sphérocytose Héritaire, Elliptocytose,..*
- Déficits Enzymatiques du G.R.  
*Pyruvate Kinase (PK), Glucose 6 phosphate-déshydrogénase (G6PD)*
- Allo-immunisation maternelle anti-érythrocytaire dirigée contre les antigènes de membrane.  
*Anti-RH1(D), Anti-RH4(c), Anti-KEL1(Kell), Anti-A, Anti-B...*

# ORIGINE DE L'IMMUNISATION MATERNELLE

- Hétéro-immunisation: immunisation induite par des antigènes partagés par d'autres espèces (*bactéries, parasites, mammifères, végétaux*)
- Iso-immunisation transfusionnelle: *très efficace, mais pas obligatoire*
- Iso-immunisation foeto-maternelle: par microtransfusion transplacentaire de sang foetal (**hémorragie foeto-maternelle**): *concerne les antigènes les plus immunogènes.*

# PHYSIOPATHOLOGIE

---

1- Traversée trans-placentaire des anticorps maternels IgG via les récepteurs Fc $\gamma$ Rn dès le premier trimestre de la grossesse.

Taux foetal IgG à 20 SA : 10 % du taux maternel

2- Formation des immun-complexes Antigène-Anticorps sur le globule rouge foetal

3- Immuno-adhérence et érythrophagocytose par les macrophages spléniques

4- Survenue d'une anémie

5- Hyper-production de bilirubine avec accumulation post-natale et risque d'ictère nucléaire dès la première semaine de vie

# Objectifs de la surveillance du risque anémique foetal

---

- ❖ **Apprécier le risque d'anémie foetale et sa sévérité** pour déterminer si une intervention médicale est nécessaire qui suivant le terme se fera:
  - **in utero**
  - **À la naissance**
- ❖ **Surveillance spécifique** par une équipe **multidisciplinaire expérimentée**
- ❖ **En cas d'alloimmunisation connue, une consultation préconceptionnelle** est proposée afin **d'évaluer les risques potentiels d'une future grossesse et d'en informer le couple**

# **OUTILS BIOLOGIQUES POUR LE DIAGNOSTIC ET LE SUIVI DES INCOMPATIBILITES FOETO-MATERNELLES**



# SUIVI DE GROSSESSE : Les RAI

---

- **RAI D'INTERET FOËTAL**

**Femme RH:1** : au 1<sup>er</sup> trimestre

**Femme RH:-1 ou RH:1 avec ATCD transfusionnels** :  
au 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestre (sauf si injt° d'IgRH)

- **RAI D'INTERET MATERNEL (transfusionnel)** :  
en fin de grossesse

# DIAGNOSTIC-SUIVI BIOLOGIQUE

## ALLO-ANTICORPS COURANTS ET RISQUE DE MALADIE HEMOLYTIQUE

Spécificité (nomenclature traditionnelle)	Spécificité (nomenclature numérique)	Risque d'anémie foetale	Maladie hémolytique néonatale
Anti-D	Anti-RH1	OUI après 15 SA	OUI
Anti-Kell	Anti-KEL1	OUI après 15SA	OUI
Anti-c	Anti-RH4	OUI après 20 SA	OUI
Anti-E	Anti-RH3	RARE (3ème trimestre)	OUI
Anti-e	Anti-RH5	Exceptionnel	OUI
Anti-Fya	Anti-FY1	Exceptionnel	OUI
Anti-Jka	Anti-JK1	Exceptionnel	OUI
Anti-Kpa	Anti-KEL3	Exceptionnel	OUI
Anti-M	Anti-MNS1	Exceptionnel	OUI

# DIAGNOSTIC-SUIVI BIOLOGIQUE

## ALLO-ANTICORPS COURANTS ET RISQUE DE MALADIE HEMOLYTIQUE

Spécificité (nomenclature traditionnelle)	Spécificité (nomenclature numérique)	Risque d'anémie foétale	Maladie hémolytique néonatale
Anti-A	Anti-ABO1	NON	OUI
Anti-B	Anti-ABO2	NON	OUI
Anti-C	Anti-RH2	NON	OUI
Anti-Fyb	Anti-FY2	NON	OUI
Anti-Jkb	Anti-JK2	NON	OUI
Anti-S	Anti-MNS3	NON	OUI
Anti-G	Anti-RH12	NON	OUI

# DIAGNOSTIC-SUIVI BIOLOGIQUES

## Paramètres de l'Ac influençant le risque hémolytique

---

⇒ **Sa spécificité** : *déterminée par la RAI + IAI*

⇒ **Affinité** : **différente selon la spécificité**

*donnée par le titrage en Coombs indirect sur  
hématies tests natives*

⇒ **Pouvoir d'activation des récepteurs Fc** :

