



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -  
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

**T H E S E**

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 8 novembre 2012

par

Mlle VELLUTINI Bianca

Née le 30 mars 1988

à Lyon

\*\*\*\*\*

**Allo-immunisations fœto-maternelles anti-érythrocytaires anti-D  
et maladie hémolytique du nouveau-né :  
état des connaissances actuelles**

\*\*\*\*\*

JURY

Mme VINCIGUERRA Christine, Professeur des Universités

Mme DURAND Brigitte, Maître de Conférences des Universités

M. MONCHARMONT Pierre, Docteur en Médecine

Mme GRET Annie, Docteur en pharmacie

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université  
Vice-Président du Conseil d'Administration  
Vice-Président du Conseil Scientifique  
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. François-Noël GILLY  
M. Hamda BEN HADID  
M. Germain GILLET  
M. Philippe LALLE

### Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

#### SANTE

UFR de Médecine Lyon Est  
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux  
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques  
UFR d'Odontologie  
Institut des Techniques de Réadaptation  
Département de formation et centre de recherche  
en Biologie Humaine

Directeur : M. Jérôme ETIENNE  
Directeur : M. François-Noël GILLY  
Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA  
Directeur : M. Denis BOURGEOIS  
Directeur : M. Yves MATILLON  
Directeur : M. Pierre FARGE

#### SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies  
UFR de Sciences et Techniques des Activités  
Physiques et Sportives (STAPS)  
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL)  
I.U.T. LYON 1  
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)  
I.U.F.M.

Directeur : M. Fabien DE MARCHI  
Directeur : M. Claude COLLIGNON  
Directeur : M. Pascal FOURNIER  
Directeur : M. Christophe VITON  
Directrice : Mme Véronique MAUME-DESCHAMPS  
Directeur : M. Régis BERNARD

MAI 2012

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**  
**ISPB - Faculté de Pharmacie Lyon**  
**Directrice : Madame la Professeure Christine VINCIGUERRA**  
**Directeurs Adjointes : Madame S. BRIANCON, Monsieur P. LAWTON, Monsieur P. NEBOIS**  
**Madame S. SENTIS, Monsieur M. TOD**

**Directrice Administrative : Madame P. SILVEIRA**

**LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES**

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE**

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

- Monsieur Jean-François SABOT (Pr)
- Monsieur Alain BANNIER (MCU)
- Monsieur Philippe BERNARD (MCU)
- Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
- Monsieur Raphaël TERREUX (MCU – HDR)
- Monsieur Pierre TOULHOAT (PAST)

- **PHARMACIE GALENIQUE - COSMETOLOGIE**

- Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
- Madame Françoise FALSON (Pr)
- Monsieur Hatem FESSI (Pr)
- Madame Joëlle BARDON (MCU - HDR)
- Madame Valérie BERTHOLLE (MCU)
- Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (MCU - HDR)
- Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
- Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU)
- Monsieur Fabrice PIROT (MCU - PH - HDR)
- Madame Karine PORET-PADOIS (MCU)
- Monsieur Patrice SEBERT (MCU - HDR)

- **BIOPHYSIQUE**

- Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
- Monsieur Henri DECHAUD ((MCU - PH - HDR)
- Madame Laurence HEINRICH (MCU)
- Monsieur David KRYZA (MCU – PH)
- Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
- Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE**

- **DROIT DE LA SANTE**

- Monsieur François LOCHER (PU – PH)
- Madame Valérie SIRANYAN (MCU)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

- Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU)
- Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
- Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

- Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**  
Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)
- **HYGIENE, ENVIRONNEMENT ET BIOSECURITE**  
Monsieur Dominique TREPO (MCU - PH - HDR)
- **DISPOSITIFS MEDICAUX**  
Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)  
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**  
Madame Alexandra CLAYER-MONTEBAULT (MCU)  
Monsieur François COMET (MCU)  
Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)  
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**  
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)  
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)  
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT**

- **CHIMIE ORGANIQUE**  
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)  
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)  
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)  
Madame Christelle MARMINON (MCU)  
Madame Sylvie RADIX (MCU - HDR)  
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**  
Monsieur Roland BARRET (Pr)  
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)  
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)  
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**  
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)  
Madame Anne-Emmanuelle DE BETTIGNIES (MCU)  
Madame Isabelle KERZAON (MCU)  
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**  
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)  
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)  
Madame Christelle MOUCHOUX (AHU)  
Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)  
Madame Catherine RIOUFOL (MCU)

## DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**  
Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)  
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)  
Madame Léa PAYEN (MCU - HDR)  
Monsieur Sylvain GOUTELLE (AHU)
- **PHYSIOLOGIE**  
Monsieur Christian BARRES (Pr)  
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)  
Madame Kiao Ling LIU (MCU)  
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)
- **PHARMACOLOGIE**  
Monsieur Bernard RENAUD (Pr)  
Monsieur Michel TOD (PU – PH)  
Monsieur Jean-Marie VAUGEOIS (Pr)  
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)  
Madame Bernadette ASTIER (MCU - HDR)  
Monsieur Roger BESANCON (MCU)  
Madame Evelyne CHANUT (MCU)  
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)  
Madame Dominique MARCEL-CHATELAIN (MCU - HDR)  
Monsieur Olivier CATALA (Pr PAST)  
Monsieur Pascal THOLLOT (MCU PAST)

## DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**  
Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)  
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)  
Monsieur Paul ROUZAIRE (AHU)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**  
Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU - PH)  
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)  
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)
- **MICROBIOLOGIE et MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**  
Monsieur Patrick BOIRON (Pr)  
Madame Ghislaine DESCOURS (AHU)  
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)  
Madame Florence MORFIN (PU – PH)  
Monsieur Didier BLAHA (MCU)  
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU)  
Madame Emilie FROBERT (AHU)  
Madame Marie-Andrée MAZOYER (MCU - HDR)  
Mme Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**  
Madame Anne-Françoise PETAVY (Pr)  
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)  
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU)  
Monsieur Philippe LAWTON (MCU - HDR)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B**

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE – BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)  
Monsieur Alain PUISIEUX (Pr)  
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)  
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU)  
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)  
Madame Marie VILLEDIEU (MCU)  
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU, chaire d'excellence)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

## **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Monsieur Philippe LAWTON (MCU - HDR)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Monsieur Patrice SEBERT (MCU – HDR)  
Madame Valérie VOIRON (PAST)

## **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Madame Natalie CARTISER	85 <sup>ème</sup> section
Monsieur Waël ZEINYEH	86 <sup>ème</sup> section
Monsieur Antony ZOROPOGUI	87 <sup>ème</sup> section

**Pr : Professeur**

**PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier**

**MCU : Maître de Conférences des Universités**

**MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier**

**HDR : Habilitation à Diriger des Recherches**

**AHU : Assistant Hospitalier Universitaire**

**PAST : Personnel Associé Temps Partiel**

# **REMERCIEMENTS**

Aux membres du jury,

## **A Madame Christine VINCIGUERRA,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury et pris le temps de me recevoir malgré vos nombreuses obligations.

Pour votre enseignement, clair, précis et vivant.

Veillez recevoir mes sincères remerciements.

## **A Madame Brigitte DURAND,**

Pour avoir accepté de diriger ce travail, pour votre disponibilité, votre dévouement, votre gentillesse et vos précieux conseils.

Pour la qualité de votre enseignement.

Veillez recevoir toute ma gratitude et mes sincères remerciements.

## **A Monsieur Pierre MONCHARMONT,**

Pour avoir accepté aussi spontanément de faire partie de mon jury, pour l'honneur que vous me faites en acceptant et pour apporter votre regard de clinicien à mon travail.

Veillez recevoir mes remerciements les plus sincères.

## **A Madame Annie GRET,**

Pour avoir accepté de faire partie de mon jury et pour apporter votre regard de pharmacien d'officine à mon travail.

Veillez recevoir tous mes remerciements.

A ma famille,

**A mes parents,**

Pour les valeurs que vous m'avez données, pour votre soutien et votre confiance, pour m'avoir laissée seul juge de mes choix.

A ma mère, pour avoir toujours été là pour moi.

A mon père, pour m'avoir poussée à atteindre des objectifs que je croyais impossibles.

Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

**A mes frères,**

Pour votre présence, pour toutes les joies partagées ensemble, pour nos grands débats sur tous les sujets possibles, pour m'avoir fait partager vos découvertes, pour m'avoir aidée à grandir, .... un grand merci.

**A ma grand mère,**

Pour ta tendresse, ta culture et ton amour du piano. Je ne me lasserai jamais de t'écouter en jouer.

**A ma mamie Blanche,**

Pour tout l'amour que tu m'as donné, pour tous ces moments précieux passés dans ta cuisine et ton jardin que je n'oublierai jamais.

**A toute ma famille,**

Pour votre soutien, vos encouragements, pour tout ce que vous m'avez appris (jardinage, mécanique, ....), pour la convivialité et la bonne humeur de nos repas de famille, pour les longues promenades en montagne, pour toutes les histoires drôles contées.

Merci pour tous ces merveilleux moments passés ensemble et ceux à venir.

**A Lucie,**

Pour m'avoir soutenue et encouragée tout au long de nos études et en particulier durant notre première année en pharmacie. Merci pour ta gentillesse, ta spontanéité, ta bonne humeur et ton dévouement.

**A Audrey P.,**

Pour ces deux années où tu as été mon excellent binôme de TP, pour ta présence à tous les cours magistraux. Merci pour ta bienveillance, ta gaîté et ta compréhension.

**A Audrey W.,**

Pour ton calme qui apaise, ton soutien, ta gentillesse, ... merci infiniment.

**A Charlotte,**

Pour ces bons moments que nous avons passé à l'hôpital des Charpennes pendant notre 5<sup>ème</sup> année hospitalo-universitaire. Merci pour tous tes encouragements.

**A Laetitia,**

Pour m'avoir donné ton opinion sur mon travail et m'avoir fait part de ton expérience personnelle.

**A Céline, Florence et Alban,**

Pour votre bonne humeur communicative, votre dynamisme et toutes les soirées que vous avez organisées.

Et aussi à **Floriane, Ludivine, Dioné, Laure, Sophie, Claudie** ... pour tous ces moments passés ensemble et ceux à venir.

**A la pharmacie du centre,**

Pour votre accueil chaleureux, pour m'avoir si vite intégrée à votre équipe, pour toutes les opportunités de formation que vous m'avez proposées, pour tous les bons moments passés et à venir.

Un grand merci à vous toutes : Mme GRET, Mme LAGARRIGUE, Nathalie et Marie-Agnès.

# **TABLE DES MATIERES**

LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLEAUX.....	15
LISTE DES ANNEXES.....	16
TABLE DES ABREVIATIONS.....	17
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>18</b>
<b>Historique de la maladie hémolytique du nouveau-né.....</b>	<b>19</b>
1- Les premiers signes cliniques décrits.....	19
1-1- L'ictère nucléaire.....	19
1-2- L'anémie érythroblastique.....	20
1-3- L'anasarque fœto-placentaire.....	20
2- Les premières hypothèses.....	21
3- La découverte du système Rhésus et ses conséquences.....	23
4- Les premiers essais de traitement et la mise en place d'une prévention de la maladie....	26
<b><u>PARTIE I : Physiopathologie de l'allo-immunisation anti-érythrocytaire fœto-maternelle et ses conséquences chez le fœtus.....</u></b>	<b>28</b>
1- Les systèmes de groupes sanguins impliqués.....	28
1-1- Le système Rhésus.....	29
1-1-1- Génétique du système Rhésus .....	30
1-1-2- Les antigènes du système Rhésus.....	32
1-1-2-1- L'antigène D et ses variants .....	33
1-1-2-2- L'antigène CE.....	34
1-1-3- Les anticorps du système Rhésus.....	35
1-1-3-1- Les anticorps complets.....	35
1-1-3-2- Les anticorps incomplets.....	36
1-2- Les autres systèmes sanguins impliqués dans l'allo-immunisation fœto-maternelle .....	37
1-2-1- Le système Kell .....	37
1-2-2- Le système Duffy .....	38
1-2-3- Le système Kidd.....	38
1-2-4- Le système MNSs.....	39
1-3- Les anticorps particuliers .....	39
1-3-1- Les anticorps anti-privés.....	39
1-3-2- Les anticorps anti-public.....	40
2- L'allo-immunisation fœto-maternelle.....	40
2-1- Circonstances de survenue.....	40
2-1-1- L'étiologie gravidique.....	41
2-1-2- L'étiologie transfusionnelle.....	42
2-1-3- Les autres étiologies.....	42
2-2- Épidémiologie de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D (anti-RH1).....	43
2-3- Physiopathologie de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D (anti-RH1) et ses conséquences pour le fœtus.....	44

2-3-1- Passage d'hématies fœtales dans la circulation maternelle.....	44
2-3-2- La réponse immunitaire primaire maternelle.....	45
2-3-3- La réponse immunitaire secondaire et le passage des anticorps IgG dans la circulation fœtale.....	46
2-3-4- La fixation des IgG maternelles sur les hématies fœtales et ses conséquences.....	47
3- L'aspect clinique de la maladie hémolytique du nouveau-né.....	49
3-1- La forme bénigne : l'ictère simple.....	49
3-2- La forme sévère : l'ictère grave.....	50
3-3- L'atteinte fœtale grave : l'anasarque fœto-placentaire .....	50

## **PARTIE II : Le dépistage de l'allo-immunisation anti-D (anti-RH1) et le suivi des grossesses à risque.....**

1- Législation.....	52
2- Recherche de « preuves » d'allo-immunisation utilisées pour le dépistage de l'allo-immunisation anti-D (anti-RH1) fœto-maternelle.....	53
2-1- Le test de KLEIHAUER.....	54
2-2- Le test à l'antiglobuline humaine (anciennement test de COOMBS).....	56
2-3- La recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI).....	58
3- Le dépistage de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D (anti-RH1) : les étapes.....	59
3-1- La détermination du groupe sanguin de la femme enceinte.....	59
3-2- La détermination du groupe sanguin du père.....	60
3-3- L'étude des anticorps immuns maternels.....	61
3-3-1- Le titrage des anticorps.....	61
3-3-2- Le dosage pondéral.....	62
3-3-3- L'association dosage pondéral et titrage.....	62
3-4- La détermination du phénotype fœtal.....	63
3-5- La détermination du génotype fœtal.....	63
3-6- Résumé des étapes du dépistage de l'allo-immunisation anti-D (anti-RH1) de la femme enceinte.....	64
4- Avancées récentes dans la détermination du génotype fœtal et ses conséquences.....	65
4-1- L'ADN fœtal libre circulant.....	65
4-2- La technique du génotypage fœtal RhD (RH1) sur sang maternel.....	66
4-3- Utilisation en 2012 du génotype fœtal RhD (RH1) sur sang maternel.....	69

## **PARTIE III : L'évaluation de l'atteinte fœtale – La prise en charge du fœtus et du nouveau-né.....**

1- Évaluation de l'atteinte du fœtus .....	70
1-1- Évaluation de l'anémie.....	70
1-1-1- Le taux d'hémoglobine et la cordocentèse.....	70
1-1-2- Bilirubinémie et indice de Liley.....	71
1-1-3- Doppler cérébral.....	73
1-2- Évaluation de l'état général.....	74
1-2-1- L'échographie.....	74
1-2-2- Rythme cardiaque.....	75
2- Prise en charge du fœtus anémié.....	76
2-1- Les transfusions.....	76
2-2- L'accouchement prématuré.....	78

3- Prise en charge du nouveau-né en cas d'ictère.....	79
3-1- La photothérapie.....	80
3-2- L'exsanguino-transfusion.....	83
3-3- Les traitements médicamenteux .....	85
3-3-1- Les inducteurs de la glycuronyl-transférase.....	85
3-3-2- Les inhibiteurs de l'hème-oxygénase.....	86
<b><u>PARTIE IV : La prévention de l'allo-immunisation anti-D (anti-RH1) fœto-maternelle</u></b> .....	<b>87</b>
1- Prophylaxie pendant la grossesse.....	87
1-1- La prophylaxie au 1er trimestre de la grossesse.....	89
1-2- La prophylaxie au 2nd trimestre de la grossesse.....	90
1-3- La prophylaxie au 3ème trimestre de la grossesse.....	91
1-4- La prophylaxie lors de l'accouchement.....	92
1-5- Le récapitulatif de la prophylaxie pendant la grossesse.....	93
2- L'anti-D utilisée en France : RHOPHYLAC®.....	93
3- Les échecs de la prophylaxie.....	97
4- L'avenir de la prophylaxie Anti-D.....	98
5- L'élaboration d'une plaquette à destination des patientes concernées par la prévention par Rhophylac®.....	103
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>105</b>
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	107
ANNEXES.....	116

## LISTE DES FIGURES

- **Figure 1** : Portrait de Louise Bourgeois (1563–1636) (4)
- **Figure 2** : Christian Georg Schmorl (1861-1932) (6)
- **Figure 3** : Hermann Johannes Pfannenstiel (1862-1909) (7)
- **Figure 4** : Louis K. Diamond (1902-1999) (11)
- **Figure 5** : P. Levine (1900-1987) (15)
- **Figure 6** : Photo d'un Macacuscus rhésus (20)
- **Figure 7** : Karl Landsteiner (1868-1943) (22)
- **Figure 8** : Alexander Solomon Wiener (1907-1976) (23)
- **Figure 9** : Mécanisme de sensibilisation Rhésus et l'effet de l'incompatibilité ABO (3)
- **Figure 10** : Schéma du chromosome 1 (37)
- **Figure 11** : Organisation génomique du système Rhésus (42)
- **Figure 12** : Représentation schématique du locus RH localisé sur le chromosome 1p34 montrant l'organisation en tandem des gènes homologues RHD et RHCE de l'haplotype RHD-positif et la topologie présumée des protéines RHD et RHCE (41)
- **Figure 13** : Structures des immunoglobulines humaines IgG et IgM (48)
- **Figure 14** : Cinétique des réponses primaire et secondaire de l'allo-immunisation fœto-maternelle (55)
- **Figure 15** : Passage des hématies fœtales dans la circulation maternelle (56)
- **Figure 16** : Protocole pour la réalisation du test de KLEIHAUER (64)
- **Figure 17** : Frottis après la réalisation du test de Kleibauer où l'hématie fœtale apparaît foncée et l'hématie maternelle apparaît pâle (65)
- **Figure 18** : Test direct à l'antiglobuline humaine (pour les hématies RH1 et le anticorps anti-RH1) (68)

