

# Performance of non-invasive prenatal determination of fetal RHD genotype in the first trimester of pregnancy using a single exon real-time polymerase chain reaction

Vivanti AJ<sup>1</sup>, Benachi A<sup>1</sup>, Huchet FX<sup>2</sup>, Ville Y<sup>3</sup>, Cohen H<sup>4</sup>, Costa JM<sup>5</sup>

1 Hôpital Antoine Bécélère, Gynécologie-Obstétrique, Clamart, France, 2 Laboratoire de Biologie Médicale, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France, 3 Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France, 4 Département Mère-Enfant, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France, 5 Laboratoire CERBA, Département de Biologie Spécialisée et de Génétique, Saint-Ouen l'Aumône, France.

## Introduction

Le développement de la détermination non invasive du génotype RHD fœtal permet de réserver l'administration d'Ig humaines aux seules patientes le nécessitant. De plus, l'exclusion ou l'affirmation d'un génotype fœtal RHD positif offre la possibilité d'adapter les modalités de surveillance biologique et échographique chez des patientes antérieurement allo-immunisées. Bien qu'il existe une hétérogénéité des tests sur le marché, le génotypage fœtal RHD non invasif a démontré sa bonne performance diagnostique, indépendamment du terme de la grossesse.<sup>1,2</sup> Cependant, peu d'études ont rapporté des résultats concernant le premier trimestre de la grossesse.<sup>3,4,5</sup>

## Méthode

- Schéma expérimental : étude rétrospective, observationnelle, non interventionnelle.
- Période d'étude : 1er janvier 2007 au 31 décembre 2012.
- Population : patientes ayant un phénotype RHD négatif et ayant bénéficié d'une prescription d'un génotypage fœtal RHD par prise de sang maternelle entre la 10ème et la 14ème SA. Les indications de prélèvement pouvaient concerner :
  - Un dépistage à titre systématique ou un antécédent d'allo-immunisation
  - Un dépistage avant réalisation d'un geste invasif
  - Une autre situation à haut risque d'allo-immunisation (métrorragies, traumatisme, autre)Le génotypage était réalisé par le laboratoire Cerba® après envoi des prélèvements par un transporteur agréé.
- Modalités techniques de réalisation du génotypage fœtal RHD : 21 mL de sang total périphérique était prélevé chez les patientes dans des tubes secs avec gel séparateur. Les sérums étaient obtenus après centrifugation à 4°C pendant 10 minutes à 3000g, puis étaient aliquotés et conservés à -20°C.
  - Extraction de l'ADN : Un traceur de l'extraction et de l'amplification de l'ADN a été utilisé pour chaque manipulation : adjonction de 250pg d'ADN de souris (Sigma-Aldrich®) au sérum de chaque patient. L'ADN total a ensuite été extrait à l'aide d'un kit dédié (PCR Template Preparation Kit - Roche®) en accord avec les recommandations du fournisseur.
  - Amplification de l'ADN : la co-amplification des gènes RHD et de la superoxyde dysmutase (SOD - gène témoin de l'extraction) a été obtenue par PCR duplexe en temps réel sur un appareil LightCycler 2.0 (Roche®). Les produits d'amplification ont ensuite bénéficié d'un marquage par des sondes spécifiques couplées à des fluorochromes (LCRed640 pour le gène RHD ; LCRed705 pour le gène SOD). La procédure comportait un premier temps d'incubation d'une minute à 50°C en présence d'uracyle DNA glycosylase (Byolabs®) permettant la dégradation des éventuels produits contaminants des cycles précédents. Le 2ème temps (dénaturation) comportait une durée de huit minutes à 95°C. Enfin, le temps d'amplification comportait 3 étapes (50 cycles au total) :
    - Dénaturation : 95°C – 10 secondes – vitesse de chauffage : 20°C/s
    - Hybridation : 56°C – 10 secondes – vitesse de chauffage : 20°C/s
    - Elongation : 72°C – 15 secondes – vitesse de chauffage : 2°C/sTous les échantillons ont été analysés en duplicat. Chaque run de PCR a été effectué en présence d'un témoin positif (ADN issu d'un sérum connu RHD positif) et d'un témoin négatif (ADN issu d'un sérum connu RHD négatif).
- Critères d'évaluation
  - Critère d'évaluation principal : Corrélation entre le génotype RHD fœtal et le phénotype RHD réalisé sur sang de cordon en post-partum immédiat (sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive, valeur prédictive négative)
  - Critères d'évaluation secondaires : répartition des indications de prélèvements, taux d'allo-immunisation en cours de grossesse, taux d'injection d'immunoglobulines.
- Analyses statistiques : Les données obstétricales et néonatales ont été chargées sur un fichier Excel (Microsoft® Office 2008). Le test exact de Fisher (variables qualitatives) et le test non paramétrique de Mann-Whitney (variables continues) ont été utilisés afin de comparer les différences statistiques entre les groupes. Le seuil de  $p < 0,05$  a été retenu comme étant statistiquement significatif