**fonction de la sous-classe IgG<sub>1</sub> ou IgG<sub>3</sub> et de la glycosylation Fc<sub>γ</sub>**

*déterminée par des tests fonctionnels (type ADCC)*

⇒ **Concentration** : **très grande variation (de 1 ng à 100 µg/ml)**

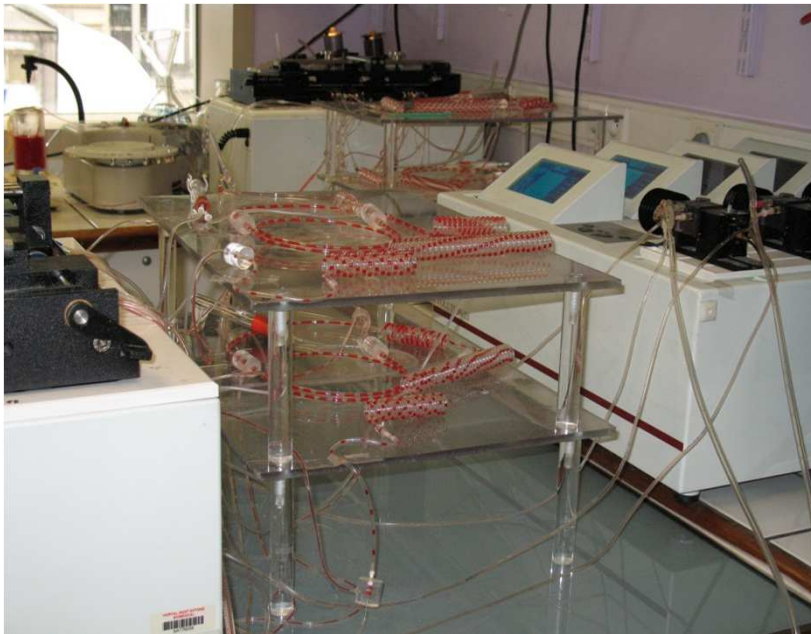
*déterminée / dosage pondéral ou approchée / titrage*

# Anticorps

## dans les cas d'anémie foetale sévère

	Anti-D (RH1)	Anti-c (RH4)	Anti-Kell (KEL1)
<b>Détection</b>	1 <sup>er</sup> trimestre. parfois limite de détection	Tjs au 1 <sup>er</sup> trimestre parfois limite de détection	Tjs au 1 <sup>er</sup> trimestre  Titre en TIA d'emblée très élevé
<b>GR test enzymatique</b>	Détection facilité	Détection très facilité	Aucun intérêt
<b>Pièges</b>	Confusion anti-D passif Réactivation fréquente	Titre en TIA souvent faible non prédictif d'une atteinte sévère	Agglutination parfois faible Grande variabilité du titrage inter- laboratoire

# I- LA TECHNIQUE DE DOSAGE PONDERAL



# DIAGNOSTIC-SUIVI BIOLOGIQUE

## Dosage pondéral des anticorps

---

**anti-RH1, anti-RH4, Anti-RH5, anti-RH3, Anti-RH2**

Dosage précis de la concentration en anticorps

$$250 \text{ UCHP/ml} = 5 \text{ UI/ml} = 1 \mu\text{g/ml}$$

Technique lourde

CV de la technique : 5 % à 20 %

**Variante 2 temps** : hématies tests traitées au préalable par broméline : haut rendement de fixation (résultat proche de la concentration réelle)

**Variante 1 temps** : broméline introduite directement dans le circuit, destruction des IgG3 (dosage des IgG1 de haute affinité)

# **II- LA TECHNIQUE DE TITRAGE**



# DIAGNOSTIC-SUIVI BIOLOGIQUE

## Titrage des anticorps

---

- Pour les autres anticorps : Titration en technique de Coombs indirect en tube (test indirect à l'antiglobuline-hématies tests normales-lecture macroscopique des agglutinats)

Expression : dernière dilution réactive (ex : 1/2.....1/256)

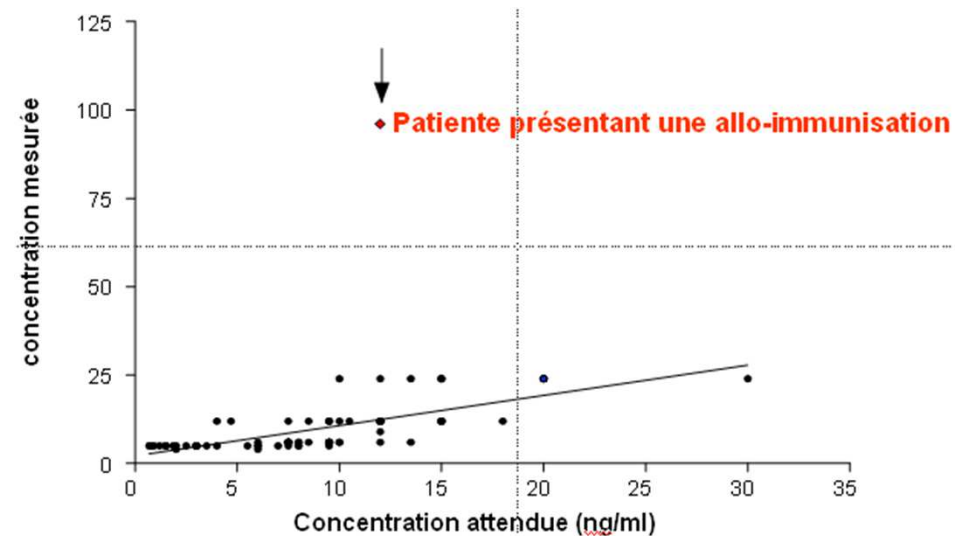
- Lecture directe : **IgM**
- Addition de l'anti-IgG : lecture en test indirect à l'antiglobuline
- Titration comparative / sérum précédent
- Attention aux titrations en support solide

# **III- LA TECHNIQUE DE MICROTITRAGE DES ANTI-RH1**

# INTERET DU MICROTITRAGE

## 3 QUESTIONS

1- ANTICORPS TROUVE DANS LE SERUM UNIQUEMENT EXPLICABLE PAR ANTI-RH1 PASSIF ( $\pm$  ANTI-RH1 immun?)