- **Figure 19** : Test indirect à l'antiglobuline humaine (pour les hématies RH1 et le anticorps anti-RH1) (68)
- **Figure 20** : Dépistage de l'incompatibilité fœto-maternelle Rhésus adapté d'après Lansac J. et *al.*, 2003 (68)
- **Figure 21** : Principe de la polymerase chain reaction (PCR) (75)
- **Figure 22** : Organisation génomique du système Rhésus et séquences amplifiées lors de la détermination du génotype fœtal (35)
- **Figure 23** : Diagramme de LILEY (77)
- **Figure 24** : Mesure du pic de vitesse systolique au niveau de l'artère cérébrale moyenne (52)
- **Figure 25** : Degré de l'anémie en fonction de la valeur du MoM (80)
- **Figure 26** : Tracé d'un rythme sinusoïdal chez un fœtus présentant une anémie sévère (52)
- **Figure 27** : Indication de la photothérapie chez les nourrissons hospitalisés de 35 semaines ou plus (85)
- **Figure 28** : Indication de l'exsanguino-transfusion chez les nourrissons hospitalisés de 35 semaines ou plus (85)
- **Figure 29** : Mécanisme d'action de la prophylaxie anti-D afin d'éviter l'immunisation de la mère par les globules rouges du fœtus (92)
- **Figure 30** : Inactivation des virus par traitement solvant/détergent (93)
- **Figure 31** : Chromatographie échangeuse d'ions (93)
- **Figure 32** : Principe de la nanofiltration (93)
- **Figure 33** : Boîte de Rhophylac® 300 µg/2mL (94)
- **Figure 34** : La technique des hybridomes (98)
- **Figure 35** : Principe de construction des anticorps chimériques et humanisés (99)

## LISTE DES TABLEAUX

- **Tableau I** : Les 86 antigènes érythrocytaires impliqués dans la genèse de la maladie hémolytique du nouveau-né (35)
- **Tableau II** : Terminologie des haplotypes Rhésus selon la nomenclature de Fischer-Race et celle de Wiener (38)
- **Tableau III** : Caractéristiques des anticorps immuns (48)
- **Tableau IV** : Circonstances pouvant induire des hémorragies fœtomaternelles au cours de la grossesse (52)
- **Tableau V** : Caractéristiques des réponses primaire et secondaire (54)
- **Tableau VI** : Chronologie des événements qui concourent à la maladie hémolytique du nouveau-né en l'absence de traitement (59)
- **Tableau VII** : Calendrier des RAI selon l'arrêté du 19 avril 1985 et les recommandations de bonne pratique clinique du CNGOF (34, 47, 60)
- **Tableau VIII** : Choix du traitement selon le taux de bilirubine totale (82)
- **Tableau IX** : Adaptation de la dose d'Immunoglobuline anti-D en fonction du résultat du test de Kleihauer (34)
- **Tableau X** : Prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D en France adapté d'après d'Ercole C., 2011 (52)

## ANNEXES

- **Annexe 1** : Arrêté du 19 avril 1985 modifiant l'arrêté du 27 août 1971 relatif aux examens médicaux pré et postnatals (J.O. 30 mai 1985)
  
- **Annexe 2** : Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale
  
- **Annexe 3** : Plaquette d'information sur la prophylaxie anti-D à destination des patientes concernées

## TABLE DES ABREVIATIONS

- **Ac** : Anticorps
- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- **Ag** : Antigène
- **CGR** : Concentré de Globule Rouge
- **CMV** : Cytomégalovirus
- **CNGOF** : Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français
- **GR** : Globule Rouge
- **Hb** : Hémoglobine
- **Ig** : Immunoglobuline
- **IM** : Intramusculaire
- **IV** : Intraveineuse
- **MHNN** : Maladie Hémolytique du Nouveau-né
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **PSC-AMC** : Pic Systolique Cérébral de l'Artère Moyenne cérébrale
- **PFC** : Plasma Frais Congelé
- **RAI** : Recherche d'Agglutinine Irrégulière
- **Rh** : Rhésus
- **RH:1** : Rhésus positif
- **RH :-1** : Rhésus négatif
- **SA** : Semaine d'aménorrhée
- **VHB/VHC** : Virus de l'Hépatite B/C
- **VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine

# INTRODUCTION

L'allo-immunisation fœto-maternelle anti-érythrocytaire est une réaction immunologique aboutissant à la production d'allo-anticorps par la mère contre un antigène du groupe sanguin présent chez son fœtus et transmis par le père biologique. Ce processus est responsable d'une affection qui touche le nouveau-né et que l'on dénomme « maladie hémolytique du nouveau-né ».

Plusieurs systèmes de groupes sanguins peuvent être impliqués dans la genèse de cette affection dont en particulier le système Rhésus.

Les nombreux progrès réalisés au cours de ces dernières années ont permis de diminuer la fréquence de cette maladie ; cette fréquence se situant actuellement autour de 1/1 000 naissances selon le Centre national de référence en hémodiologie périnatale.

Après un court historique sur la maladie, nous rappellerons les mécanismes immunologiques impliqués dans l'allo-immunisation fœto-maternelle en nous limitant au système Rhésus, puis nous développerons les techniques de dépistage et de suivi des grossesses à risque. Seront également abordés la prise en charge du fœtus et du nouveau-né atteints de maladie hémolytique. Enfin, dans une dernière partie, nous ferons le point sur la prophylaxie anti-D (anti-RH1). Pour compléter notre travail, nous avons élaboré une plaquette d'information sur l'allo-immunisation anti-érythrocytaire fœto-maternelle, ses conséquences et sa prévention, que nous proposons de mettre à disposition des patientes concernées à l'officine.

# **Historique de la maladie hémolytique du nouveau-né**

La première description de la maladie hémolytique du nouveau-né (MHNN) remonte à l'antiquité et Hippocrate en serait l'auteur (1). Ce n'est ensuite qu'au XVII<sup>e</sup> siècle que cette maladie sera mieux connue.

## **1- Les premiers signes cliniques décrits**

En 1609, Louise BOURGEOIS, sage-femme française, observa chez une femme ayant accouché de jumeaux, la présence d'œdèmes sur l'un d'eux et une jaunisse chez l'autre. Les deux enfants devaient décéder rapidement après leur naissance (2, 3).



**Figure 1** : Portrait de Louise Bourgeois (1563–1636)

Divers symptômes seront ainsi décrits dans la littérature sans que l'on sache à l'époque qu'ils correspondaient à la même maladie.

### **1-1- L'ictère nucléaire**

La « jaunisse néonatale » a été rapportée au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle par divers auteurs. W. ASHBY constata la répétition de l'atteinte dans une même famille (1), alors que J.W. BALLANTYNE nota la couleur jaune caractéristique du liquide amniotique, lors de la naissance d'un enfant atteint (5).

D'autres auteurs, comme BLOMFIELD en 1901 puis LAGREZ en 1904, décrivent la jaunisse néonatale sans rechercher son origine exacte (1).

C'est en 1904 que C.G. SCHMORL puis H.J. PFANNENSTIEL firent le lien entre la jaunisse et une hyperbilirubinémie à bilirubine libre. Ils soulèverent alors le danger de cette hyperbilirubinémie et sa neurotoxicité qui pouvait aller jusqu'à une atteinte cérébrale définitive avec destruction des noyaux gris centraux, d'où son appellation d'ictère nucléaire (8, 9).



**Figure 2 :** Christian Georg Schmorl  
(1861-1932)



**Figure 3 :** Hermann Johannes Pfannenstiel  
(1862-1909)

### 1-2- L'anémie érythroblastique

En 1909, ECKLIN décrit l'« anémie érythroblastique », expression qui désignera la MHNN durant de longues années (5).

Cette anémie se caractérisait au niveau sanguin par un taux d'hémoglobine bas, des réticulocytes en grand nombre, une érythroblastose ainsi qu'une leucocytose modérée.

### 1-3- L'anasarque fœto-placentaire

Peu de temps après, H. SCHRIDDE décrit l'« anasarque fœto-placentaire » (5) qui se manifestait par des œdèmes associés à une infiltration sous-cutanée, des épanchements multiples et souvent un hydramnios ainsi qu'un épaissement du placenta.

En 1932, L.K. DIAMOND montra que l'anémie, l'ictère et l'anasarque étaient des symptômes d'une même maladie qu'il appela alors l'érythroblastose fœtale (10).



**Figure 4 :** Louis K. Diamond (1902-1999)

## **2- Les premières hypothèses**

Il faudra attendre le XX<sup>ème</sup> siècle pour que les mécanismes responsables de la maladie hémolytique du nouveau-né soient mieux appréhendés.

- En 1892, EHRLICH fut le premier à parler de passage transplacentaire pour certaines substances. Il montra également que ces substances pouvaient provoquer une immunité passive (12). Cette notion précéda celle de destruction des globules rouges avec régénération secondaire de ces derniers chez la majorité des enfants atteints. Cependant, on ignorait encore la cause de cette destruction observée dans les années 1930.

Ce n'est qu'en 1936 que fut mise en évidence par A. ZACHO une agglutinine irrégulière chez une mère dont le sérum agglutinait les globules rouges de son enfant. La femme était du groupe sanguin A et suite à une hémorragie grave, elle avait été transfusée par le sang de 3 donneurs de groupe A et avait présenté des signes d'accident hémolytique après la transfusion (13).

- En 1938, R.R. DARROW émit l'hypothèse qu'il existait un conflit immunitaire dans l'érythroblastose fœtale (14). Il écrivait ainsi:

*« Si maintenant nous examinons les mécanismes possibles de destruction des érythrocytes, nous trouvons que tous peuvent être éliminés, sauf un : la destruction des globules rouges de l'enfant par une forme quelconque de réaction d'immunisation... Nous pouvons reconstruire la suite d'événements de la manière suivante : la mère s'immunise contre les globules rouges du fœtus ou certains de leurs composants... l'immunisation est le résultat d'une lésion placentaire à la suite de laquelle les globules rouges du fœtus ou leur hémoglobine pénètrent dans l'organisme maternel. Les anticorps peuvent alors pénétrer chez l'enfant à travers le placenta, ou peut être même en plus grande quantité par le colostrum ou le lait... chaque enfant né après cette immunisation est atteint de la maladie, alors que les enfants nés auparavant sont épargnés, ... ».*

Il pensait alors que l'hémoglobine fœtale était différente de celle de l'adulte et responsable de l'immunisation (14).



**Figure 5 :** P. Levine (1900-1987)

- L'année suivante, P. LEVINE et R.E. STETSON (16) rapportèrent le cas d'une femme qui lors de son second accouchement perdit son enfant fortement anémié. Ayant abondamment saigné durant l'accouchement, la patiente fut transfusée avec le sang de son mari qui était compatible dans le système ABO. Cependant, peu après la transfusion, la patiente présenta un choc hémolytique intense. P. LEVINE et R.E. STETSON montrèrent que le sérum de cette patiente agglutinait les globules rouges de son mari mais également ceux de plus de 80% des donneurs de sang, pris au hasard. L'antigène (Ag) responsable de cette agglutination ne pouvait être du groupe ABO, MP et P, seuls groupes connus à cette époque. L'hypothèse de l'existence d'un Ag inconnu absent à la surface des globules rouges (GR) de la mère mais présent sur les GR de son mari et ceux de son enfant fut émise. Cet Ag du père fut rendu responsable de l'immunisation néo-maternelle (5, 17, 18).

### **3- La découverte du système Rhésus et ses conséquences**

- En 1940, K. LANDSTEINER et A.S. WIENER (19) mirent en évidence l'Ag responsable de l'érythroblastose fœtale en immunisant des lapins et des cobayes avec des GR de singe *Macacus rhesus*. Ce nouveau système sera appelé Rhésus (Rh) du nom du singe utilisé pour l'expérimentation.



**Figure 6** : Photo d'un *Macacus rhesus*

Le sérum ainsi obtenu des lapins et des cobayes immunisés présente des anticorps (Ac) anti-rhésus. Ce sérum a la capacité d'agglutiner 85% des GR humains de la population caucasienne. Les GR agglutinés par ce sérum furent dénommés Rhésus positif, et ceux non agglutinés, Rhésus négatif (17, 19, 21).



**Figure 7 :** Karl Landsteiner  
(1868-1943)



**Figure 8 :** Alexander Solomon Wiener  
(1907-1976)

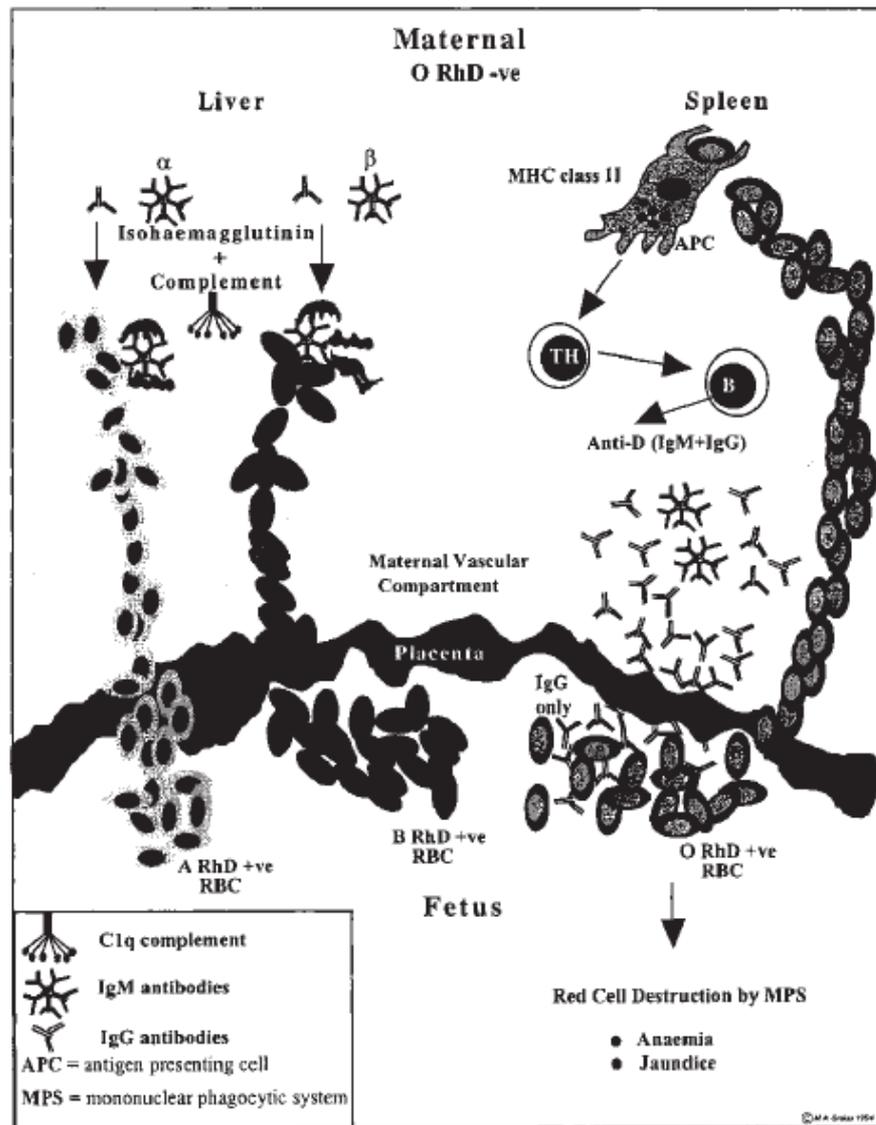
A.S. WIENER et H.R. PETERS, démontreront ultérieurement que l'Ac anti-rhésus pouvait être responsable d'accidents de transfusion (24).

- C'est P. LEVINE qui en 1941 proposa le mécanisme responsable de l'érythroblastose fœtale (future maladie hémolytique du nouveau-né). Selon l'auteur, cette maladie serait le résultat d'une incompatibilité de groupes sanguins Rhésus entre la mère et son enfant : la mère serait Rhésus négatif et son enfant Rhésus positif, caractère transmis par le père. L'Ag fœtal passerait dans la circulation maternelle et la mère s'immuniserait contre cet Ag en produisant des Ac anti-rhésus. Ces Ac anti-rhésus passeraient dans la circulation fœtale par voie transplacentaire et détruiraient les hématies fœtales.

P. LEVINE constata que le premier enfant Rhésus positif était en général épargné, alors que les autres grossesses incompatibles étaient soumises à un risque croissant (25).

En 1946, il fut admis que dans tous les cas de maladie hémolytique typique, les Ac anti-rhésus étaient présents et que les symptômes étaient plus graves si ces Ac apparaissaient précocement au cours de la grossesse.

A.S. WIENER exposera une théorie sur l'existence d'un passage transplacentaire des hématies fœtales sans pouvoir le prouver (26). Il faudra attendre encore les années 1954-1956 pour avoir la démonstration de ce passage (27).



**Figure 9 :** Mécanisme de sensibilisation Rhésus et l'effet de l'incompatibilité ABO

Cette figure illustre la production des anticorps maternels, après immunisation par les antigènes Rhésus positifs du fœtus, et leur passage placentaire.

#### 4- Les premiers essais de traitement et la mise en place d'une prévention de la maladie

La compréhension de la physiopathologie de la MHNN dans la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle va permettre d'accélérer la recherche dans le domaine de la prise en charge du fœtus puis de la prévention de cette maladie.

➤ Sur le plan thérapeutique,

- La notion d'exsanguino-transfusion fut évoquée dès 1945 par A.S. WIENER (31), mais c'est L.K. DIAMOND, qui réalisa la première exsanguino-transfusion pour traiter un nouveau-né atteint de maladie hémolytique grave.

Ce traitement réalisé à la naissance sera considéré comme le plus approprié, en cas d'atteinte grave de l'enfant.

- En 1954, les scientifiques F.H. ALLEN et L.K. DIAMOND proposèrent de déclencher l'accouchement de façon à prendre en charge l'enfant précocement et ainsi d'éviter les stades les plus graves de la maladie (28).
- En 1957, la **transplantation de moelle osseuse** chez les fœtus fut envisagée à partir de donneurs Rhésus négatifs et fut réalisée sur 4 fœtus atteints de 12 et 16 semaines par injection de tissu dans leur cavité péritonéale. Cependant, devant les nombreuses difficultés soulevées, cette thérapie fut délaissée pour cette indication (29).
- A.W. LILEY proposa de traiter les fœtus les plus atteints par **transfusion intra-utérine**. A cette époque, on savait déjà que les GR injectés dans la cavité péritonéale d'un fœtus atteignaient vite la circulation sanguine. A.W. LILEY réalisa ainsi la première transfusion intra-utérine en 1963 (30).

Cependant ces différents moyens thérapeutiques sont difficiles à mettre en application et peuvent également présenter des risques importants pour l'enfant et sa mère.

- Sur le plan diagnostique, les techniques étant pour la plupart encore utilisées, nous les détaillerons dans la partie II de cette thèse.
  
- Sur le plan de la prévention, les scientifiques cherchèrent un moyen de limiter la production des Ac maternels (17). Dans ce contexte, R. FINN proposa dès 1960 d'administrer des  $\gamma$ -globulines anti-rhésus aux femmes Rhésus négatif le plus tôt possible après l'accouchement du premier enfant Rhésus positif, pour éliminer les GR fœtaux passés dans la circulation maternelle et ainsi prévenir l'immunisation de la mère (32).

De nombreux essais furent réalisés avant l'utilisation en pratique des  $\gamma$ -globulines anti-rhésus et J. SCHNEIDER ainsi que O. PREISLER montrèrent en 1967, que leur administration n'avait pas d'effet si la mère était déjà immunisée (1).