## Résultats

Durant la période d'étude, 2025 génotypages RHD fœtaux par prise de sang maternelle au 1er trimestre de grossesse ont été adressés au laboratoire Cerba®. Les prélèvements provenaient de 284 centres d'analyses et/ou maternités différents. Cinq centres hospitaliers regroupaient près de 70% des prescriptions (American Hospital of Paris, Institut Mutualiste Montsouris, Centre Hospitalo-Universitaire Necker – Enfants Malades, Centre Hospitalo-Universitaire Antoine Bécélère et Institut Hospitalier Franco-Britannique). Les génotypages RHD étaient principalement réalisés à titre systématique ( $n = 1552 - 76,6\%$ ) et pour des grossesses singletons ( $n = 1995 - 98,5\%$ ). Un peu moins d'un cinquième des prescriptions ( $n = 342 - 16,9\%$ ) concernait un dépistage avant réalisation d'un geste invasif : amniocentèse, biopsie de trophoblaste ou ponction de sang fœtal. La population d'étude était constituée de patientes aux antécédents d'allo-immunisation RHD dans moins de 5% des cas ( $n = 97 - 4,8\%$ ). La grande majorité des génotypages RHD a été prescrite entre la 12ème et la 14ème semaine d'aménorrhée ( $n = 1796 - 88,7\%$ ).

On note la réalisation de 1982 tests contributifs, représentés par 1325 génotypages RHD positif (66,9%) et 657 génotypages RHD négatif (33,1%). Quarante-trois tests se sont révélés indéterminés (2,1%). Les taux d'obtention de tests indéterminés en fonction de l'âge gestationnel sont (tests indéterminés / tests prescrits) :

- 10 SA : 2 / 77 (2,6%)
- 11 SA : 3 / 152 (2,0%)
- 12 SA : 11 / 637 (1,7%)
- 13 SA : 15 / 658 (2,3%)
- 14 SA : 12 / 501 (2,4%)

L'âge gestationnel ne semble pas avoir d'impact sur le risque d'obtenir un résultat indéterminé :

- Comparaison des groupes [10 SA ; 11SA] vs [11 SA ; 14 SA] :  $p = 0,95$
- Comparaison des groupes [10 SA ; 12SA] vs [12 SA ; 14 SA] :  $p = 0,46$

Quatre-vingt-dix-sept patientes aux antécédents d'allo-immunisation RHD se sont vues prescrire un génotypage RHD : 65 génotypes RHD positif, 28 génotypes RHD négatif et 4 génotypes indéterminés ; 28,9% des patientes allo-immunisées ont pu bénéficier d'un niveau de surveillance obstétrical allégé suite à la réalisation du test.