2- EST-CE QUE LA QUANTITE D'ANTICORPS EST SUFFISANTE POUR PROTEGER ?

Apport IgG anti-D  $\geq$  à 20  $\mu\text{g/ml}$  GR RH:1  $\rightarrow$  efficacité 100%

3- EST-CE QU'UN DOSAGE PONDERAL EST NECESSAIRE ?

$\mu\text{T} \geq 24\text{ng/ml}$

# **IV- LES TECHNIQUES DE GENOTYPAGE FOETAL**

# DIAGNOSTIC-SUIVI BIOLOGIQUES

## le génotypage foetal par PCR

---

### INVASIF

Liquide amniotique ou villosités choriales :  
*RHD, RHc, RHE, KEL1...*

*Méthodes validées*

*Indications : immunisations sévères anti-KEL1 ou anti-RHc avec géniteur hétérozygote*

### NON INVASIF

Sang maternel (ADN plasmatique) : RHD (2004), KEL1(2010)

*Méthode validée, accréditée pour le RHD et KEL1*

*Indications : toutes immunisations anti- D ou anti-Kell avec géniteur RHD ou KEL1 positif*

# LE GENOTYPAGE *RHD* FOËTAL NON INVASIF

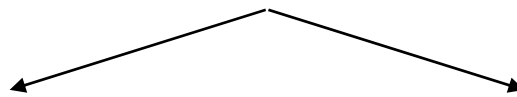
Free *DNA Fetal Kit*® RhD

Kit de génotypage foetal *RHD* à partir d'ADN foetal libre du sang maternel (Technique PCR Temps réel)

---

Amplification par PCR des séquences spécifiques du gène *RHD* et ADN *Maïs* :

- **EXON 10** (*plus sensible mais moins spécifique*)
- **EXON 7** (*plus spécifique mais moins sensible*)
- **EXON 5** (*permet de génotyper le foetus chez une mère possédant un variant silencieux Dpsi*)



**Amplification positive**  
**FOËTUS RHESUS D POSITIF**

Car : Absence de séquence du gène *RHD* chez la mère RH1 négatif

**PERMET DE LEGITIMER UNE SURVEILLANCE ANTENATALE**

**Amplification négative**  
**FOËTUS RHESUS D NEGATIF**

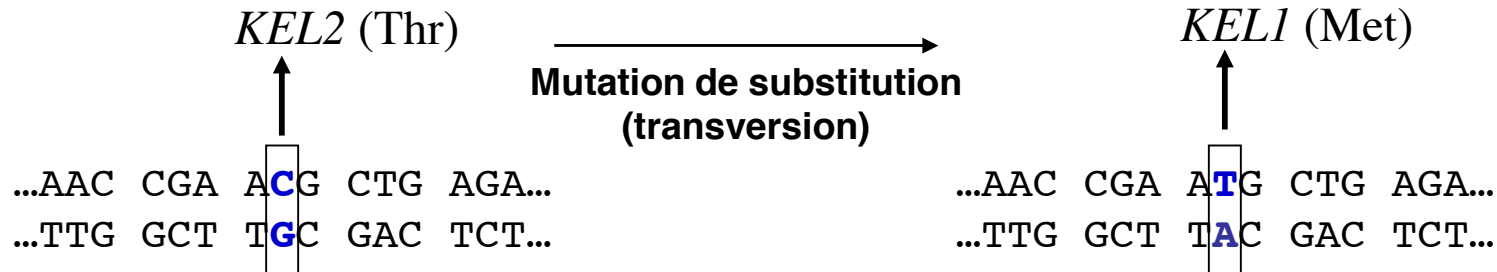
*(diagnostic par défaut)*

Ou amplification défectueuse

Ou concentré très faible d'ADN foetal

# GENOTYPAGE *KEL1* FŒTAL NON INVASIF

---



Examen basé sur

- 1- **PCR allèle *KEL1* spécifique** en temps réel (SyberGreen)  
réalisé **en triplicate** (91 pb)  
⇒ mise en évidence d'**ADN foetal *KEL1***
- 2- **PCR** de l'exon 7 du gène ***ABO*** en temps réel (SyberGreen)  
réalisé en **simplicite** (128 pb)  
⇒ représentation de la **quantité d'ADN maternelle**
- 3- PCR d'un ADN traceur (*Maïs*) en temps réel (TaqMan)  
⇒ **Validation** de l'étape **d'extraction**

**Tous les résultats doivent être confirmés sur un 2<sup>ème</sup> prélèvement réalisé plus tard au cours de la grossesse.**