Le protocole d'administration des  $\gamma$ -globulines fut défini par A. JOUVENCEAUX en 1969 ; celui-ci préconisant l'injection intraveineuse (IV) à la dose de 100  $\mu$ g.

# **PARTIE I : Physiopathologie de l'allo-immunisation anti-érythrocytaire fœto-maternelle et ses conséquences chez le fœtus**

L'allo-immunisation est caractérisée par la synthèse d'anticorps (Ac) dans un organisme en réponse à l'introduction dans cet organisme d'antigènes (Ag) étrangers d'un sujet de la même espèce. Ces Ac produits sont appelés allo-anticorps. On les distingue des auto-anticorps, dirigés contre les propres Ag de l'organisme, et des hétéro-anticorps, qui sont dirigés contre les Ag provenant d'individus d'espèces différentes.

L'allo-immunisation ne s'observe que dans quelques situations particulières : la grossesse, les transfusions ou les greffes de tissus et d'organes.

L'immunisation peut se produire au premier contact entre un ou plusieurs allo-antigènes apportés par le donneur et non présents chez le receveur. L'effet n'apparaît que lors d'une seconde grossesse incompatible, d'une transfusion ultérieure ou quelques jours ou semaines après la prise de la greffe (35).

## **1- Les systèmes de groupes sanguins impliqués**

L'allo-immunisation fœto-maternelle anti-érythrocytaire responsable de la maladie hémolytique du nouveau-né (MHNN) implique une grande diversité de groupes sanguins. En effet, plus de 80 antigènes appartenant en grande majorité au système Rhésus mais aussi aux systèmes Kell, Duffy, Kidd ou MNSs peuvent en être responsables (**tableau I**). Ce sont les progrès en biologie moléculaire qui ont permis de mieux connaître ces Ag.

**Tableau I :** Les 86 antigènes érythrocytaires impliqués dans la genèse de la maladie hémolytique du nouveau-né

Systèmes de groupe	Antigènes rapportés selon la nomenclature internationale de l'ISBT. Série 900 = antigènes de grande fréquence, série 700 = antigènes de fréquence faible.			
	MHPN grave	MHPN rarement grave	MHPN habituellement peu grave	Absence de MHPN
Rh	RH1 = D, RH4 = c	RH: 2,3,6,7,8,11,12,17,18,29,30 32,36,37,40,42,46,48,49	RH: 3,5,6,9,23,29,45,LOCR	
MNSs		MNS: 1,3,4,5,7,9,10,14,19,20, 21,22,23,28,35	MNS: 1,3,4,5,14,24	MNS: 2
Kell	KEL1 = K	KEL: 2,3,4,5,6,7 10,11,22	KEL: 5,6,11	KEL: 23,24
Lutheran			LU: 1,2	
Duffy		FY: 1	FY: 2,3	
Kidd		JK: 1	JK: 2,3	
Lewis				LE: 1,2
Autres		DI:1,3,Rd,CO :1,3 Collection 211 (901001), 901016 700005,700045,700047,700049, 700054,	DI: 2,Sc3,CO3,PP1Pk GE: 2,3,6 901002,901003,901005 700043,700044	P1, DI: 4,Sc1,Sc2, CROM,KN,CH/RG, JMH,I,LW,DO, HLA Bga,Bgb,Bgc

### 1-1- Le système Rhésus

Parmi tous les systèmes de groupes sanguins, le système Rhésus est l'un des plus immunogène et le plus polymorphe chez l'homme. C'est celui qui est principalement impliqué dans l'incompatibilité fœto-maternelle.

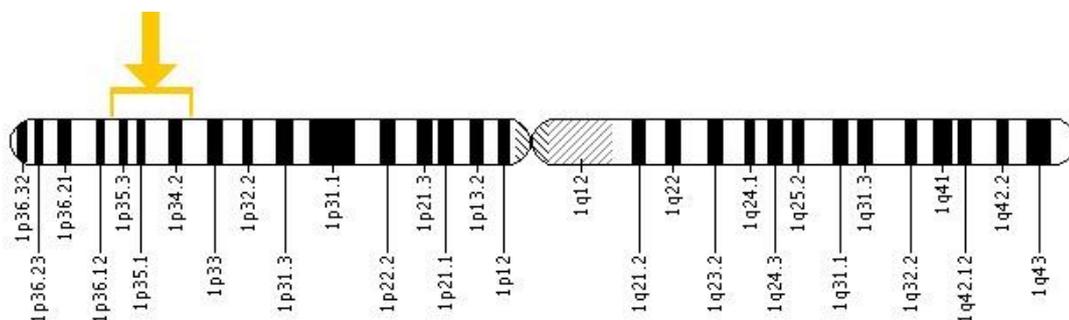
Dans ce système de groupe sanguin, on distingue les individus « Rhésus négatif », des individus « Rhésus positif ».

Un individu est dit « Rhésus négatif » (RH:-1) s'il ne présente pas l'Ag D à la surface de ses hématies. Il développera une réaction immunitaire hémolytique lorsqu'il sera mis en contact avec cet Ag. On note "d" l'absence d'antigène D.

A l'inverse, un individu est dit « Rhésus positif » (RH:1) s'il porte l'Ag D à la surface de ses hématies.

### 1-1-1- Génétique du système Rhésus

Grâce au développement de la biologie moléculaire, Y. COLIN et ses collaborateurs ont pu en 1991 séquencer le gène Rhésus. Il est localisé sur le bras court du chromosome 1, en position 34-36 (**figure 10**) (36).



**Figure 10 :** Schéma du chromosome 1

Avant de connaître l'exacte disposition des allèles du gène Rhésus ainsi que leur nombre, deux théories principales s'opposaient : celle de WIENER et celle de FISHER-RACE.

Selon WIENER, le système Rhésus ne possédait qu'un gène, avec un seul locus, mais plusieurs allèles. Il avait nommé "Rh" les Rhésus positifs et "rh" les Rhésus négatifs. "R" et "r" représentaient les gènes et Rh et rh les phénotypes. A cette époque, seul l'antigène D avait été découvert.

La deuxième théorie, celle de FISHER et RACE, suivit la découverte des autres antigènes du système Rhésus. Ils raisonnaient donc sur les trois gènes découverts, à trois locus étroitement liés, avec 2 allèles chacun (*D/d, C/c, E/e*).

Depuis les années 90, il est admis que le locus Rhésus est constitué de deux gènes homologues (RhD et RhCE) très liés, codant pour des polypeptides non glycosylés portant les réactivités antigéniques Rhésus.

Ces deux gènes RhD et RhCE sont à l'opposé l'un de l'autre et une courte région de la molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) les sépare.

Ces deux gènes étant très liés, on suppose qu'ils sont toujours transmis ensemble.

Pour le gène RhD, il existe deux allèles : "D" et "d". Le gène RhD définit la présence d'une protéine qui est responsable de la réactivité RhD. L'allèle "d" définit l'absence de cette protéine. Les individus dits « RhD positifs » possèdent au moins un exemplaire de ce gène. Ceux qui sont dits « RhD négatifs », ont deux allèles "d" incapables de coder la spécificité D de cette molécule.

Le gène RhCE, définit l'antigène RhC ou Rhc ainsi que l'antigène RhE ou Rhe. Il existe donc quatre combinaisons différentes : CE, Ce, cE, ce.

La combinaison des allèles des 2 gènes aboutit à l'existence de 8 haplotypes regroupés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau II :** Terminologie des haplotypes Rhésus selon la nomenclature de Fischer-Race et celle de Wiener

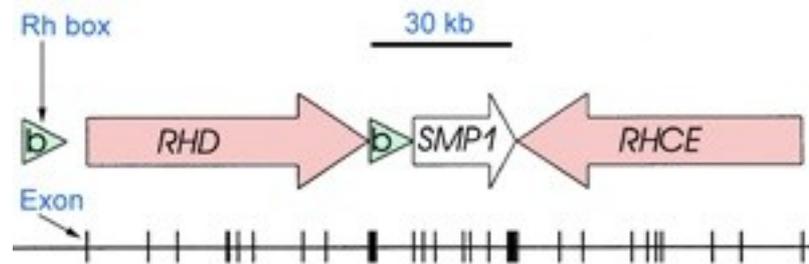
<b>WIENER</b>	<b>FISHER-RACE</b>	
<b>Gènes</b>	<b>Gènes</b>	<b>Antigènes</b>
R <sup>1</sup>	DCe	D, C, e
R <sup>2</sup>	DcE	D, c, E
R <sup>0</sup>	Dce	D, c,e
R <sup>Z</sup>	DCE	D, C, E
r	dce	c, e
r'	dCe	C, e
r''	dcE	c, E
r <sup>Y</sup>	dCE	C, E

Dans la nomenclature internationale actuellement utilisée ou nomenclature de ROSENFELD, la présence des antigènes D, C, E, c et e est notée respectivement RH1, RH2, RH3, RH4 et RH5.

Il existe 18 phénotypes RH (selon les nomenclatures de WIENER, FISCHER-RACE et ROSENFELD) mais 7 seulement sont fréquemment rencontrés (39, 40, 41) :

- $R^1r$	ou	D+ C+ E- c+ e+	ou	RH : 1,2,-3,4,5
- $R^1R^1$	ou	D+ C+ E- c- e+	ou	RH : 1,2,-3,-4,5
- $rr$	ou	D- C- E- c+ e+	ou	RH : -1,-2,-3,4,5
- $R^1R^2$	ou	D+ C+ E+ c+ e+	ou	RH : 1,2,3,4,5
- $R^2r$	ou	D+ C- E+ c+ e+	ou	RH : 1,-2,3,4,5
- $R^2R^2$	ou	D+ C- E+ c+ e-	ou	RH : 1,-2,3,4,-5
- $R^0r$	ou	D+ C- E- c+ e+	ou	RH : 1,-2,-3,4,5

La **figure 11**, montre la disposition des gènes RhD et RhCE.



**Figure 11 :** Organisation génomique du système Rhésus

### 1-1-2- Les antigènes du système Rhésus

Il existe un très grand polymorphisme du système Rhésus. En effet, on trouve 49 Ag pour les gènes RhD et RhCE. Ce polymorphisme s'explique par des délétions, des recombinaisons et des mutations ponctuelles avec le même gène ou entre les deux gènes.

### *1-1-2-1- L'antigène D et ses variants*

L'Ag RhD est porté par 85% de la population originaire d'Europe occidentale. Cette fréquence est fortement augmentée dans les populations originaires d'Afrique noire avec près de 95% de porteurs du gène Rhésus D (43) et du sud-est Asiatique avec plus de 99% de personnes Rhésus positif (44).

L'Ag RhD comprend un grand nombre d'épitopes ce qui est responsable de sa très grande immunogénicité. Cette protéine RhD est absente à la surface des GR des individus RhD négatif et présente sur les globules rouges des individus RhD positif (40).

Par ailleurs, il existe des variants du gène RhD : les antigènes D faible et D partiel.

- **L'antigène D faible** ; il est peu fréquent dans les populations de race blanche (3 à 4/1000) mais plus fréquent dans les populations de race noire (45). Il correspond à une diminution de la réactivité avec un Ac anti-D. Cet Ag dit faible n'est pas toujours détecté par les techniques utilisées en routine. Cependant, les individus porteurs de l'Ag D faible doivent être absolument considérés comme Rhésus positif.
  
- **L'antigène D partiel** ; il correspond à un déficit qualitatif, l'Ag D ayant perdu une de ses sous-unités. Cette modification d'expression peut être due à :
  - une mutation nucléotidique ponctuelle ;
  - une substitution de séquence du gène RhD par des séquences du gène RhCE ;
  - une insertion de nucléotides supplémentaires.

Une personne ayant un tel Ag pourra en fin de transfusion ou de grossesse s'immuniser contre la sous-unité qui lui manque. Son sérum aura la propriété de s'agglutiner en présence de tous GR dit « normaux », c'est à dire possédant la sous-unité manquante.



### 1-1-3- Les anticorps du système Rhésus

Dans le système Rhésus, en situation normale, il n'y a pas d'Ac sérique. Ces Ac apparaissent lors d'une immunisation soit par transfusion, soit lors d'une grossesse incompatible. Ils sont irréguliers et immuns, c'est-à-dire présents uniquement chez les individus RH :-1 après immunisation, en opposition aux Ac du groupement ABO qui sont naturels et réguliers et présents en situation normale chez un sujet ne présentant pas l'Ag dit correspondant.

Pour qu'il y ait des conséquences, ces Ac doivent être de nature Immunoglobuline G (IgG), de concentration élevée, avoir une affinité suffisante pour l'Ag et être capable d'activer les récepteurs Fc des macrophages (46).

Les Ac en cause sont par ordre de fréquence décroissante : anti- RhD (anti-RH1), anti-RhE (anti-RH3), anti-Rhc (anti-RH4), anti-RhC (anti-RH2), anti-Rhe (anti-RH5), ... (46).

Le risque est majeur avec l'anti-RH1 et l'anti-RH4. L'anti-RH1 représente 35% des Ac immuns et l'anti-RH4 37%. L'anti-RH1 est présent dans 88% et l'anti-RH4 dans 8% des immunisations fœto-maternelles graves qui nécessitent une transfusion in utero ou à la naissance (47).

Il existe deux types d'Ac.

#### *1-1-3-1- Les anticorps complets*

Ils apparaissent en début d'allo-immunisation et ont une faible durabilité. Ils sont actifs à 37°C et sont thermolabiles. Ces Ac sont de type IgM et c'est à cause de cette structure très dense qu'ils ne peuvent franchir la barrière placentaire. Ils sont aussi incapables de se fixer au complément. Ils ne sont donc pas dangereux directement pour le fœtus.

### 1-1-3-2- Les anticorps incomplets

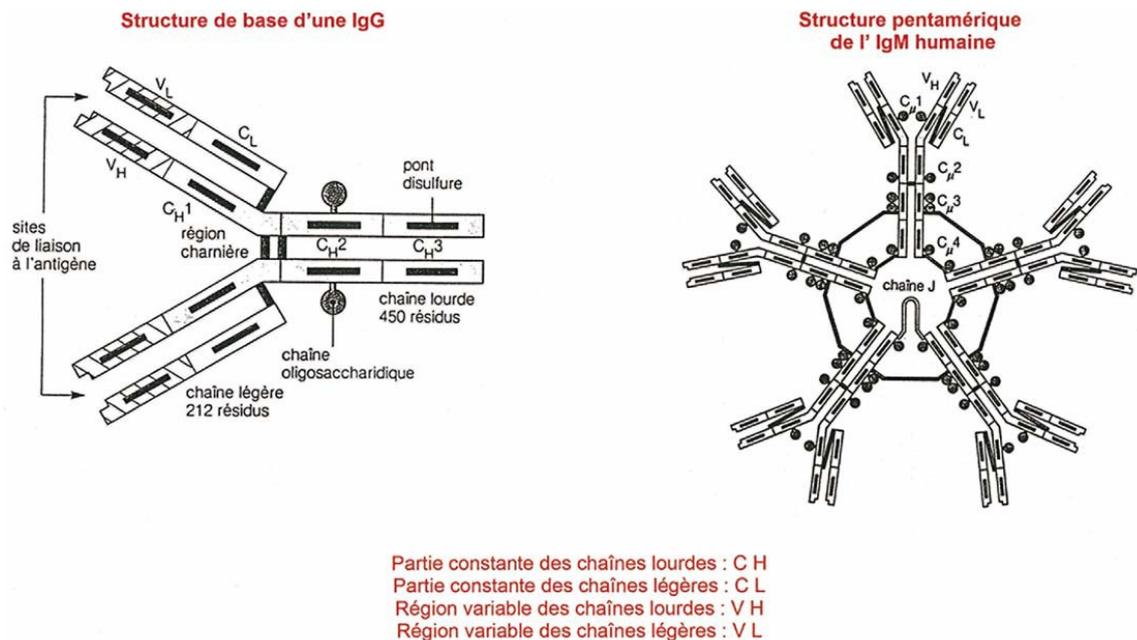
On peut les observer après l'apparition des Ac complets, mais ils persistent dans le temps. Contrairement aux Ac complets, ils sont de nature IgG et sont capables de franchir la barrière placentaire (**figure 13**). Ils sont actifs à 37°C et thermostables. Ils sont responsables des symptômes de la MHNN.

Dans le **tableau III**, on retrouve toutes les caractéristiques des Ac immuns qui sont responsables de la symptomatologie de la MHNN.

**Tableau III :** Caractéristiques des anticorps immuns

Anticorps	Antigènes
<ul style="list-style-type: none"><li>- IgG</li><li>- Toujours capables de franchir la barrière placentaire (transfert précoce des IgG maternelles via le syncytiotrophoblaste vers le compartiment fœtal dès la 10-12<sup>e</sup> semaine)</li><li>- Concentration élevée (le taux fœtal d'IgG maternelles ne s'accroît sensiblement qu'à partir de quatre mois [10% du taux maternel] pour atteindre ou dépasser le taux d'IgG en fin de grossesse)</li><li>- Affinité suffisante pour l'antigène</li></ul>	Pleinement exprimés dès la vie embryonnaire

La **figure 13** permet de visualiser les différences de structures entre les IgM et les IgG et ainsi de comprendre pourquoi les IgM ne peuvent traverser la barrière placentaire alors que les IgG en sont capables.



**Figure 13 :** Structures des immunoglobulines humaines IgG et IgM

## 1-2- Les autres systèmes sanguins impliqués dans l'allo-immunisation fœto-maternelle

Ils s'agit essentiellement des systèmes Kell, Duffy, Kidd et MNSs.

### 1-2-1- Le système Kell

Ce système comprend un seul gène situé sur le bras long du chromosome 7 en position 32-36. Il est composé de 19 exons dont les variations nucléotidiques sont à l'origine de ses 27 Ag. Les deux Ag principaux de ce système sont l'Ag KEL1 (K = Kell) et KEL2 (k = Cellano). Ils entraînent trois phénotypes : kk (KEL : -1,2) représenté par 90% de la population, Kk (KEL : 1,2) représenté par 9,8% de la population et KK (KEL : 1,-2) par 0,2% de la population (fréquences observées dans la population caucasöide).

Le premier, KEL1, se trouve dans la population française à une fréquence de 9%. Il est très immunogène mais cependant moins immunogène que l'Ag RH1, et entraîne le même type de complication chez la personne immunisée après transfusion ou lors de la grossesse incompatible. L'Ag KEL1 apparaissant très tôt à la surface des érythroblastes, l'atteinte du

fœtus peut être gâve sachant qu'elle n'est pas toujours corrélée au titrage de l'Ac.

Le second Ag KEL2, est très fréquent car on le retrouve chez 99,6% des français.

Ces Ag sont bien développés à la naissance et les Ac sont le plus souvent immuns et de nature IgG (35, 49, 50).

### 1-2-2- Le système Duffy

Ce système possède un seul gène sur le chromosome 1. Grâce aux variations nucléotidiques, il a 6 Ag : FY1 à FY6. Les deux allèles principaux sont FY1 (Fya) et FY2 (Fyb). Les trois phénotypes qu'ils entraînent sont : Fy(a+b+) (FY :1,2) représenté par 15% de la population, Fy(a-b+) (FY :-1,2) représenté par 37% de la population et Fy(a+b-) (FY : 1,-2) représenté par 48% de la population.