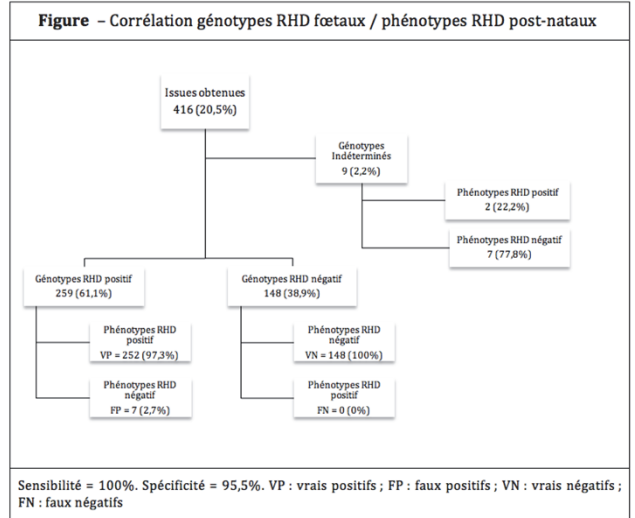
Un total de 416 issues de grossesse (20,5%) a été recueilli (Figure). La totalité des fœtus génotypes RHD négatif ( $n = 148 ; 38,9\%$ ) ont un phénotype négatif à la naissance, soit une sensibilité de 100%. Sur les 259 fœtus ayant un génotype RHD positif, 252 (97,3%) ont un phénotype positif à la naissance et 7 (2,7%) ont un phénotype négatif à la naissance, soit une spécificité de 95,5%. La valeur prédictive positive du test est de 97,3%. La valeur prédictive négative du test est de 100%.

Les 7 faux positifs du génotypage concernaient 4 patientes caucasiennes, 1 patiente d'Afrique subsaharienne, 1 patiente antillaise et 1 patiente d'origine non connue. Il s'agissait de patientes aux grossesses singletons, dépistées à titre systématique, sans antécédent d'allo-immunisation. Quatre d'entre elles ont bénéficié d'au moins une injection d'immunoglobulines anti-D systématique à 28SA et deux d'entre elles d'une seconde injection ciblée (1 injection pour métrorragies, 1 injection en post-partum).

Les résultats des RAI ont pu être obtenus pour 265 patientes. Aucune nouvelle allo-immunisation n'a été notée pendant la durée de l'étude.

## Conclusion

Nous rapportons une sensibilité de 100% et une spécificité de 95,5% sur un contingent de plus de 416 fœtus. Il s'agit d'un test ayant une des meilleures performances diagnostiques (meilleure sensibilité). En outre, cette étude possède le 2ème plus grand effectif après l'étude d'Akolekar.<sup>5</sup> Les résultats de notre étude démontrent la bonne performance diagnostique du génotypage RHD fœtal par prise de sang maternelle, effectué à l'aide de l'amplification de l'exon 10, entre la 10ème et la 14ème semaine d'aménorrhée. L'absence de résultat faussement négatif permet de rassurer avec une quasi certitude la patiente et le clinicien. Ce dernier pourra ainsi diminuer le niveau de surveillance, écartant une potentielle situation d'incompatibilité foeto-maternelle érythrocytaire. En cas de génotypage négatif, la réalisation systématique d'un second test n'apparaît pas non plus nécessaire. On notera cependant l'existence d'un taux de résultats indéterminés non nul (2,1%) : 18 de ces 43 résultats indéterminés concernaient au moins l'un des deux parents d'origine africaine, impliquant possiblement l'existence d'un pseudogène RHD $\psi$ . Ce taux de résultats indéterminés fait parti des plus bas de ceux rapportés dans la littérature.



## Références

- Geifman-Holtzman et al. (2006). Am. J. Obstet. Gynecol. 195, 1163–1173.
- Zhu et al. (2014). J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.
- Costa et al. (2002). Br. J. Haematol. 119, 255–260.
- Cardo et al. (2010). Clin. Chem. Lab. Med. 48, 1121–1126.
- Akolekar et al. (2011). Fetal. Diagn. Ther. 29, 301–306.

#3357



ASSISES DE GÉNÉTIQUE HUMAINE ET MÉDICALE  
LYON, CITÉ INTERNATIONALE 3, 4 ET 5 FÉVRIER 2016