# **DIAGNOSTIC ET SUIVI**

## **des allo-immunisations anti- érythrocytaires chez la femme enceinte**

### **EN PRATIQUE**

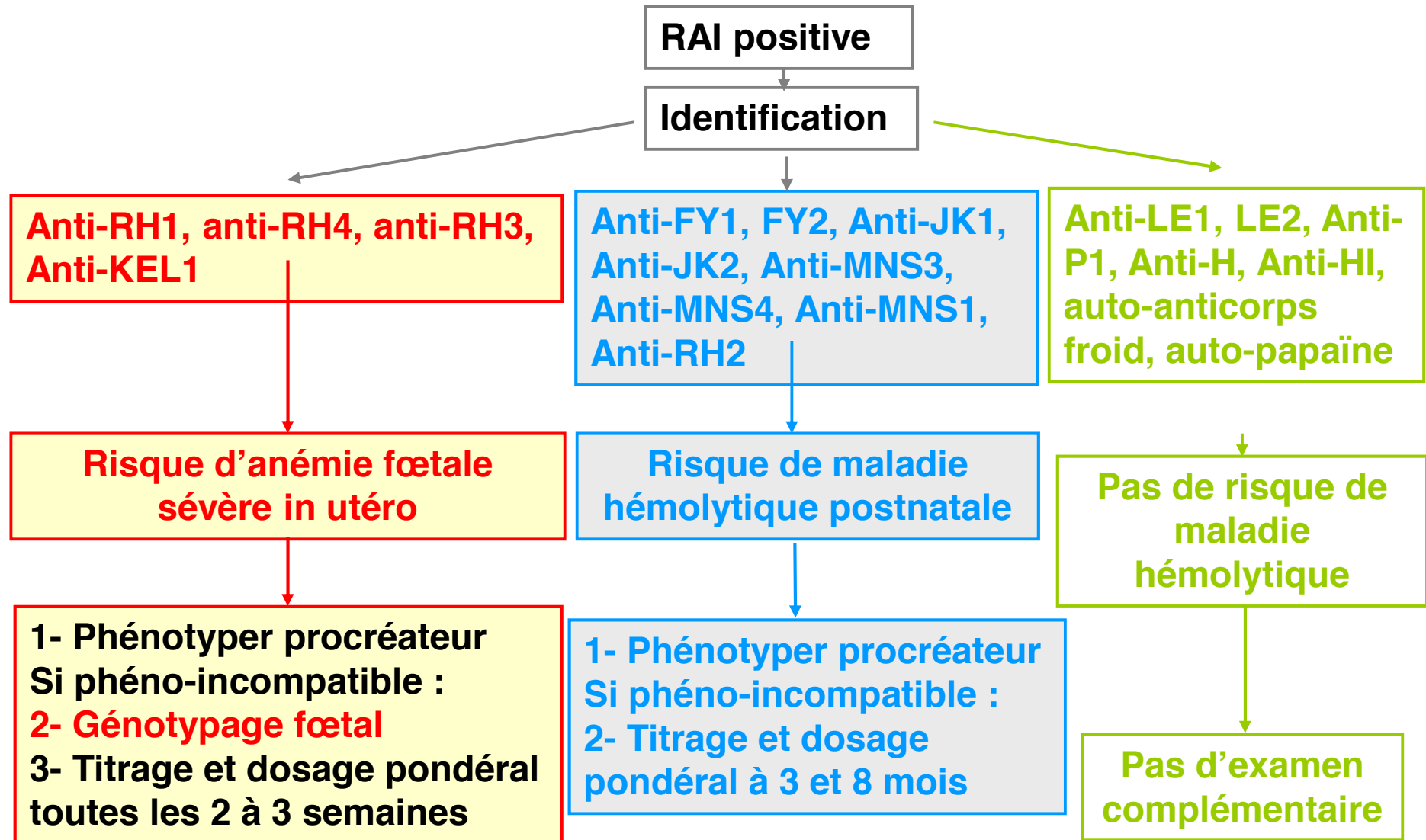


# DIAGNOSTIC-SUIVI BIOLOGIQUE

## Schéma de Titrage- Dosage

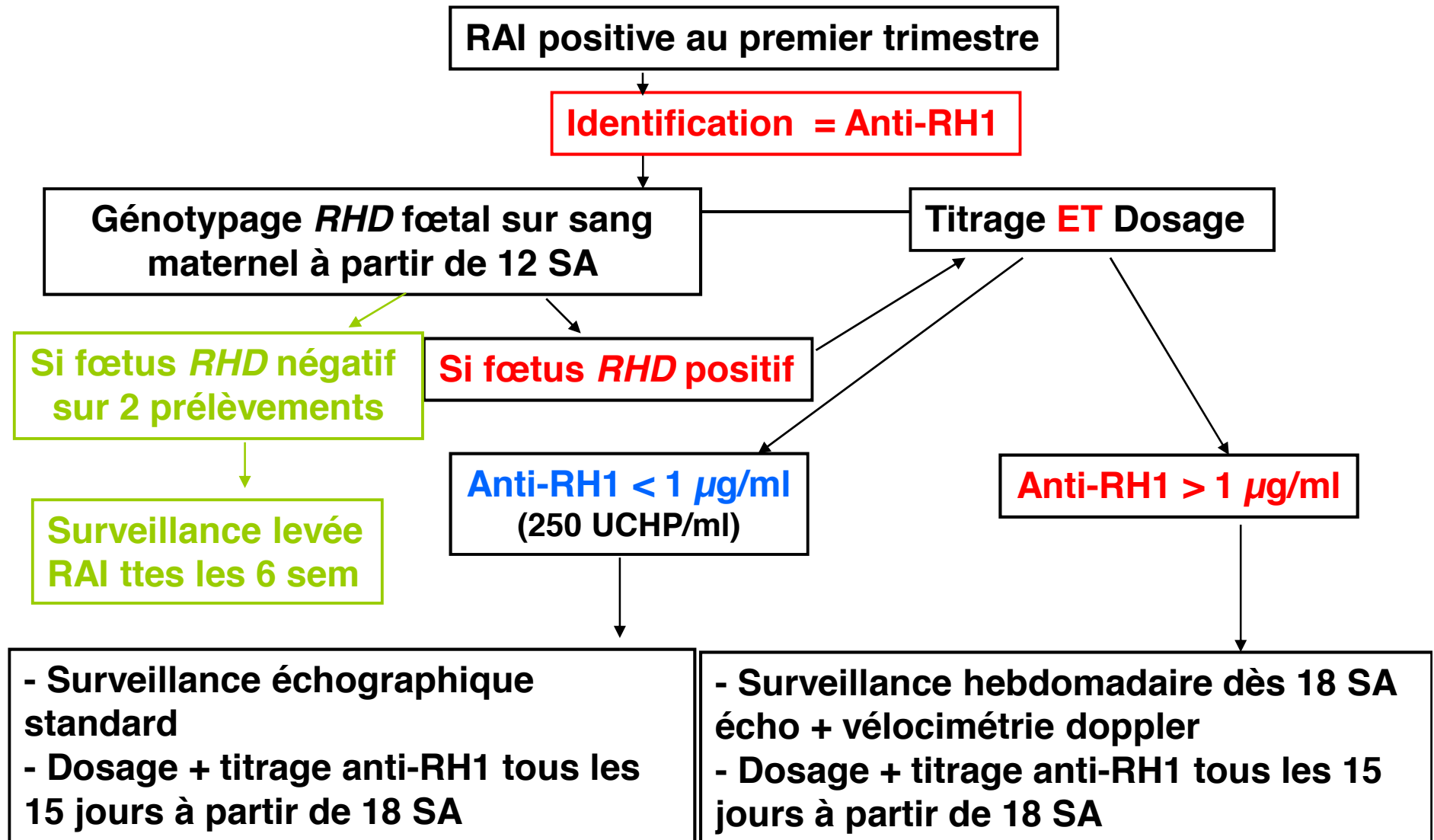
	Anti-RH1	Anti-RH4	Anti-Kell	Anti-RH3	Autres
<b>Dosage / Titration de référence</b>	+ sur GR natifs	+ sur GR natifs	+ sur GR natifs	NON	
<b>Dosage pondéral</b>	$\geq 1/8$	$\geq 1/4$	NON	$\geq 1/8$	NON sauf public RH2 RH5
<b>Réactivat°</b>	Fréquentes 3 <sup>ème</sup> trim	Fréquentes 3 <sup>ème</sup> trim	Rare 3 <sup>ème</sup> trim	Rare 3 <sup>ème</sup> trim	Rare 3 <sup>ème</sup> trim
<b>Fréquence dosages</b>	2 sem	2 à 4 sem	Tous les mois	6 <sup>è</sup> , 7 <sup>è</sup> et 8 <sup>è</sup> mois	3 <sup>è</sup> et 8 <sup>è</sup> mois
<b>Taux critiques</b>	250 UCHP	500 UCHP titre $\geq 1/4$	1/32	700 UCHP titre $\geq 1/8$	