Comme pour le système Kell, les Ag sont bien développés à la naissance et les Ac de ce système sont immuns et de type IgG (35, 50).

### 1-2-3- Le système Kidd

Ce système possède un seul gène sur le chromosome 18. Les variations nucléotidiques sont responsables de l'existence des 2 Ag du système : JK1(Jka) et JK2 (Jkb). Ils sont responsables de l'existence des trois phénotypes suivants : JK:1,-2 [Jk (a+,b-)] dans 28% des cas, JK:-1,2 [Jk (a-,b+)] dans 22% des cas et JK:1,2 [Jk (a+,b+)] dans 50% des cas.

Ils sont eux aussi bien développés à la naissance et leurs Ac sont immuns et de nature IgG (35, 50).

### 1-2-4- Le système MNSs

Ce système possède deux gènes accolés GYPA et GYPB sur le chromosome 4. Les antigènes de ce système sont portés par les glycophorines A et B. Ce système a un très grand polymorphisme dû à de nombreuses mutations, délétions ou recombinaisons avec le même gène ou entre les deux gènes. Actuellement, on compte 43 Ag dans ce système dont 16 seraient impliqués dans la MHNN. Les allèles MNS1 (M) et MNS2 (N) sont portés par le gène GYPA et codominants tandis que MNS3 (S) et MNS4 (s) sont portés par le gène GYPB. Les Ag sont aussi bien développés à la naissance. Les Ac anti-MNS-1 et anti-MNS2 sont le plus souvent naturels de nature IgM alors que les Ac anti-MMS3 et anti-MNS4 sont immuns et de nature IgG (35, 50).

### 1-3- Les anticorps particuliers

Il existe quelques cas particuliers d'anticorps : les anticorps anti-privés et les anticorps anti-publics.

#### 1-3-1- Les anticorps anti-privés

Ils sont capables de reconnaître des Ag de très faible fréquence. Les conséquences pour le fœtus peuvent aller d'une atteinte modérée à la mort in utéro.

La recherche d'agglutinines irrégulières est négative chez la mère alors que les hématies du fœtus sont porteuses de l'Ag privé hérité du père et sensibilisées par l'Ac antiprivé maternel présentant un test direct à l'antiglobuline humaine positif (47).

### 1-3-2- Les anticorps anti-public

Les « receveurs dangereux » ou « public négatif » sont des sujets qui ne possèdent pas un Ag de très grande fréquence et très immunogène.

Les seuls donneurs qui sont compatibles avec un receveur dangereux sont soit eux-mêmes soit de rares individus possédant un phénotype érythrocytaire strictement identique au leur.

Ils peuvent développer des Ac « antipublic » de deux types :

- soit des Ac naturels présents dès la naissance et correspondant à l'Ag qui leur fait défaut (IgM et/ou IgG) ;
- soit des Ac immuns, apparaissant dès la première transfusion ou grossesse incompatible.

Au cours de la grossesse, la présence d'un Ac « antipublic » peut provoquer chez le fœtus une anémie sévère et parfois très précoce (47).

## **2- L'allo-immunisation fœto-maternelle**

Dans ce travail, nous avons choisi d'aborder uniquement l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D (anti-RH1).

### 2-1- Circonstances de survenue

Il existe deux types principaux de situation à l'allo-immunisation : l'étiologie gravidique et l'étiologie transfusionnelle.

### 2-1-1- L'étiologie gravidique

Lors d'une grossesse normale incompatible, l'immunisation fœto-maternelle peut se produire à cause d'hémorragie fœto-maternelle spontanée. Près de 1% des femmes RH :-1 s'immunisent au cours de leur première grossesse avec un enfant RH:1. Le passage transplacentaire est faible en début de grossesse et augmente au cours de la grossesse.

Il est le plus important lors des deux derniers mois et lors de l'accouchement. Les autres circonstances chez la femme enceinte sont les avortements (spontanés ou provoqués), les grossesses extra-utérines, les métrorragies, les traumatismes directs ou indirects au niveau de l'utérus, les placentas praevias, les hématomes rétroplacentaires, les délivrances artificielles et les morts in utéro.

Certains gestes invasifs lors de la grossesse peuvent être responsables d'immunisation fœto-maternelle comme l'amniocentèse, la choriocentèse, la cordocentèse, la placentocentèse ... (51).

Les circonstances pouvant conduire à des hémorragies fœto-maternelles sont résumées dans le **Tableau IV**. Cependant, on estime que près d'un quart de ces allo-immunisations anti-D (anti-RH1) surviennent lors d'une hémorragie fœto-maternelle sans facteur de risque identifiable, majoritairement au troisième trimestre, et celles-ci risquent d'échapper à la prévention ciblée (52).

**Tableau IV :** Circonstances pouvant induire des hémorragies fœto-maternelles au cours de la grossesse

<b>Au premier trimestre</b>	<b>Au deuxième et troisième trimestres</b>	
<i>Risque modéré de passage d'hématies fœtales</i>	<i>Risque modéré de passage d'hématies fœtales</i>	<i>Risque important de passage d'hématies fœtales</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toute fausse-couche spontanée ou menace de fausse-couche spontanée</li> <li>- Toute interruption de grossesse (IVG ou IMG) quels que soient le terme ou la méthode utilisée</li> <li>- Grossesse molaire</li> <li>- Grossesse extra-utérine</li> <li>- Métrorragies</li> <li>- Choriocentèse, amniocentèse</li> <li>- Réduction embryonnaire</li> <li>- Traumatisme abdominal</li> <li>- Cerclage cervical</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Amniocentèse simple</li> <li>- Métrorragies</li> <li>- Cerclage du col utérin</li> <li>- Menace d'accouchement prématuré nécessitant un traitement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Interruption médicale de grossesse</li> <li>- Fausse-couche spontanée tardive</li> <li>- Mort fœtale in utero</li> <li>- Version par manœuvres externes</li> <li>- Traumatisme abdominal ou pelvien</li> <li>- Intervention chirurgicale ou pelvienne</li> <li>- Prélèvements ovulaires : cordocentèse, placentocentèse</li> <li>- Accouchement, quelle que soit la voie</li> </ul>

### 2-1-2- L'étiologie transfusionnelle

La transfusion de sang d'un donneur RH:1 à un receveur RH:-1 entraînera dans 80% des cas une allo-immunisation du receveur si un volume d'hématies de 200 ml ou plus est administré. Le risque n'est que de 10% pour les Ag RhC, RhE et Kell (51).

### 2-1-3- Les autres étiologies

Les autres causes d'immunisation fœto-maternelle sont représentées par les échecs des programmes de prévention par Ig anti-D soit à cause d'une injection trop tardive, soit d'une dose insuffisante (51).

## 2-2- Épidémiologie de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D (anti-RH1)

Le nombre de grossesses conçues par an en France est estimé environ à 1 million. Ce nombre inclut les grossesses avec nouveau-nés vivants, les fausses couches spontanées, les grossesses extra-utérines, les interruptions médicales (IMG) et volontaires de grossesses (IVG).

Sachant qu'environ 15% de la population française est du groupe RH:-1, on peut estimer à 150 000 à 165 000 le nombre de femmes RH:-1 enceintes chaque année. Pour le nombre annuel de femmes RH:-1 enceintes d'un fœtus RH:1, il est de l'ordre de 90 000 car la fréquence du gène D (RH1) est de 0,6 dans la population française (33, 34).

La prévalence des incompatibilités RhD (RH1) est de 0,9 ‰, ce qui concerne 730 à 750 femmes par an en France. Il n'y a pas de registre national exhaustif des allo-immunisations anti-D (anti-RH1), ni de leurs formes graves en France. Les quelques données dont nous disposons permettent d'estimer à quelques dizaines par an le nombre de décès périnataux liés à ce type d'allo-immunisation (34).

Près des 3/4 des allo-immunisations anti-D (anti-RH1) se produisent au cours de l'accouchement, d'une interruption volontaire de grossesse, de fausse couche spontanée ou de grossesse extra-utérine, du fait d'une prévention oubliée ou inadaptée. On considère qu'environ 1/4 des allo-immunisations anti-D (anti-RH1) passerait au travers de la prévention ciblée. Cet échappement à la prévention ciblée serait dû à l'existence d'un risque hémorragique spontané présent notamment en fin de grossesse. C'est le passage d'hématies fœtales dans la circulation maternelle qui en serait la cause. Ce passage aurait lieu chez 4% des femmes au premier trimestre, 12% des femmes au deuxième trimestre, 45% des femmes au cours du troisième trimestre et 60% chez des femmes lors de l'accouchement (34).

## 2-3- Physiopathologie de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D (anti-RH1) et ses conséquences pour le fœtus

La chronologie des événements qui conduit à la MHNN se déroule en plusieurs étapes successives :

- le passage des hématies fœtales dans la circulation maternelle
- la réponse immunitaire primaire maternelle (IgM)
- la réponse immunitaire secondaire (IgG)
- le passage des IgG dans la circulation fœtale
- la fixation des IgG maternelles sur les hématies fœtales
- le déclenchement de la MHNN avec ses conséquences

### 2-3-1- Passage d'hématies fœtales dans la circulation maternelle

L'existence d'hémorragie transplacentaire est responsable du passage d'hématies fœtales dans la circulation maternelle.

La fréquence de ces hémorragies, en situation normale, varie en fonction de l'âge gestationnel et est estimée à environ (52) :

- 4% des femmes au cours du premier trimestre ;
- 12% des femmes au cours du second trimestre ;
- 45% des femmes au cours du troisième trimestre ;
- 60% des femmes lors de l'accouchement.

De même, la fréquence de femmes immunisées en fonction du volume de l'hémorragie fœto-maternelle au moment de l'accouchement serait comprise entre 4 et 9% dans les six mois suivant l'accouchement. Cette fréquence atteint 20% à partir de la deuxième grossesse incompatible s'il n'y a pas eu de prévention.

Le volume de sang fœtal nécessaire pour induire une immunisation semble très variable d'une femme à l'autre. Pour certaines, un apport de 0,05 mL serait suffisant alors que pour d'autres ce même volume n'induirait pas d'immunisation. Le volume de sang moyen responsable d'une immunisation est en moyenne de l'ordre de 0,1 mL (35).

### 2-3-2- La réponse immunitaire primaire maternelle

Elle est la conséquence du passage d'hématies étrangères dans l'organisme maternel. C'est une réaction faible et tardive (53).

Au cours d'un premier contact avec un allo-antigène, la synthèse d'Ac s'observe habituellement entre la 8<sup>e</sup> et la 9<sup>e</sup> semaine après la stimulation. Lors d'une réponse primaire, les Ac produits sont de type IgM et les cellules gardent en mémoire le phénomène d'immunisation par l'intermédiaire des lymphocytes B mémoires (52). La cinétique de cette réponse est rapportée dans la **figure 14** et le **tableau V** rappelle les caractéristiques de la réponse primaire.

Les Ac ne sont décelables dans le sang maternel que plusieurs mois après la naissance du premier enfant.

Le risque d'immunisation est lié au nombre de GR fœtaux présents au moment de l'accouchement dans le sang maternel. L'allo-immunisation n'est pas obligatoire et on estime que 30 % de femmes s'immunisent contre l'Ag D (RH1). De plus, l'incompatibilité ABO protège contre l'allo-immunisation anti-D (anti-RH1). En effet, l'apparition de l'immunisation

anti-RhD (anti-RH1) est très significativement différente entre une femme dont le fœtus serait incompatible dans le système ABO et une femme dont le fœtus serait compatible dans le système ABO. Cela est dû à la destruction des hématies incompatibles avant que la mère ne puissent s'immuniser (35).

### 2-3-3- La réponse immunitaire secondaire et le passage des anticorps IgG dans la circulation fœtale

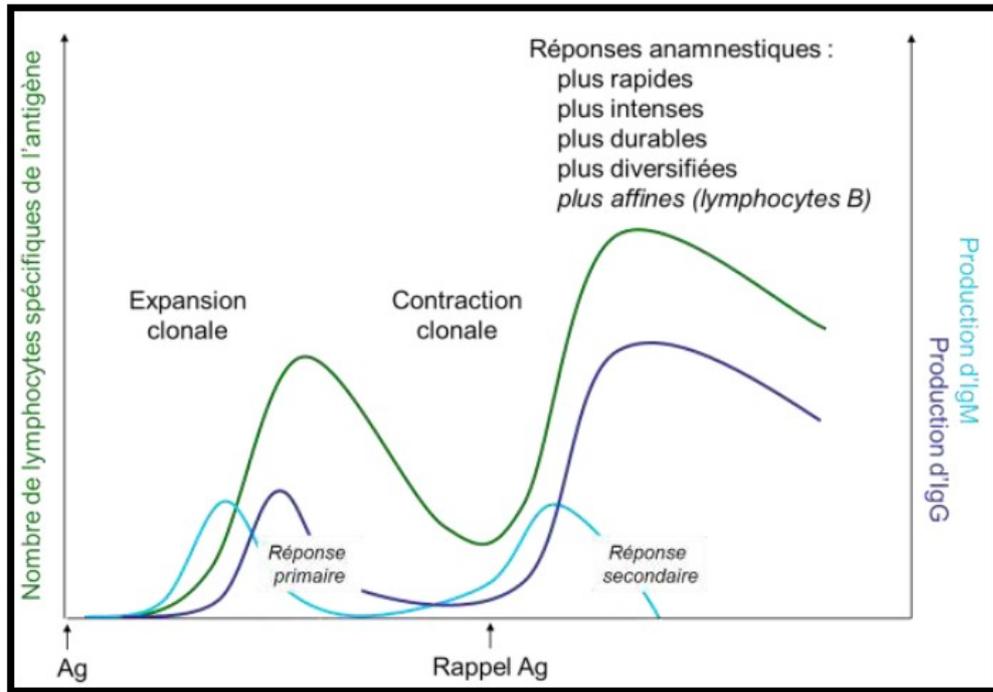
Cette réaction ne se produit qu'après une première immunisation (grossesse, transfusion, greffe).

Lors d'une nouvelle grossesse incompatible, quelques hématies passent à travers le placenta et déclenchent une réponse immunitaire qui est cette fois rapide et massive à cause des lymphocytes B mémoires de la première immunisation. La mère va produire des Ac en grande quantité de type IgG. Ces Ac possèdent des structures spéciales sur le fragment Fc de leur chaîne lourde qui leur donnent la propriété de traverser activement le placenta et d'atteindre la circulation fœtale (35, 53).

La cinétique est présentée dans la **figure 14**. Les principales caractéristiques de la réponse secondaire apparaissent dans le **tableau V**.

**Tableau V :** Caractéristiques des réponses primaire et secondaire

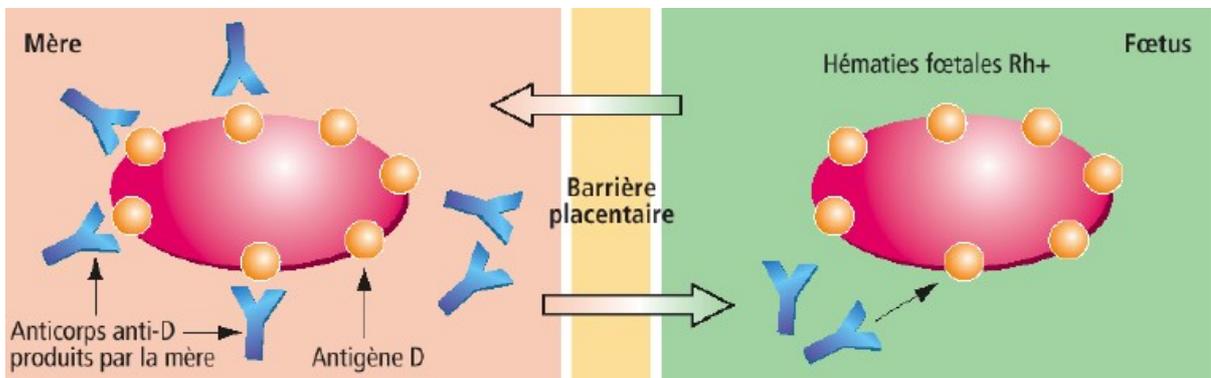
<b>Propriétés</b>	<b>Réponse primaire</b>	<b>Réponse secondaire</b>
<b>Cellules B</b>	Cellule B naïve	Cellule B mémoire
<b>Période de latence</b>	4-7 jours	1-3 jours
<b>Pic de la réponse</b>	> 10 jours	3-5 jours
<b>Amplitude du pic de la réponse</b>	variable	100 à 1000 fois plus élevée que primaire
<b>Isotype produit</b>	IgM	IgG
<b>Affinité de l'Anticorps</b>	Faible	Élevée



**Figure 14 :** Cinétique des réponses primaire et secondaire de l'allo-immunisation fœto-maternelle

2-3-4- La fixation des IgG maternelles sur les hématies fœtales et ses conséquences

Après avoir atteint la circulation fœtale, les Ac anti-D (anti-RH1) maternels se fixent à la surface des hématies fœtales sur les Ag correspondants. La **figure 15** illustre ce phénomène. S'ensuit la phagocytose, puis la lyse des hématies fœtales sensibilisées par les Ac IgG via leurs récepteurs Fc. La destruction des GR se fait surtout au niveau de la rate.



**Figure 15 :** Passage des hématies fœtales dans la circulation maternelle

La pathogénicité des Ac IgG est fonction de :

- la quantité d'Ac ;
- l'affinité de l'Ac pour son Ag spécifique ;
- la distribution et le nombre d'Ag présents sur l'hématie.

Le transfert actif des Ac à travers le placenta et la maturité fonctionnelle de la rate fœtale à phagocyter les hématies sensibilisées jouent également un rôle dans la symptomatologie de la maladie (47, 52).

Seules les IgG1 et les IgG3 sont responsables de maladie hémolytique périnatale. Chacune de ces sous-classes d'IgG ayant des caractéristiques particulières. En effet, les IgG1 peuvent traverser le placenta en grand nombre dès la 20<sup>e</sup> semaine d'aménorrhée (SA), alors que les IgG3 passent dans la circulation fœtale entre la 28<sup>e</sup> et la 32<sup>e</sup> SA. Les IgG1 peuvent donc provoquer une anémie plus sévère que les IgG3, mais les IgG3 entraînent une augmentation du taux de bilirubine sérique plus élevé que les IgG1 (47).

Récemment, il a été suggéré que l'implication des IgG dans la maladie hémolytique périnatale serait liée à un récepteur des IgG, le FcRn (« neonatal Fc receptor »). Il s'agit d'une molécule appartenant à la famille du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, qui possède trois propriétés, à savoir :

- protéger les IgG du catabolisme endothélial grâce à sa fonction de recyclage ce qui expliquerait la longue demi-vie des IgG, mais cette fonction est saturable ;
- orienter la biodistribution des IgG dans l'organisme grâce à un mécanisme de transcytose plutôt que vers le recyclage grâce à la phosphorylation d'un résidu sérine ;
- induire une coopération avec les FcγR classiques lors de la phagocytose et de la présentation des complexes immuns (57).