# Dépistage et surveillance des incompatibilités foetomaternelles au cours de la grossesse



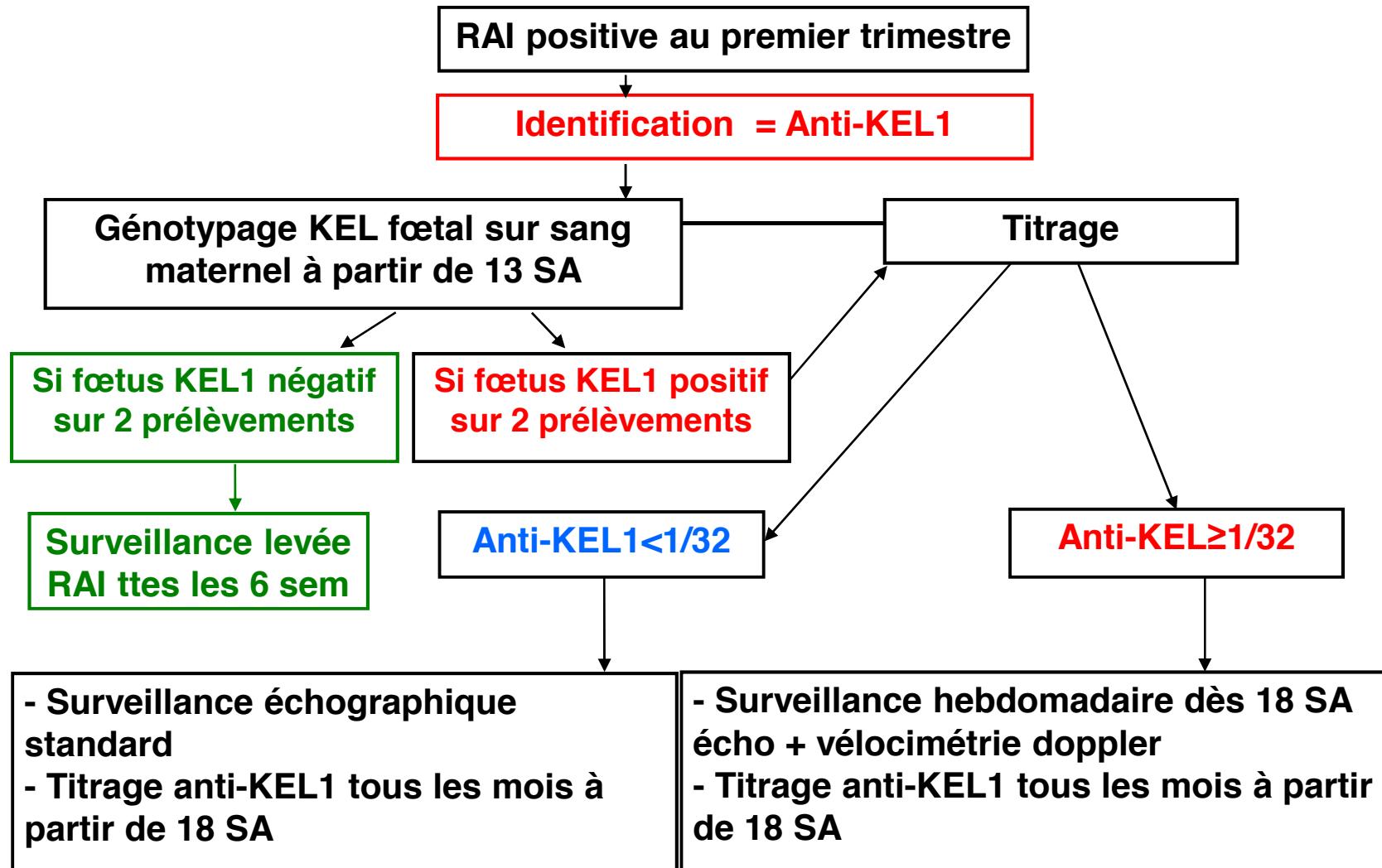
# Grossesse avec allo-immunisation anti-RH1