### **3- L'aspect clinique de la maladie hémolytique du nouveau-né**

Dans la plupart des cas, il n'y a pas de manifestation apparente de la maladie avant la naissance.

Lorsque des signes cliniques apparaissent chez la femme enceinte tel un hydramnios (rétention de liquide), ceux-ci précèdent le plus souvent la mort du fœtus. Cependant, la mort du fœtus n'est pas toujours annoncée par des signes cliniques.

Après la naissance d'un enfant atteint, plusieurs tableaux cliniques peuvent se manifester. On retrouve de façon constante une anémie plus ou moins importante, due à l'hémolyse des globules rouges fœtaux.

Les divers tableaux cliniques de la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né qui peuvent être observés sont : l'anasarque fœto-placentaire, l'ictère simple et l'ictère grave correspondant à l'ictère nucléaire (ces deux derniers tableaux concernant le nouveau-né).

#### **3-1- La forme bénigne : l'ictère simple**

Les Ac de la mère fixés à la surface des hématies du fœtus, provoquent la destruction rapide des hématies fœtales par phagocytose au niveau de la rate et de façon moins importante au niveau du foie. Pour compenser cette anémie, le foie produit un grand nombre d'érythroblastes, ce qui se traduira par une hépatomégalie.

A la naissance, l'enfant présente vers le troisième jour une anémie intense et un subictère dont l'apparition est progressive. La guérison est généralement spontanée après quelques jours (35, 52).

### 3-2- La forme sévère : l'ictère grave

La bilirubine en grande quantité ne peut être évacuée par l'organisme maternel et le foie du nouveau-né est incapable de la métaboliser en raison d'un déficit physiologique en enzymes de glycuconjugaison. Lorsque l'anémie est trop importante, la bilirubine libre qui en découle va s'accumuler dans le sang, être prise en charge par l'albumine pour son transport plasmatique mais diffusera dans le milieu extravasculaire lorsque les capacités de son transport par l'albumine seront dépassées. L'accumulation de bilirubine libre, non conjuguée sera toxique pour le cerveau au niveau des noyaux gris centraux. Cette toxicité se traduira par des signes notamment neurologiques comme des crises hypertoniques avec mouvements anormaux. On parlera alors d'ictère nucléaire.

Cet ictère survient tout de suite après la naissance et s'intensifie avec le temps. Il peut être associé à une hépatosplénomégalie et à des signes hémorragiques (ecchymoses, pétéchies) (35, 52).

### 3-3- L'atteinte fœtale grave : l'anasarque fœto-placentaire

Dans les incompatibilités les plus graves, l'anémie est très importante et un syndrome de rétention hydrique généralisée se manifeste accompagné d'hypoprotidémie et d'hypervolémie. On appelle ce syndrome l'anasarque fœto-placentaire.

Au stade précoce, l'enfant souffre d'insuffisance cardiaque fonctionnelle, ce qui entraîne une augmentation du débit cardiaque et de la pression hydrostatique responsable en partie du syndrome œdémato-ascitique.

Au stade tardif, il y a hypertrophie hépatique et une insuffisance hépatique qui concourt à la majoration du syndrome œdémateux.

Ce syndrome est souvent associé à une naissance prématurée de l'enfant, à des œdèmes, à une pâleur, et un subictère, une dyspnée, une hépato-splénomégalie, une ascite, une insuffisance cardiaque, et à des signes hémorragiques.

Le pronostic vital est sombre même si le traitement est bien conduit (51, 58).

Le **tableau** ci dessous présente un résumé de la chronologie des événements qui concourent à la maladie hémolytique du nouveau-né.

**Tableau VI :** Chronologie des événements qui concourent à la maladie hémolytique du nouveau-né en l'absence de traitement

Physiopathologie de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D en l'absence de mise en oeuvre des mesures préventives			
Enfant RhD+ de rang 1 : contact GR fœtaux - sang maternel ↓	Enfant RhD+ de rang ≥ 2 ↓		
Production d'Ac maternels contre les Ag fœtaux (0,1 ml de sang fœtal suffit mais réponse lente : quelques semaines) ↓ Ac maternels se fixant sur les globules rouges fœtaux via le placenta ↓ GR fœtaux hémolysés dans le foie et la rate du fœtus ↓ Anémie fœtale. Hyperbilirubinémie épurée par l'organisme maternel	Grossesses ultérieures avec des fœtus RhD positif ↓ Le passage d'une quantité bien moindre de GR déclenche une réponse rapide et intense ↓ Les Ac maternels traversant le placenta en plus grande quantité et se fixant sur les GR fœtaux ↓ Hémolyse fœtale massive		
	<table border="1"> <tr> <td>Anémie fœtale sévère ↓ Anasarque fœto-placentaire ↓ Mort fœtale in utero ou décès à la naissance</td> <td>Hyperbilirubinémie massive épurée par l'organisme maternel pendant la grossesse mais non éliminée par le nouveau né ↓ Ictère hémolytique ↓ Ictère nucléaire du nouveau-né ↓ Décès ou séquelles psychomotrices graves</td> </tr> </table>	Anémie fœtale sévère ↓ Anasarque fœto-placentaire ↓ Mort fœtale in utero ou décès à la naissance	Hyperbilirubinémie massive épurée par l'organisme maternel pendant la grossesse mais non éliminée par le nouveau né ↓ Ictère hémolytique ↓ Ictère nucléaire du nouveau-né ↓ Décès ou séquelles psychomotrices graves
Anémie fœtale sévère ↓ Anasarque fœto-placentaire ↓ Mort fœtale in utero ou décès à la naissance	Hyperbilirubinémie massive épurée par l'organisme maternel pendant la grossesse mais non éliminée par le nouveau né ↓ Ictère hémolytique ↓ Ictère nucléaire du nouveau-né ↓ Décès ou séquelles psychomotrices graves		

## **PARTIE II : Le dépistage de l'allo-immunisation anti-D (anti-RH1) et le suivi des grossesses à risque**

Depuis les années 60, pour éviter les complications liées à l'incompatibilité fœto-maternelle, un suivi rigoureux des femmes enceintes a été mis en place dans le but d'identifier les femmes à risque (femme Rhésus négatif porteuse d'un fœtus Rhésus positif) pour leur proposer une prophylaxie adaptée. Ce dépistage repose sur divers examens biologiques qui sont régis par une législation rigoureuse.

### **1- Législation**

La législation actuellement en vigueur repose sur l'arrêté du 19 avril 1985 (60, Annexe 1) qui définit les examens obligatoires à réaliser chez toutes femmes enceintes. Cet arrêté a été complété par la suite par le décret du 14 février 1992 (61) qui fut abrogé le 27 mai 2003. En 2005, le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF) a publié ses recommandations de bonne pratique clinique sur la prévention de l'allo-immunisation RhD (RH1) fœto-maternelle (34).

La loi prévoit actuellement :

- La détermination des groupes ABO RH, du phénotype RH KEL chez toutes les primipares et les multipares qui n'auraient pas bénéficié de cet examen lors de leur première grossesse ce qui permettra l'établissement d'une carte de groupe sanguin définitive après une seconde détermination réalisée en fin de grossesse sur un deuxième prélèvement ;

- L'information des femmes Rhésus négatif sur l'immunisation anti-D (anti-RH1) (définition, dépistage, suivi, prévention) et ses conséquences ;
- La documentation du groupe Rhésus du conjoint doit être effectuée ;
- Le génotypage du groupe Rhésus du fœtus sera réalisé dès que possible pour limiter la prophylaxie Rhésus aux femmes enceintes d'enfant Rhésus positif et un contrôle des Ac irréguliers dans le sang maternel est instauré au 6<sup>e</sup>, 8<sup>e</sup>, 9<sup>e</sup> mois et lors de l'accouchement pour toutes les femmes n'ayant pas eu de prophylaxie à la 28<sup>e</sup> SA ;
- Pour les femmes Rhésus positif et sans antécédents transfusionnels, une recherche d'Ac irréguliers dès le 2<sup>e</sup> mois et au cours des 8<sup>e</sup> et 9<sup>e</sup> mois sera réalisée ;
- Pour celles ayant déjà été transfusées, la recherche des Ac irréguliers aura lieu au 3<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup>, 8<sup>e</sup> mois et pendant l'accouchement ;
- Enfin, pour les femmes déjà immunisées, des examens adaptés à la situation sachant que les dosages devront être effectués à intervalles rapprochés selon le type d'Ac trouvé, leur concentration et le terme de la grossesse.

## **2- Recherche de « preuves » d'allo-immunisation utilisées pour le dépistage de l'allo-immunisation anti-D (anti-RH1) fœto-maternelle**

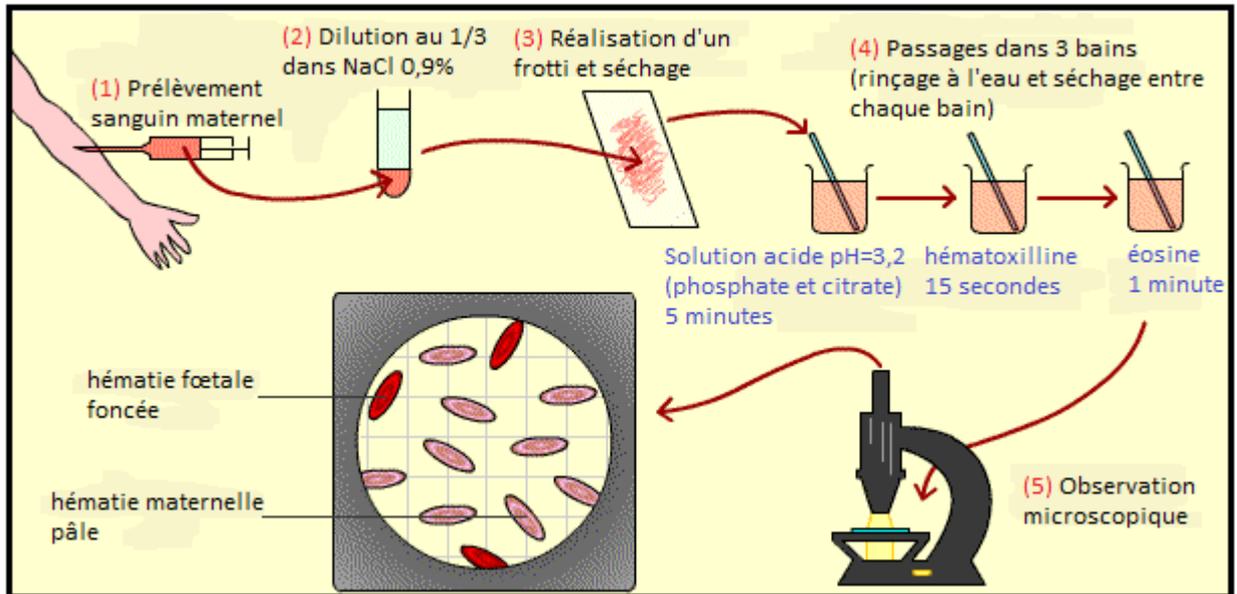
Les premières techniques de dépistage sont apparues dans la deuxième moitié du XX<sup>e</sup> siècle. Ces tests permettent soit la mise en évidence du passage des hématies fœtales dans la circulation maternelle (test de KLEIHAUER) soit la recherche des Ac irréguliers responsables de l'allo-immunisation anti-D (anti-RH1) (test indirect à l'antiglobuline humaine et autres tests).

## 2-1- Le test de KLEIHAUER

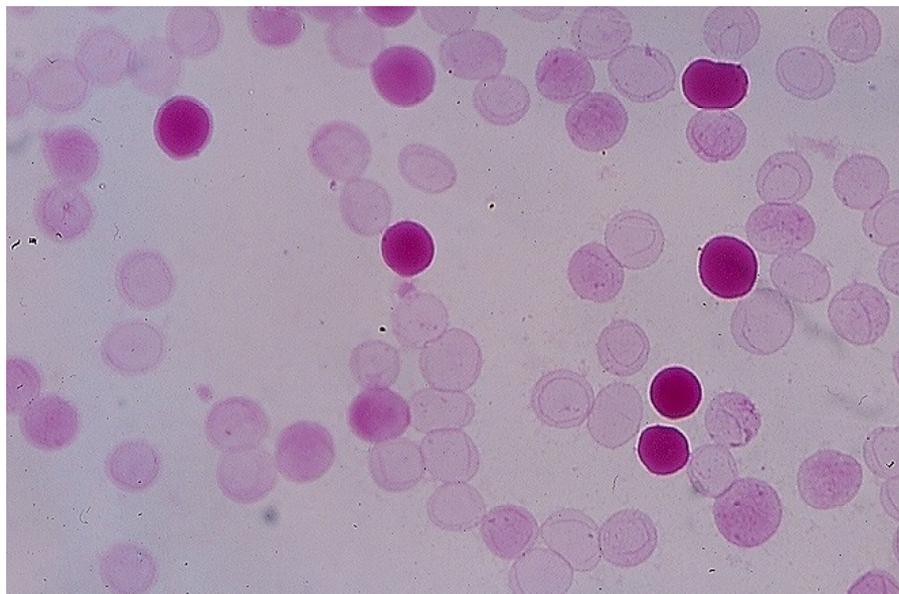
En 1957, Enno KLEIHAUER rédigea un article sur une nouvelle technique qui permettait de mettre en évidence des hématies fœtales présentes en très faible concentration dans le sang maternel (62).

Le test repose sur la propriété de l'hémoglobine fœtale (Hb F) d'être résistante en solution acide contrairement à l'hémoglobine adulte (Hb A). Le frottis de sang maternel est immergé dans une solution acide, l'Hb A s'en trouve détruite mais pas l'Hb F. Puis le frottis est coloré par l'éosine, les hématies fœtales apparaissent en rouge car leur hémoglobine est intacte, alors que les hématies adultes, éluées de leur hémoglobine, apparaîtront très pâles (**figure 16**). Le rapport du taux d'hématies fœtales sur le taux d'hématies adultes maternelles permet d'estimer le volume de sang fœtal présent dans la circulation maternelle. Ce rapport est exprimé en nombre d'hématies fœtales pour 10 000 hématies adultes sachant qu'une hématie fœtale correspond au passage de 0,5 ml de sang fœtal dans la circulation maternelle. Le résultat du test de Kleibauer permet d'adapter la dose d'Ig anti-D qu'il faudra injecter à la mère pour détruire les GR fœtaux et ainsi éviter qu'elle ne s'immunise (63).

Grâce à ce test, on peut déterminer le risque réel d'immunisation de la mère par son enfant et ainsi prévoir une prévention adaptée avec une simple prise de sang (62).



**Figure 16 :** Protocole pour la réalisation du test de KLEIHAUER



**Figure 17 :** Frottis après la réalisation du test de Kleibauer où l'hématie foetale apparaît foncée et l'hématie maternelle apparaît pâle

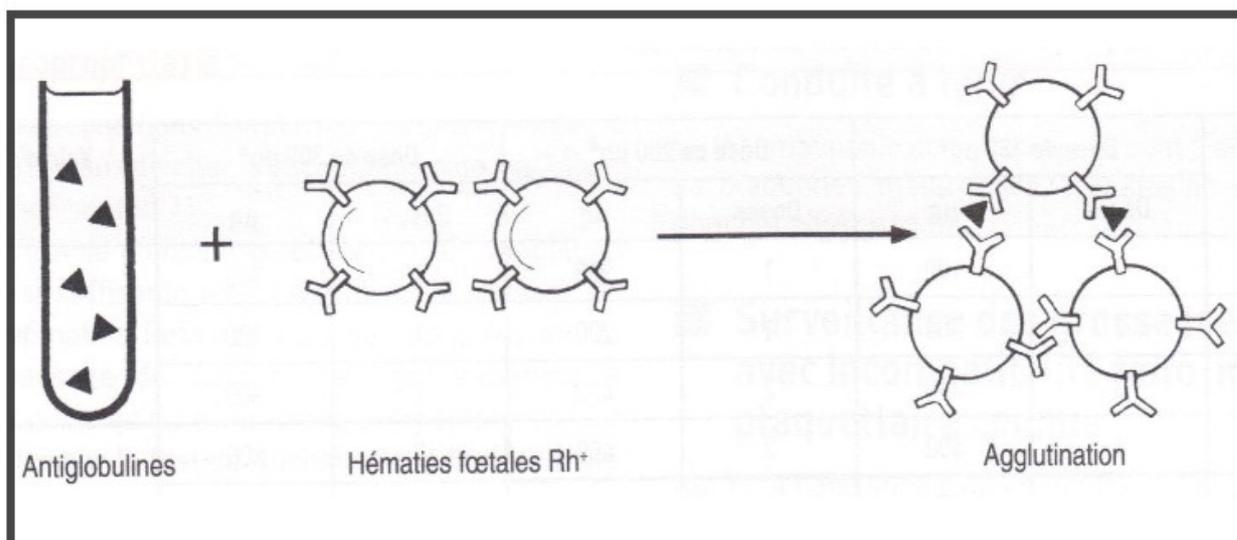
## 2-2- Le test à l'antiglobuline humaine (anciennement test de COOMBS)

En 1945, Robert Royston Amos COOMBS (1921-2006), médecin immunologiste britannique, décrit le test à l'antiglobuline qui permet encore de nos jours la mise en évidence d'Ig fixée sur les GR ou dans le sérum à l'aide d'une antiglobuline humaine (qui a la particularité d'être dirigée contre une immunoglobuline humaine). Ce test, qui portera le nom de test de COOMBS (devenu test à l'antiglobuline humaine), permettra de façon plus générale la recherche d'Ac irréguliers (66).

On distingue les tests à l'antiglobuline direct et indirect.

Le **test direct à l'antiglobuline humaine** consiste à mettre en évidence la présence d'Ac fixés sur les érythrocytes. Après avoir été extraits du plasma et lavés, les GR du patient sont remis en suspension dans une solution saline ne contenant pas d'Ac libres et mis en contact avec une antiglobuline. Si des Ac sont présents sur les GR, une agglutination des hématies apparaîtra (**figure 18**). Le test sera alors dit positif.

Ce test est utilisé sur les GR de l'enfant à sa naissance pour déterminer si l'enfant est atteint ou pas de maladie hémolytique (67).



**Figure 18 :** Test direct à l'antiglobuline humaine  
(pour les hématies RH1 et le anticorps anti-RH1)



La mise en évidence d'un Ag permet la détermination d'un phénotype de groupe sanguin. On met en présence des érythrocytes inconnus avec un Ac connu. S'il y a agglutination, cela signifie que l'Ag porté par les érythrocytes est de même nature que l'Ac connu ajouté (67).

### 2-3- La recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI)

N. COSTEA (1962) et S.P. MASOUREDIS (1981) utilisèrent des dosages radioimmunologiques pour déterminer la quantité d'Ac irréguliers présents dans la circulation maternelle. Ces méthodes d'analyse quantitative sont très précises et sensibles, cependant nécessitant l'utilisation de composés radioactifs, ces dosages seront peu à peu délaissés au profit de techniques immunoenzymatiques (1).