## Schéma de prise en charge



# Grossesse avec allo-immunisation anti-KEL1

## Schéma de prise en charge

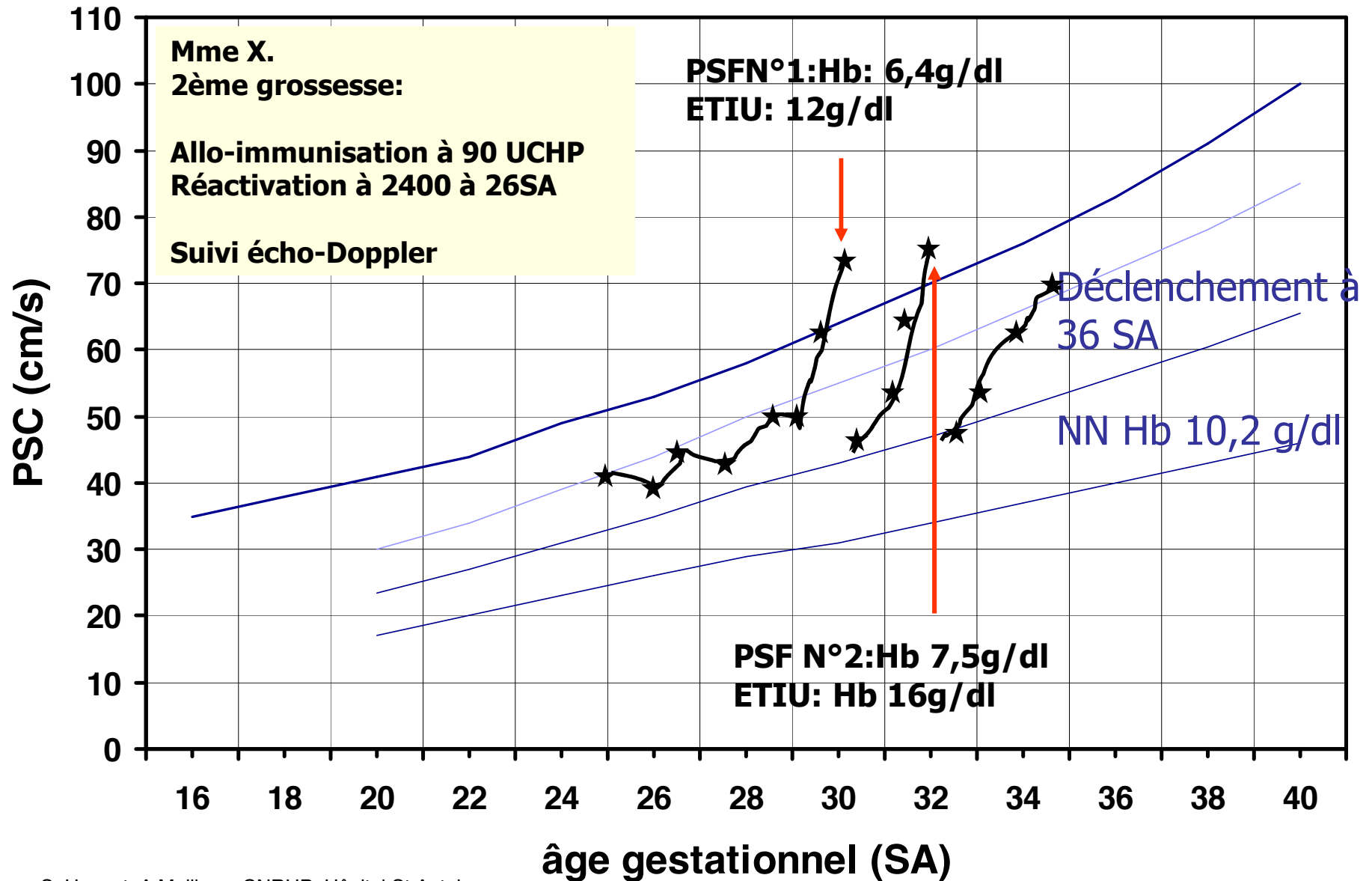


# Mme L. RH1 négatif, 2<sup>ème</sup> geste

Un accouchement à terme 8 ans auparavant. A reçu sa prophylaxie rhésus du post-partum

- **8 SA :** Première RAI dans un laboratoire privé ⇒ RAI positive ⇒ laboratoire centralisateur: identification anti-RH1 et titrage au ⇒ **CNRHP biologique: titrage <1/2; microtitrage: 6 ng/ml**
- ⇒ « **femme faiblement immunisée en début de grossesse**; prévoir un génotypage RHD du fœtus non invasif pour confirmer incompatibilité; titrage et dosage pondéral tous les 3 semaines au CNRHP»
- **15 SA: génotypage RHD fœtal sur plasma maternel**
- ⇒ « **fœtus RHD positif**; Grossesse en situation incompatible ; titrage et dosage /15 jours »
- **27 SA: anti-RH1 titrant au 1/16 et dosé à 0,4µg/ml**
- ⇒ « **activation de l'immunisation sans risque actuel d'anémie fœtale**; titrage et dosage/15j »
- **29 SA: anti-RH1 titrant à 1/32 et dosé à 1µg/ml**
- ⇒ « **Immunisation anti-RH1 s'aggravant à risque d'anémie fœtale**: suivi obstétrical spécialisé hebdomadaire et biologique spécialisée tous les 15 jours »
- ⇒ **Contact direct avec l'obstétricien et orientation vers un centre de compétence** (vélocimétrie doppler et transfusion fœtale)

# Suivi longitudinal: exemple



# Suivi des grossesses allo-immunisées

---

- Le **suivi longitudinal régulier non invasif mais spécialisé** permet de réduire le nombre d'urgences et d'accidents de grossesses au minimum.
- Ce suivi est indispensable pour donner les meilleures chances aux femmes immunisées d'avoir un enfant sans séquelle.
- La **naissance devrait pouvoir être programmée après 34 SA en coopération** avec une équipe pédiatrique et transfusionnelle.

# Surveillance Clinique et Biologique d'une incompatibilité Foeto- Maternelle

---

## ❖ Appréhender le risque en début de grossesse:

- Le **type d'alloimmunisation**: D, petit c, Kell
- Le devenir des **grossesses précédentes**
- La détermination du **phénotype du conjoint**
- Pour l'AI RhD, la détermination du **génotype du fœtus non invasive** (sur plasma maternel dès 12 SA)

## ❖ Surveillance Fœtale :

- **Suivi longitudinal du titrage-dosage** des anticorps
- **Echographie**
- **Doppler cérébral: PSV-ACM**

## ❖ **DONC UN LIEN FORT ENTRE CLINIQUE ET BIOLOGIE**



# **DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT POST-NATALS**

# Bilan Biologique postnatal (1)

1- Groupe ABO Rh et phénotypage orienté selon la spécificité de l'anticorps

2- Test direct à l'antiglobuline (Test de Coombs direct)

3- Elution

## Bilan Biologique postnatal (2)

4- Dosage de bilirubine dans le sang de cordon :  
estimation de l'intensité de la biligénèse

5- Dosages périodiques (1 à 3 fois par jour pendant  
la 1<sup>ère</sup> semaine) des différentes formes de bilirubine :  
totale, directe, BNL, BIE

6- NFS à J1 puis toutes les 24 à 48 h(1<sup>ère</sup> semaine)  
puis toutes les 1 à 2 semaines pendant 4 à 8 semaines

# Traitement postnatal

1- Correction simple d'une anémie :

- Transfusion

2- Atténuation de l'hyperbilirubinémie

- Photothérapie conventionnelle ou intensive

3- Correction d'une anémie et/ou d'une hyperbilirubinémie majeures :

- Exsanguino-transfusion de 2 à 3 masses sanguines avec du sang total reconstitué

# **IMMUNOPROPHYLAXIE RHESUS ANTENATALE ET POSTNATALE**

# INTRODUCTION

## INCOMPATIBILITES RHD

### FOETO-MATERNELLES EN FRANCE

	INCIDENCE estimée (pour 1000 naissances)	MORTALITE estimée & MORBIDITE SEVERE
<u>1966</u>	5 à 6 ‰ ↓ Prévention Rh ciblée Baisse de l'indice de fécondité ↓ ≈ 0,8 ‰	≥ 12% des cas ↓ Dépistage biologique Médecine néonatale Échographie foetale Transfusions foetales IV ↓ ≈ 4% des cas
<u>2006</u>		