Actuellement, la RAI est réalisée sur un échantillon de sang prélevé sur anticoagulant et par test indirect à l'antiglobuline. Elle comporte toujours deux étapes : le dépistage puis l'identification des Ac. Si le dépistage est positif, l'épreuve d'identification est indispensable pour déterminer la nature et la spécificité des Ac présents. Si les Ac identifiés sont passibles d'entraîner une MHNN, la RAI avec identification, titrage et dosage pondéral sera réalisée toutes les trois à quatre semaines jusqu'à la 20<sup>e</sup> SA puis au-delà tous les 15 jours ou plus si nécessaire (47).

### **3- Le dépistage de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D (anti-RH1) : les étapes**

En pratique, ce dépistage comporte la détermination du groupe sanguin de la mère puis du père, l'étude des Ac immuns maternels, la détermination du phénotype et du génotype du fœtus. Chaque étape de ce dépistage doit respecter l'arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale (Annexe 2).

#### **3-1- La détermination du groupe sanguin de la femme enceinte**

Il est essentiel pour détecter les patientes à risque. Le groupage sanguin ABO RH et le phénotype RH KEL sont effectués à l'aide de deux déterminations pratiquées sur deux prélèvements différents. Ces deux déterminations doivent être réalisées par le même laboratoire d'analyse de biologie médicale pour établir une carte de groupe sanguin receveur valide.

Si la patiente est RH:1, deux RAI seront effectuées : une en début de grossesse et l'autre en fin de grossesse afin de vérifier l'absence d'éventuelle allo-immunisation.

Si la patiente est RH:-1, les RAI effectuées au cours de la grossesse seront plus nombreuses : une lors de la première consultation prénatale puis au cours du 6<sup>e</sup>, 8<sup>e</sup> et 9<sup>e</sup> mois de grossesse (35).

Le **tableau** ci-dessous présente le calendrier des RAI.

**Tableau VII :** Calendrier des RAI selon l'arrêté du 19 avril 1985 et les recommandations de bonne pratique clinique du CNGOF

Femme enceinte	Date des RAI
Femme RH1 primigeste sans antécédent transfusionnel	Avant la fin du 3 <sup>e</sup> mois Au cours du 8 <sup>e</sup> ou 9 <sup>e</sup> mois
Femme RH1 primigeste avec antécédent transfusionnel	Avant la fin du 3 <sup>e</sup> mois Au cours du 6 <sup>e</sup> mois Au cours du 8 <sup>e</sup> mois Au cours du 9 <sup>e</sup> mois
Femme RH:-1	Avant la fin du 3 <sup>e</sup> mois Au cours du 6 <sup>e</sup> mois Au cours du 8 <sup>e</sup> mois Au cours du 9 <sup>e</sup> mois Avant l'injection d'immunoglobuline anti-D Dans les huit semaines suivant l'accouchement
Chez toutes les femmes	En cas de besoin transfusionnel
Femmes allo-immunisées	RAI régulièrement avec titrage et dosage pondéral

### 3-2- La détermination du groupe sanguin du père

La détermination du groupe sanguin paternel est nécessaire pour appréhender le risque. Si le père est RH:-1, l'enfant ayant le même Rhésus que ses deux parents, il n'y aura pas d'allo-immunisation anti-RH1. En revanche, si le père est RH:1, il faudra déterminer s'il est homozygote (dans ce cas, tous les enfants à naître seront Rhésus positifs) ou hétérozygote (47).

### 3-3- L'étude des anticorps immuns maternels

Le risque d'hémolyse in utero est évalué par l'étude des antécédents obstétricaux et celle des Ac dont le titre et la concentration augmentent significativement au cours d'une grossesse incompatible. Il est donc essentiel que toute femme enceinte immunisée soit prise en charge par un service spécialisé dans le diagnostic anténatal et d'immunohématologie référent pour ce domaine (47).

L'étude des Ac immuns est réalisée par le test indirect à l'antiglobuline. Cette étude comporte un titrage et un dosage pondéral.

#### 3-3-1- Le titrage des anticorps

L'apparition d'Ac irréguliers lors de la grossesse est généralement un argument en faveur d'un conflit fœto-maternel. Lorsque des Ac irréguliers ont été mis en évidence dans le sang maternel, il est indispensable de réaliser un titrage des Ac en tube dans un milieu salin par test indirect à l'antiglobuline, et un suivi de ces Ac tous les mois puis tous les 15 jours à partir de 20-24 SA en comparant leurs taux aux titrages précédents. La conservation des échantillons séquentiels par le laboratoire effectuant les titrages permet de réaliser des titrages comparatifs. Divers paramètres peuvent influencer sur le résultat du titrage. Il s'agit de la concentration en Ag et en Ac, des réactifs et de la méthode de lecture utilisés, de la constante d'affinité de l'Ac. De ce fait, cette méthode reste insuffisante et peu performante car seule la concentration des Ac capables de se fixer aux hématies-test est prise en compte. De plus, le titrage est peu reproductible d'un laboratoire à un autre et doit donc être réalisé toujours dans le même laboratoire.

Le titre d'Ac immuns dans le sang maternel ne permet pas d'évaluer précisément la gravité de l'atteinte fœtale. Cependant pour les anti-D (anti-RH1), le seuil dangereux a été fixé au 1/16<sup>e</sup> (35, 47).

### 3-3-2- Le dosage pondéral

Ce dosage est utilisé pour l'Ac anti-D (anti-RH1). Il exprime la concentration des Ac en  $\mu\text{g/mL}$  par rapport à un étalon standard anti-D (anti-RH1) soit la concentration réelle anti-D (anti-RH1) dans le sang maternel. Réalisée dès la 12<sup>e</sup> SA, cette technique d'agglutination est automatisée, reproductible et peu dépendante de la constante d'affinité. Si le taux d'Ac augmente, la grossesse est conflictuelle. Le dosage de l'Ac sera répété tous les mois, puis à partir de la moitié de la grossesse tous les 15 jours ou davantage si nécessaire. Pour les anti-D (anti-RH1), le seuil dangereux est déterminé à  $0,7 \mu\text{g/mL}$  (35, 47).

### 3-3-3- L'association dosage pondéral et titrage

Cette association permet une meilleure évaluation du risque d'hémolyse in utero dû à l'allo-immunisation fœto-maternelle car le risque est fonction de la concentration et de l'affinité de l'Ac anti-D (anti-RH1). Elle permet aussi de diminuer les gestes invasifs, de préciser à quel moment il faudra les pratiquer et de détecter les réactivations qui se produisent pour la moitié des grossesses incompatibles (47).

### 3-4- La détermination du phénotype fœtal

Si le père de l'enfant est hétérozygote pour le gène D (RH1) du système rhésus, il existe un doute quant au phénotype Rhésus du fœtus. Dans ce cas-là, il est nécessaire de déterminer le phénotype fœtal pour savoir si la grossesse est à risque et ainsi adapter la prophylaxie. On peut l'effectuer précocement par biopsie du trophoblaste, par amniocentèse ou plus tardivement, à partir de sang du fœtus. Mais le geste pratiqué pour le prélèvement est potentiellement dangereux et donc déconseillé (47).

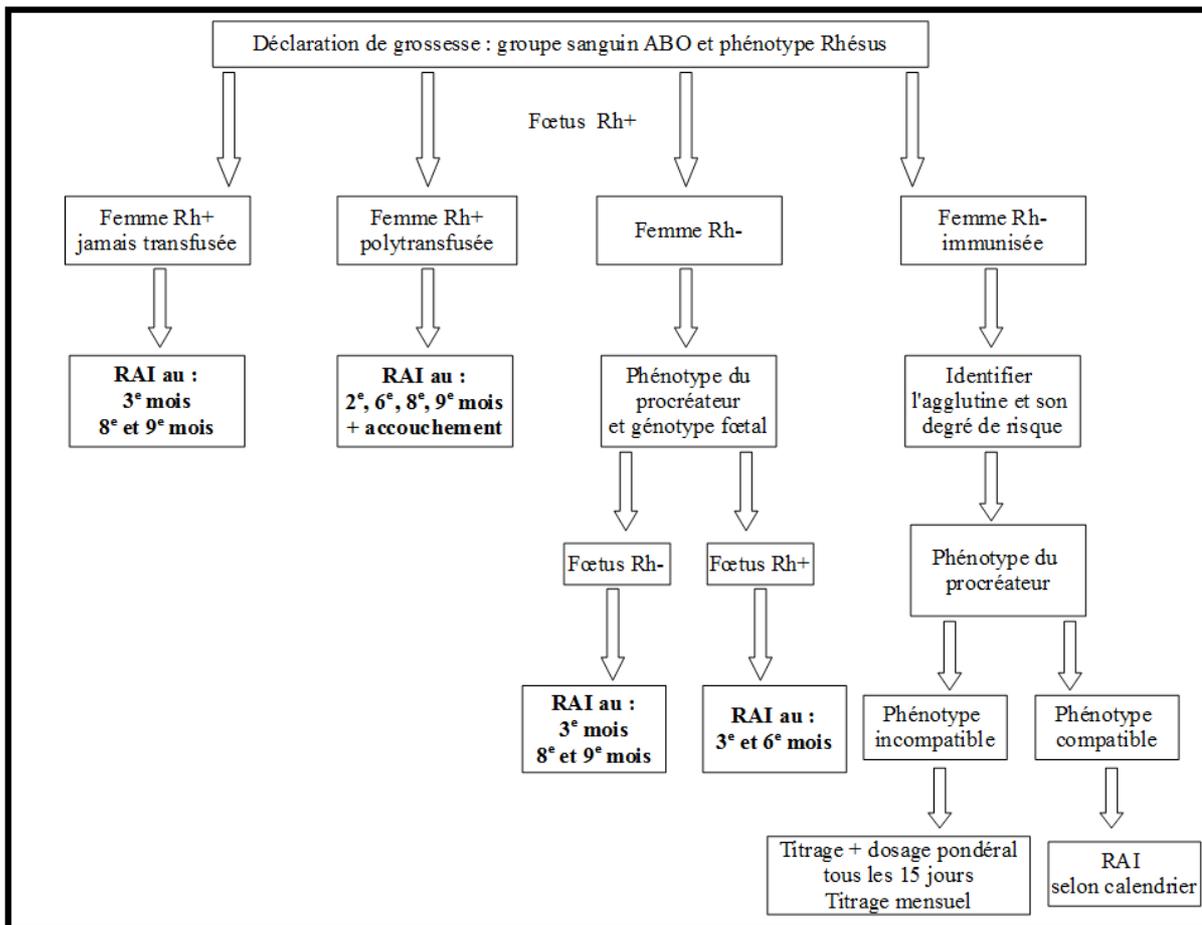
### 3-5- La détermination du génotype fœtal

Depuis près de 20 ans, la détermination du génotype fœtal est possible par polymérase chain reaction (PCR) sur liquide amniotique dès la 14<sup>e</sup> SA (69).

La présence d'ADN fœtal dans le liquide amniotique ayant été démontrée, il s'agissait donc d'amplifier par PCR les séquences du gène Rhésus sur le chromosome 1, pour arriver au génotype fœtal.

Contrairement aux pratiques évoquées plus haut, le risque traumatique lié à l'amniocentèse est limité, mais non nul (47).

3-6- Résumé des étapes du dépistage de l'allo-immunisation anti-D (anti-RH1) de la femme enceinte (figure 20)



**Figure 20 :** Dépistage de l'incompatibilité fœto-maternelle Rhésus adapté d'après Lansac J. et *al.*, 2003

## **4- Avancées récentes dans la détermination du génotype fœtal et ses conséquences**

Depuis ces dernières années, une nouvelle technique de dépistage a été mise au point pour déterminer le génotype du fœtus. Cette technique est non invasive, car le prélèvement ne nécessite qu'une prise de sang chez la mère, donc sans risque pour le fœtus et la mère.

Cette nouvelle approche repose sur 3 éléments fondamentaux :

- la présence d'ADN fœtal libre dans la circulation maternelle ;
- le développement de techniques de "Polymerase Chain Reaction" (PCR) en temps réel ayant des niveaux de sensibilité et spécificité supérieurs aux autres techniques d'amplification ;
- la présence du gène recherché dans le génome fœtal et son absence du génome maternel (70).

### **4-1- L'ADN fœtal libre circulant**

En 1997, Y.M.D. LO et son équipe ont mis en évidence la présence d'ADN fœtal dans la circulation maternelle chez une femme enceinte d'un fœtus de sexe masculin (71). Après extraction de l'ADN total du prélèvement, une séquence spécifique du chromosome Y fût amplifiée, séquence ne pouvant appartenir qu'au fœtus.

Y.M.D. LO et son équipe ont observé que l'ADN fœtal apparaissait précocement dans la circulation sanguine au cours de la grossesse et qu'il était possible de détecter cet ADN fœtal dès la 6<sup>ème</sup> semaine de grossesse (72).

La quantité d'ADN fœtal augmente de manière croissante au cours de la grossesse ; elle est estimée à 3,4% de l'ADN plasmatique total maternel au 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse, soit 25 équivalents génome fœtal/mL de plasma maternel, 6,2% soit 100 équivalents génome fœtal/mL de plasma maternel au 3<sup>e</sup> trimestre de grossesse (72).

Y.M.D. LO constata en 1999 que l'ADN fœtal libre était éliminé de la circulation maternelle dans sa totalité 48 heures après l'accouchement. L'ADN fœtal étudié est donc bien celui de l'enfant à naître et non pas celui d'un enfant d'une précédente grossesse (73).

#### 4-2- La technique du génotypage fœtal RhD (RH1) sur sang maternel

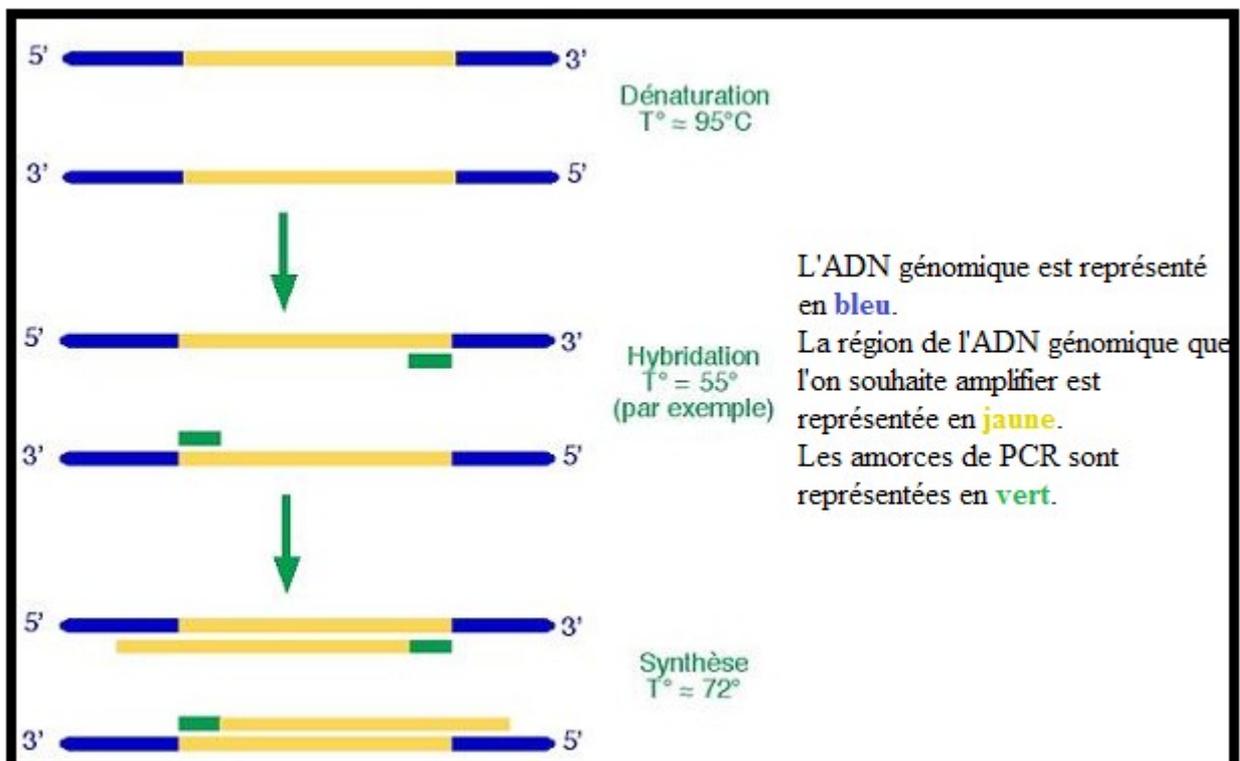
La méthode utilisée permet la détermination dès la 10-12 SA du génotype RhD (RH1) fœtal à partir de l'ADN libre présent dans le sang maternel. L'ADN fœtal est extrait du sang maternel, puis amplifié et étudié.

Pour extraire l'ADN fœtal, on réalise une étape de lyse des cellules, puis on élimine les protéines, le mélange réactionnel est ensuite déposé sur une colonne fixant l'ADN. Après plusieurs lavages, l'ADN sera élué. Pour chaque série d'extraction, on inclut aux échantillons des patientes un contrôle positif (soit du plasma de patient RH:1), un contrôle négatif (soit du plasma de patient RH:-1) et un contrôle blanc (soit 500 µL d'eau remplaçant le plasma). Ces contrôles permettront la vérification de la qualité et du rendement de l'extraction (74).

Après l'extraction, on réalise la PCR en temps réel. La PCR est une technique particulière d'amplification d'une séquence choisie d'ADN caractérisée par 3 phases à des températures différentes qui sont :

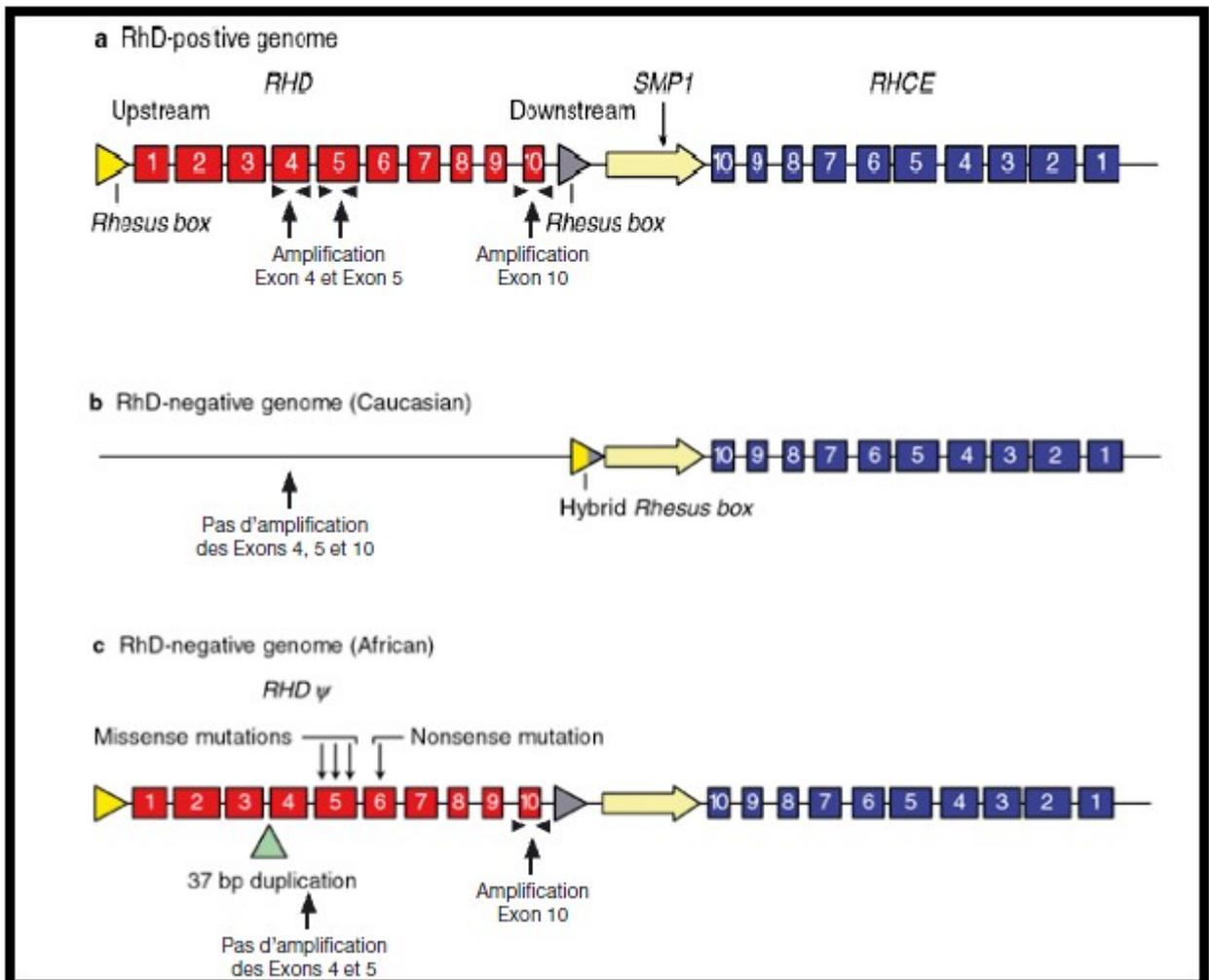
- La **dénaturation**, réalisée à 95°C, qui aboutit à la rupture de la double hélice d'ADN et à la formation de deux simples brins d'ADN ;
- L'**hybridation**, réalisée entre 40°C et 65°C, qui va permettre la fixation des amorces d'ADN sur les simples brins d'ADN selon le principe d'appariement des bases complémentaires pour amplifier une séquence d'ADN choisie ;
- L'**élongation**, réalisée à 72°C, qui conduit à l'amplification d'une séquence d'ADN par ajout successif de désoxyribonucléotides présents dans le mélange en large excès.

Ces trois étapes forment un cycle et pourront être répétées jusqu'à l'obtention d'un nombre suffisant de copies (voir **figure 21**).



**Figure 21 :** Principe de la polymerase chain reaction (PCR)

Dans la population caucasienne, la cause la plus commune du manque d'expression de l'antigène D (RH1) est la délétion complète du gène D (RH1). La détection de séquences spécifiques au gène D (RH1) dans le plasma d'une femme RH:-1 indique que son fœtus est RH:1. Dans ce cas-là, l'amplification de l'exon 10 permettra de déterminer le génotype RhD (RH1) du fœtus. Cependant, dans d'autres populations, le gène D (RH1) a plusieurs variants qui peuvent conduire à des erreurs. La **figure 22** nous montre que dans les populations africaines, les patients peuvent présenter un pseudogène D (RH1) tout en étant RH:-1. Ce pseudogène peut modifier le résultat final. Pour éviter cela, il suffit d'amplifier les exons 4 et 5 qui sont différents de ceux portés par le gène D (RH1) (35).



**Figure 22 :** Organisation génomique du système Rhésus et séquences amplifiées lors de la détermination du génotype fœtal

#### 4-3- Utilisation en 2012 du génotype fœtal RH-D (RH1) sur sang maternel

Actuellement, cette méthode n'est réalisée que dans des centres spécialisés et seules certaines patientes peuvent en bénéficier, en particulier les femmes RH:-1 ayant déjà une allo-immunisation (74).

En 2005-2006, un kit de première génération a été développé pour aider à la généralisation de ce test. Il s'agit du kit *free DNA fetal kit*®. Ce test cible trois régions distinctes du gène D (RH1) : les exons 5, 7 et 10, afin de détecter très spécifiquement le plus grand nombre de variants du gène (76).

Si cette technique reste d'utilisation limitée, cela est sans doute dû à l'absence de standardisation des techniques, l'absence de kit commercial pour une diffusion en dehors de centres très spécialisés et l'absence de remboursement du test par la sécurité sociale (34).

A l'avenir, toutes les femmes RH:-1 devraient pouvoir bénéficier de ce test, ce qui permettrait de mieux cibler la population à risque et ainsi de limiter le nombre de femmes à traiter et de ce fait réduire le coût de la prophylaxie.

## **PARTIE III : L'évaluation de l'atteinte fœtale – La prise en charge du fœtus et du nouveau-né**

Lorsque la mère est immunisée vis-à-vis d'un Ag érythrocytaire de son fœtus, une surveillance accrue de l'état fœtal doit être réalisée pour une prise en charge précoce.

### **1- Évaluation de l'atteinte du fœtus**

L'évaluation de l'atteinte comporte une évaluation de la sévérité de l'anémie et une évaluation de l'état général du fœtus.

#### **1-1- Évaluation de l'anémie**

L'anémie est le premier symptôme de la MHNN. Plus vite l'anémie sera contrôlée, moins grave sera l'atteinte fœtale représentée par l'anasarque fœto-placentaire.

L'anémie est évaluée sur le taux d'hémoglobine fœtale.

##### **1-1-1- Le taux d'hémoglobine et la cordocentèse**

La cordocentèse est le prélèvement de sang fœtal par ponction directe du cordon ombilical. Elle permet l'analyse directe du sang fœtal et la détermination précise du taux d'hémoglobine en dehors de toute contamination de l'échantillon par du sang maternel. La cordocentèse est réalisée à partir de la 18<sup>e</sup> SA et jusqu'au terme de la grossesse. Toutefois, les risques liés à l'abord vasculaire du fœtus oblige la limitation de son utilisation aux situations

d'hémolyse sévère. En effet, la cordocentèse comprend deux risques majeurs : la morbidité fœtale estimée entre 0,8 et 3,1% et la réactivation de l'immunisation chez la mère (35, 51).

### *1-1-2- Bilirubinamnie et indice de Liley*

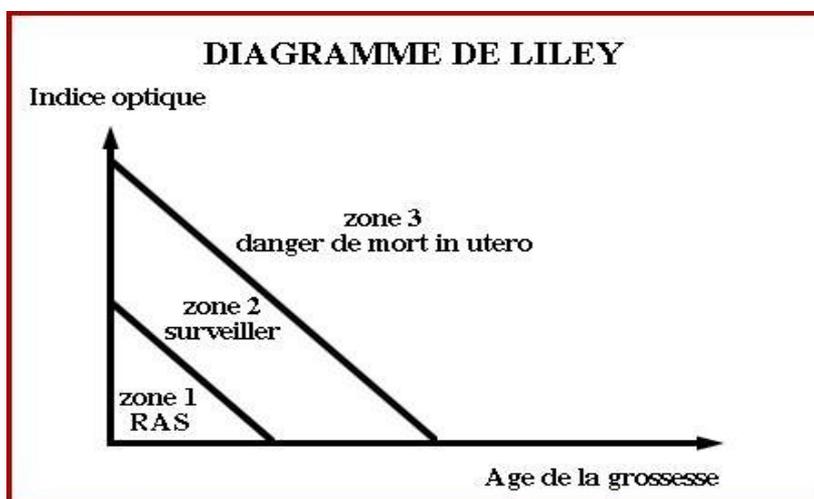
En 1956, D.C. BEVIS montra qu'il était possible de mesurer la concentration de bilirubine dans le liquide amniotique avec une technique spectrophotométrique. La gravité de la MHNN étant directement liée à la concentration de la bilirubine dans le sang, l'amniocentèse, est entrée dès lors dans le protocole de détection de la gravité de cette maladie (1).

Le dosage de la bilirubine est réalisé à la longueur d'onde de 450 nm. Cependant, il faut savoir que la bilirubinamnie est plus liée à l'intensité de l'anémie qu'à sa sévérité. Ainsi une bilirubinamnie élevée peut être due à une hémolyse intense mais récente donc sans anémie importante, alors qu'une anémie sévère liée à une hémolyse chronique peut entraîner une bilirubinamnie faible. Le dosage est réalisé dès la 24<sup>ème</sup> SA et jusqu'au terme de la grossesse. L'indice optique obtenu à 450 nm est ensuite reporté sur le diagramme de Liley (**Figure 23**).

En fonction du nombre de semaines de gestation, on distingue 3 zones sur le diagramme de Liley qui déterminent le comportement à tenir :

- la **zone 1** correspondant à l'absence d'anémie fœtale ;
- la **zone 2** correspondant à une absence d'anémie sévère dans la partie inférieure du diagramme et à une anémie présente mais rarement sévère dans la partie supérieure. Dans cette zone, une surveillance rapprochée échographique et biologique sera instaurée. Dans certains cas se situant dans la partie supérieure de la zone et si le fœtus est mature, l'extraction de ce dernier pourra être envisagée.
- la **zone 3** correspondant à une anémie sévère avec risque d'atteinte majeure et de mort in utero en l'absence de traitement. Si le fœtus n'est pas mature, il sera recommandé de réaliser une à plusieurs transfusions. Si le fœtus est mature, l'accouchement prématuré sera envisagé.

(77, 78)



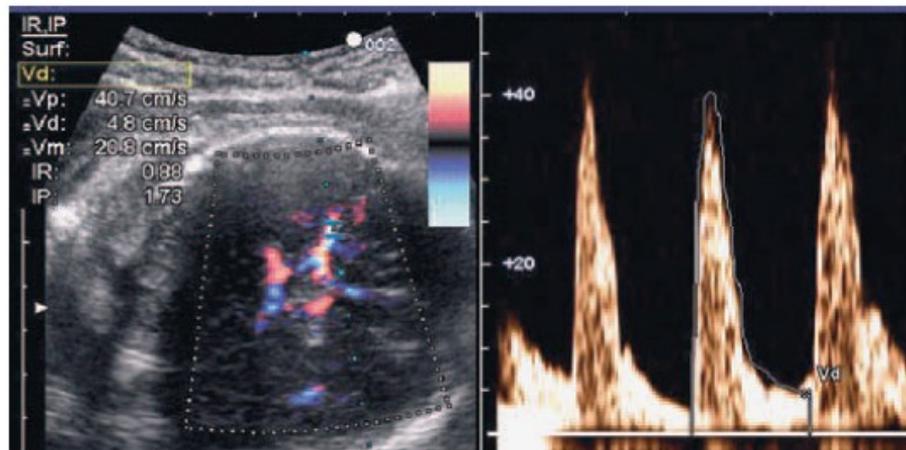
**Figure 23 :** Diagramme de LILEY

Cette pratique est presque abandonnée au profit de la surveillance par le doppler du pic systolique de vélocité de l'artère cérébrale moyenne.

### 1-1-3- Doppler cérébral

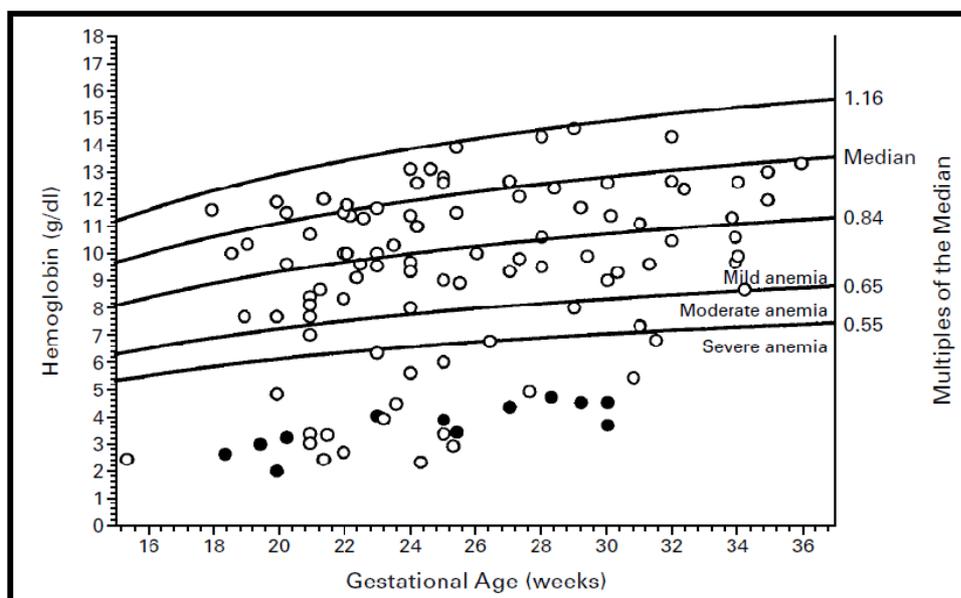
Une nouvelle technique pour évaluer le degré d'anémie du fœtus a vu le jour ces dernières années. Contrairement aux autres méthodes, celle-ci est non invasive donc sans risque pour la mère et le fœtus et elle est également très fiable.

Il a été constaté que l'installation d'une anémie chez un fœtus se manifestait par une diminution de la viscosité sanguine et une augmentation du débit cardiaque fœtal. Pour quantifier ces variations et permettre le diagnostic d'une anémie, les scientifiques ont décidé d'analyser ces flux artériels grâce au doppler. C'est l'artère moyenne cérébrale (AMC) qui a été retenue pour étudier ces flux car elle est facile d'accès et il existe une faible variabilité dans les mesures obtenues par différentes équipes. Le paramètre utilisé pour évaluer le degré d'anémie est le pic systolique cérébral de l'artère moyenne cérébrale (PSC-AMC) qui peut être mesuré entre la 16<sup>ème</sup> SA et la 35<sup>ème</sup> SA (**figure 24**) (35, 79).



**Figure 24 :** Mesure du pic de vitesse systolique au niveau de l'artère cérébrale moyenne

La valeur du PSC-AMC obtenue est ensuite exprimée par rapport à une valeur médiane de la population du même âge gestationnel donné par les références publiées. On obtient le MoM (multiple of median) du fœtus (35, 80). La **figure 25** montre le degré de l'anémie en fonction de la valeur du MoM et permet de déterminer la conduite à tenir.



**Figure 25 :** Degré de l'anémie en fonction de la valeur du MoM

Selon l'étude de G. MARI et ses collaborateurs, cet examen peut aussi être utilisé pour déterminer le risque de réapparition d'une anémie fœtale après transfusion in utero (81).

## 1-2- Évaluation de l'état général

La surveillance de l'état général du fœtus est une étape importante pour permettre la détection le plus précocement possible de symptômes liés à l'allo-immunisation fœto-maternelle.

### 1-2-1- L'échographie

Lors d'une grossesse compliquée par une allo-immunisation, la surveillance échographique doit être systématique. Elle doit être réalisée précocement au cours de la grossesse et répétée régulièrement. En dehors de la détermination précise du terme de la grossesse, de l'étude de la morphologie fœtale et de la surveillance de la bonne croissance fœtale, cet examen permet de dépister précocement les signes d'un état d'anasarque.

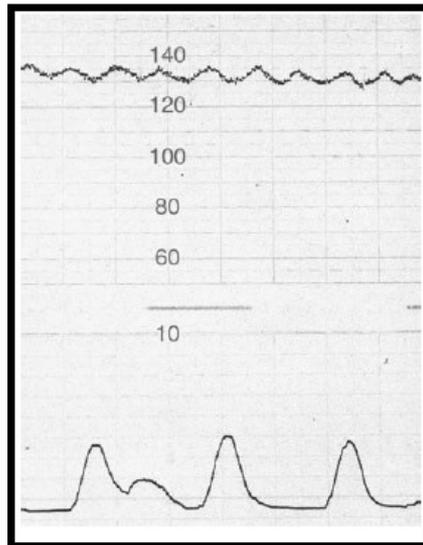
Le syndrome précoce de décompensation est caractérisé par la présence d'au moins l'un des signes suivants :

- anses intestinales anormalement échogènes
- visualisation de la paroi intestinale
- hépatomégalie
- œdème cutané au niveau du crâne et des membres
- ascite débutante
- discret épanchement péricardique
- excès modéré de liquide amniotique
- augmentation de l'épaisseur placentaire.

La présence de ces signes constitue une preuve de l'anémie fœtale avec un taux d'hémoglobine inférieur à 8g/dL. Lorsque ce taux est inférieur à 5g/dL, on est en présence d'un anasarque. L'échographie manque de sensibilité. Tout signe doit être pris en considération, et en fonction de la situation (l'importance de l'immunisation de la mère par exemple), les examens devront être rapprochés (51).

### *1-2-2- Rythme cardiaque*

L'étude du rythme cardiaque du fœtus n'est nécessaire que lorsqu'il existe des signes d'atteinte de ce dernier. L'enregistrement du rythme cardiaque fœtal peut être réalisé dès la 24-25<sup>e</sup> SA. Selon la gravité de l'état du fœtus, ces enregistrements seront répétés plusieurs fois par jour. La présence d'un rythme micro-oscillant, d'une tachycardie ou d'un rythme sinusoïdal (**figure 26**) est signe d'une souffrance fœtale et impose le plus souvent l'accouchement prématuré de l'enfant par césarienne (35, 68).



**Figure 26 :** Tracé d'un rythme sinusoïdal chez un fœtus présentant une anémie sévère

## **2- Prise en charge du fœtus anémié**

La prise en charge du fœtus anémié comporte deux axes :

- les transfusions sanguines avant la 30<sup>e</sup> SA pour limiter les conséquences de l'anémie chez le fœtus qui n'est pas viable ;
- l'accouchement prématuré après la 30<sup>e</sup> SA soit par les voies naturelles soit par césarienne.

### **2-1- Les transfusions**

Les transfusions ont pour but de corriger les effets de la maladie hémolytique en apportant au fœtus in utero des GR compatibles. Elles sont réalisées grâce à une ponction de la veine ombilicale sous contrôle échographique.

Le sang transfusé doit répondre à un certain nombre d'exigences :

- les GR doivent être du groupe O RH:-1 et de phénotype identique à celui de la mère pour les systèmes antigéniques les plus immunogènes ;
- les concentrés de globules rouges (CGR) doivent être frais (de moins de 7 jours) et irradiés avec un hémocrite le plus élevé possible pour limiter le volume à transfuser sans qu'il dépasse de 4 fois l'hémocrite initial afin d'éviter tout risque de décompensation cardiaque dû à une forte augmentation de la viscosité sanguine ;
- les CGR doivent être testés pour les virus de l'hépatite B et C (VHB et VHC), le cytomégalovirus (CMV), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et la syphilis.