# Immunisation foeto-maternelle traitement preventif

---

- Basé sur **l'injection d'IgG anti-D d'origine plasmatisque humaines** qui vont se fixer sur les sites antigéniques des GR RhD positifs entraînant une hémolyse : **action immunosuppressive.**
- **Quels produits?** (en France)
  - Hier: NATEAD® 100µg
  - Aujourd'hui: **RHOPHYLAC®** ; deux dosages
    - **200µg** (1000 UI) utilisable en IV et en IM pour la prophylaxie ciblée
    - **300µg**: AMM pour la prophylaxie systématique du 3ème trimestre

# IMMUNOPROPHYLAXIE RHESUS

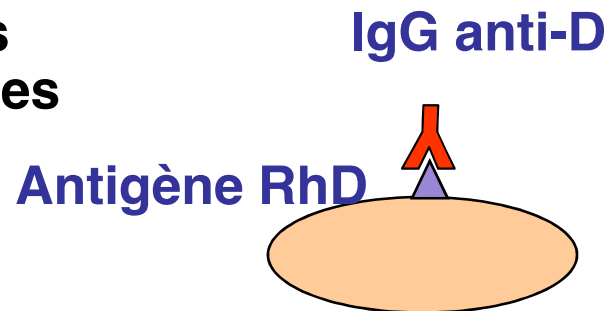
## Par injection d'anticorps IgG anti-D

---

### 3 MECANISMES POSSIBLES :

Tous dépendent de la formation d'un Immun-complexe

**I- Masquage des épitopes RhD** par saturation des sites antigéniques RhD.



**III- Destruction antigénique** par clairance macrophagique très rapide des globules rouges RhD+

**II- Inhibition des lymphocytes B** spécifiques par interaction entre le  $\text{RFc}_{\gamma\text{IIb}}$  lymphocytaire et le segment Fc des IgG anti-D.



## IMMUNOPROPHYLAXIE RHESUS

### Par Anti-D polyclonaux

---

Basée sur l'utilisation **d'immunoglobulines polyclonales anti-D (IgRh)** :

- **Seule source : fractionnement de plasma humain, contenant un titre élevé d'anticorps dirigés contre l'antigène RhD**
- **Plasma humain** : fourni par des donneurs RH-, hyperimmunisés par injections répétées de globules rouges RH+(rémunérés) plasmas collectés aux Etats-Unis + Canada
- **Spécialité commercialisée en France :**  
**RHOPHYLAC<sup>R</sup> (ZLB)**

# Efficacité immunosuppressive des IgG anti-D

---

## DEPEND :

Délai **d'administration** après introduction de l'antigène D

- Maximale dans les **72 heures**

**Biodisponibilité:** **la voie IV** doit être préférée à la voie IM si le test de Kleihauer est positif ou si l'on approche des 72h.

**Ratio  $\mu\text{g}$  IgG anti-D/ml Gl.R. RhD positifs:**

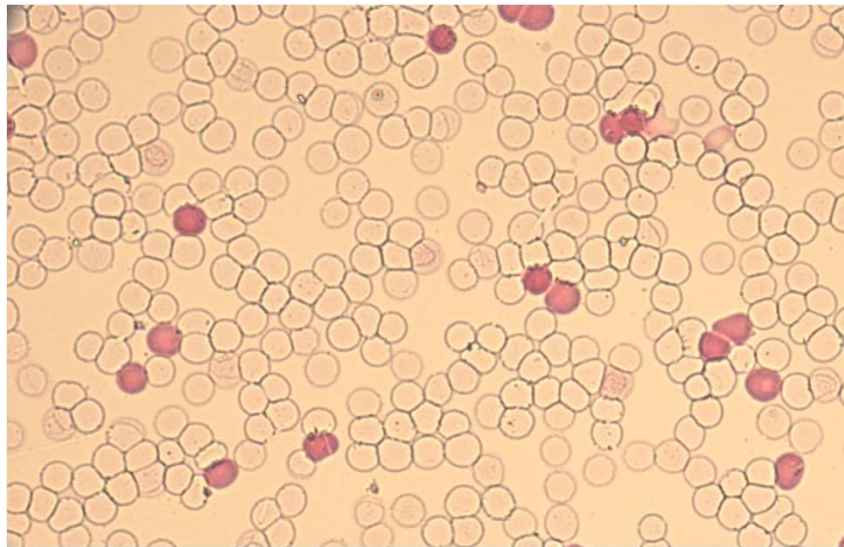
- Apport **IgG anti-D  $\geq$  à 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GR** foetaux RhD+:  
efficacité 100%

## IFME: Traitement préventif *adapter les doses d'anti-D.*

---

### Quantifier L'HFM par un Test de Kleihauer et adapter les doses d'anti-D.

- 200 $\mu$ g pour couvrir une HFM jusqu'à 24 HF/10 000
- Puis: 20  $\mu$ g par tranche de 4 HF/10 000 suppl...



**RESULTAT : 500 HF**  
**/10 000 HA :**  
**soit 250 ml de sang**  
**foetal**  
**(gros passage)**

# IMMUNOPROPHYLAXIE RHESUS

Taux cumulés d'immunisation anti-D en fin de grossesses chez la femme Rh négatif

⇒ Spontané

⇒ Après Ig Rh *post partum* seulement

⇒ + Ig Rh *ante partum* systématique