La première transfusion peut être réalisée au plus tôt à partir de la 18-20<sup>ème</sup> SA. Le rythme de ces transfusions est fonction du taux d'hémoglobine initial et de celui atteint en fin de transfusion ainsi que des résultats du doppler au niveau de l'artère cérébrale. Ces transfusions sont réalisées en moyenne toutes les 2 à 4 semaines jusqu'à la décision de faire naître l'enfant.

Ils existent deux autres méthodes de transfusion si l'abord veineux était difficile, qui sont l'abord intravasculaire ou la voie intrapéritonéale. Cependant ces méthodes comportent des risques vasculaires, obstétricaux, infectieux et d'immunisation chez la mère. Elles ne sont indiquées que lors d'anémie sévère ou d'anasarque fœtal (51, 52, 68).

## 2-2- L'accouchement prématuré

Cet accouchement est indiqué pour les patientes dont le fœtus est peu atteint au début du 8<sup>ème</sup> mois, mais menacé si la grossesse se poursuit et pour les patientes dont le fœtus a bénéficié de transfusions in utero. Il ne peut être envisagé que lorsque les fonctions pulmonaires du fœtus sont estimées suffisamment matures.

En cas de souffrance fœtale ou d'échec de la transfusion fœtale, l'accouchement prématuré est réalisé avant la 34<sup>ème</sup> SA. Il est toutefois recommandé d'attendre au moins la 30<sup>ème</sup> SA afin de réduire les risques de mortalité et morbidité post-natales. Si le principe d'extraction fœtale prématurée est envisagé, il est nécessaire de prévoir une corticothérapie afin de permettre la maturation pulmonaire.

Après la 34<sup>ème</sup> SA, si le risque fœtal est élevé, une naissance prématurée peut être facilement envisagée. Le mode de naissance (déclenchement ou césarienne) sera fonction du degré de gravité supposé de l'allo-immunisation, des signes de mauvaise tolérance fœtale et des conditions cervicales. Un accouchement par césarienne est souvent envisagé lorsqu'il y a souffrance fœtale aiguë par anémie majeure ou lorsqu'il y a des complications liées aux gestes invasifs (51, 52).

L'accouchement prématuré doit absolument avoir lieu dans un centre spécialisé avec un niveau de soins adapté à la pathologie de l'enfant.

### **3- Prise en charge du nouveau-né en cas d'ictère**

La complication majeure d'un ictère à bilirubine libre est une atteinte des noyaux gris centraux cérébraux par la bilirubine. Afin d'éviter cette complication, une surveillance régulière et particulière devant une hyperbilirubinémie doit être mise en place. L'évaluation de l'intensité de l'ictère est d'abord visuelle :

- si le visage de l'enfant est jaune, la bilirubinémie est estimée entre 51 et 137  $\mu\text{mol/L}$  ;
- si le visage et le tronc de l'enfant sont jaunes, la bilirubinémie se situe entre 154 et 325  $\mu\text{mol/L}$  ;
- si le visage, le tronc et les jambes sont jaunes, on estime la bilirubinémie supérieure à 325  $\mu\text{mol/L}$  ;

Cependant, l'évaluation visuelle peut sous-estimer l'intensité de l'ictère. On utilise alors la bilirubinométrie transcutanée, technique facile d'utilisation et non traumatisante. Si la courbe de la bilirubine est fortement élevée, un dosage sanguin devra être réalisé.

Un ictère ne peut être traité qu'après la naissance de l'enfant. La photothérapie, technique à caractère non invasif et de mise en œuvre relativement simple, est le traitement de choix en cas d'ictère modéré. Si l'ictère est trop sévère et que la photothérapie ne suffit pas, on peut être amené à réaliser une exsanguino-transfusion. Le **tableau VIII** montre les indications de la photothérapie et de l'exsanguino-transfusion .

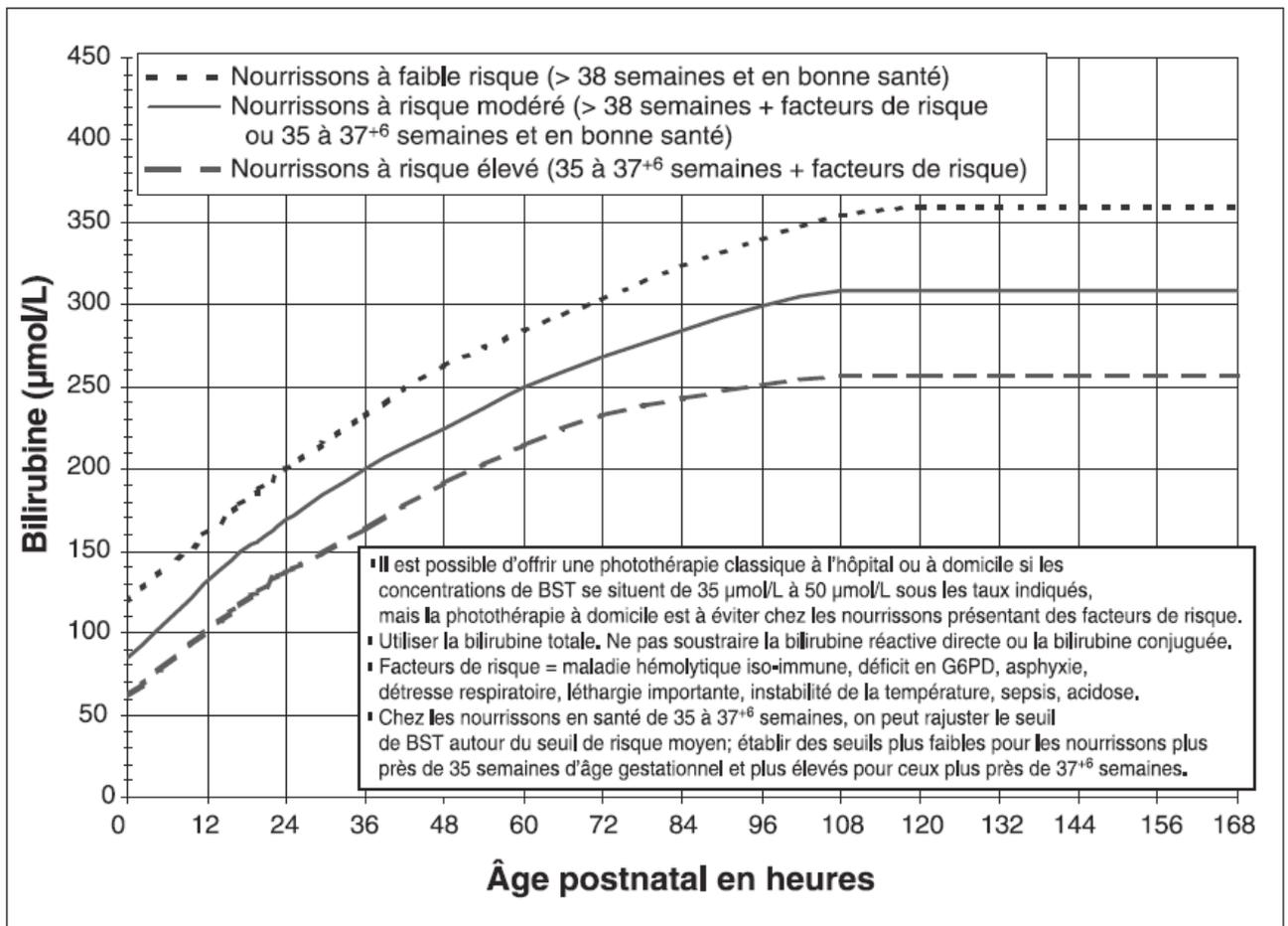
**Tableau VIII :** Choix du traitement selon le taux de bilirubine totale

	Photothérapie	Exsanguino-transfusion
Nouveau-né à terme > 2 500g sain	320 - 350 $\mu\text{mol/L}$	400 - 430 $\mu\text{mol/L}$
Nouveau-né à terme > 2 500g malade ou avec hémolyse	230 - 300 $\mu\text{mol/L}$	350 - 370 $\mu\text{mol/L}$
Prématuré de 35 ou 36 semaines ou nouveau-né à terme < 2 500g	200 - 260 $\mu\text{mol/L}$	270 - 320 $\mu\text{mol/L}$

Depuis quelques années, des traitements médicamenteux ont été mis au point. Ces molécules s'ajoutent à l'arsenal thérapeutique déjà existant pour lutter contre l'ictère (83, 84).

### 3-1- La photothérapie

Tout ictère débutant avant 24 heures de vie doit être considéré comme pathologique et donc traité. Au-delà de 24 heures, l'indication dépendra de l'intensité de l'ictère et de son évolution en 8 heures. Les indications de la photothérapie sont fonction du taux de bilirubine totale, de l'âge de l'enfant après sa naissance et du nombre de semaines de gestation (**figure 27**).



**Figure 27 :** Indication de la photothérapie chez les nourrissons hospitalisés de 35 semaines ou plus

La technique a pour but de maintenir le taux de la bilirubine libre en dessous du seuil qui nécessiterait une exsanguino-transfusion. Elle agit en rendant la bilirubine libre hydrosoluble par photo-isomérisation. Cette modification des propriétés chimiques de la bilirubine va prévenir sa pénétration dans les cellules cérébrales et favoriser son élimination rénale.

Il existe plusieurs types de photothérapie selon l'intensité du rayonnement et la longueur d'onde utilisées (la standard à fibre optique Bilibed® ou l'intensive berceau 360° de Mediprema®). L'efficacité de la photothérapie est fonction de l'intensité de la lumière, la distance entre la source de lumière et l'enfant, et la surface corporelle atteinte par la photothérapie. C'est la photothérapie à la lumière bleue qui est la plus efficace car elle est

absorbée au maximum par le pigment jaune. Il est préférable d'utiliser la photothérapie discontinue, aussi efficace que la continue, mais moins perturbante pour l'enfant et favorisant le contact avec les parents.

Pour une séance de photothérapie, il faut respecter les points suivants :

- l'enfant ne doit être vêtu que d'une couche et la plus petite possible ;
- l'enfant doit porter des lunettes spéciales opaques maintenues par un surgifix afin de protéger ses yeux ;
- la mise en marche de l'appareil doit être faite à l'intensité prescrite qui est fonction du poids de l'enfant et de l'intensité de l'ictère ;
- assurer une variation régulière des positions de l'enfant afin d'exposer l'ensemble de son corps de manière homogène.

Afin d'éviter toutes éventuelles complications, il faut :

- veiller à une bonne hydratation de l'enfant pour palier à une éventuelle déshydratation (augmenter la ration hydrique de 15 à 20%) ;
- mettre des gouttes de sérum physiologique dans les yeux de l'enfant plusieurs fois par jour pour éviter tout risque de déshydratation de la cornée ou de conjonctivites ;
- surveiller régulièrement la température de l'enfant pour prévenir une éventuelle hyperthermie, surveiller la fréquence cardiaque et respiratoire 4 fois par jour ;
- faire une bilirubinémie régulièrement afin de constater l'efficacité du traitement (toutes les 8 à 12 heures) sachant que la bilirubine transcutanée ne peut pas être utilisée pendant et après une photothérapie ;

- surveiller le poids de l'enfant ;
- surveiller le nombre et l'aspect des selles ainsi que la couleur des urines (82, 86).

Lorsque le taux de bilirubinémie atteint le seuil critique puis le dépasse, une exsanguino-transfusion doit être pratiquée.

### 3-2- L'exsanguino-transfusion

Cette technique a 4 objectifs :

- éliminer les globules incompatibles non encore détruits par les Ac maternels, diminuant ainsi l'hémolyse ;
- apporter des GR compatibles pour corriger l'anémie ;
- éliminer une grande partie des Ac maternels passés dans la circulation fœtale ;
- éliminer la bilirubine qui est le produit de dégradation de l'hémoglobine résultant de l'hémolyse et ainsi éviter toutes les complications liées à une hyperbilirubinémie.

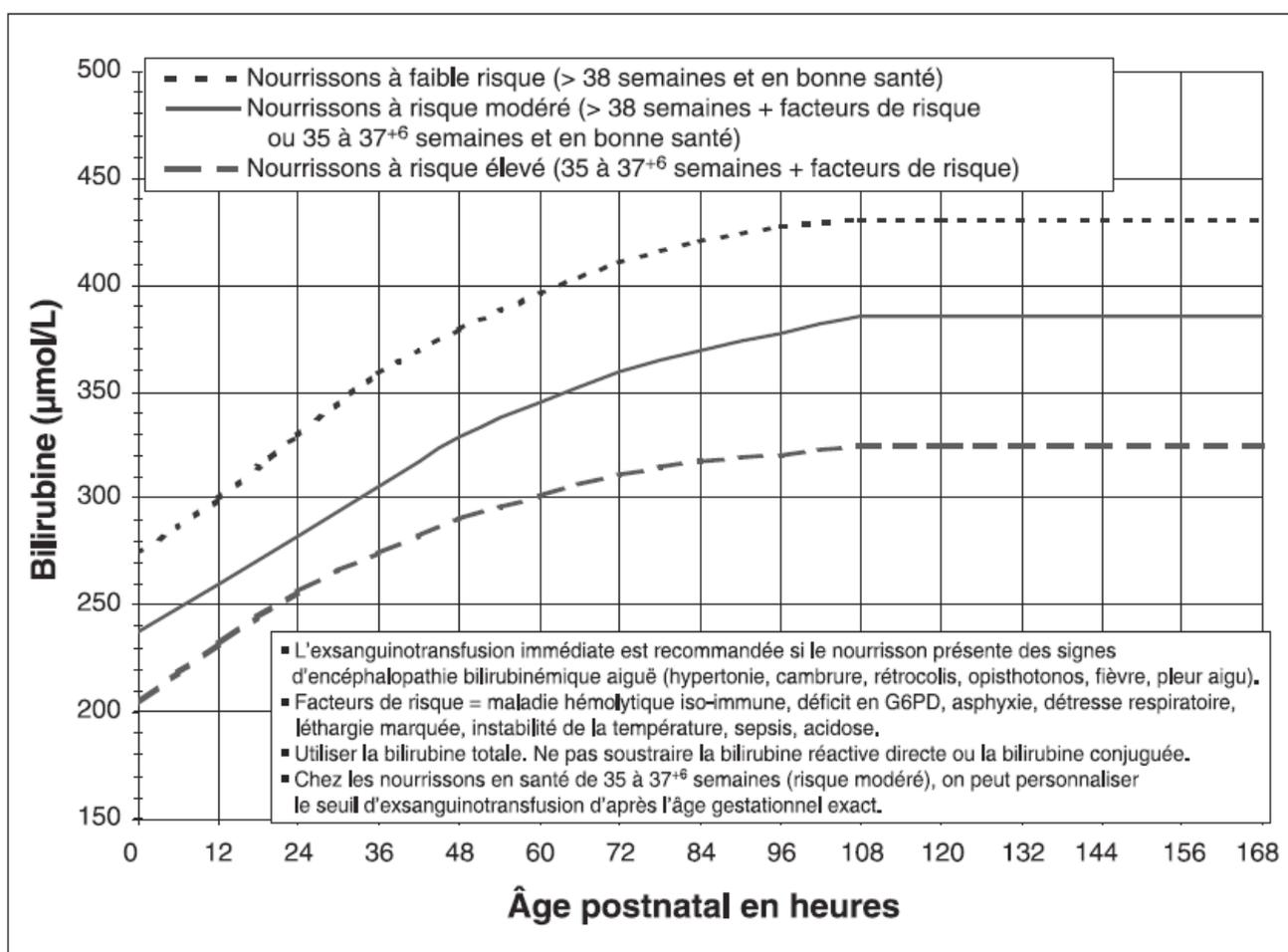
C'est une intervention visant à remplacer le sang de l'enfant par du sang provenant de plusieurs donneurs par soustractions et injections successives de petits volumes dans un vaisseau (51, 87).

C'est en 1946 que H. WALLERSTEIN décrit pour la première fois l'exsanguino-transfusion du nouveau-né par voie ombilicale (88). Il y a quelques années, les exsanguino-transfusions étaient réalisées avec du sang total. Cependant, l'hématocrite de cette préparation étant parfois trop faible pour des enfants en situation d'hémolyse et la nécessité d'épargner les produits sanguins ont eu raison de cette pratique. Depuis les années 90, c'est du sang reconstitué qui est utilisé pour l'exsanguino-transfusion et qui provient d'un concentré de globules rouges (CGR) et d'un plasma frais congelé (PFC).

Les exsanguino-transfusions sont réalisées généralement en 1 à 2 heures par la technique usuelle d'échanges successifs isovolumiques de 5 mL/kg par voie veineuse ombilicale sous surveillance cardio-respiratoire. Le volume échangé est habituellement le double de la masse sanguine (87).

L'exsanguino-transfusion comporte cependant de nombreux risques tels que hypocalcémie, hyperkaliémie, thrombopénie, hypervolémie, infections dues aux produits dérivés du sang, ... Elle n'est utilisée que pour des incompatibilités Rhésus sévères où elle demeure la seule thérapie après échec de la photothérapie et la seule façon de rétablir rapidement une normovolémie avec un taux d'hématocrite correct (51).

Les indications de l'exsanguino-transfusion sont présentées dans la **figure 28**.



**Figure 28 :** Indication de l'exsanguino-transfusion chez les nourrissons hospitalisés de 35 semaines ou plus

### 3-3- Les traitements médicamenteux

Un traitement pharmacologique peut être associé aux précédents si nécessaire. Il consiste à administrer des agents chimiques visant à augmenter l'élimination de la bilirubine ou à diminuer sa synthèse.

#### 3-3-1- Les inducteurs de la glycuronyl-transférase

La glycuronyl-transférase est une enzyme détoxifiante présente au niveau du tissu hépatique. Sa principale fonction est la transformation de la bilirubine libre en bilirubine conjuguée qui va favoriser son élimination.

Les molécules utilisées pour augmenter l'élimination de la bilirubine font partie de la classe des inducteurs de la glycuronyl-transférase et augmentent le flux biliaire.

Le phénobarbital (GARDENAL®) favorise la synthèse des protéines Y et Z ainsi que la synthèse de l'enzyme glycuronyl-transférase. Les protéines Y et Z assurent le transport de la bilirubine libre à l'intérieur de l'hépatocyte. Cette molécule a été utilisée pendant quelques années mais est actuellement abandonnée dans cette indication pour ses nombreux effets indésirables.

Le clofibrate (LIPAVLON®) favorise la synthèse de la glycuronyl-transférase. Les résultats obtenus avec cette molécule permettaient de diviser par deux les indications de la photothérapie. Mais la molécule a été récemment retirée du marché et n'est plus fabriquée pour cette indication (89, 90).

### 3-3-2- Les inhibiteurs de l'hème-oxygénase

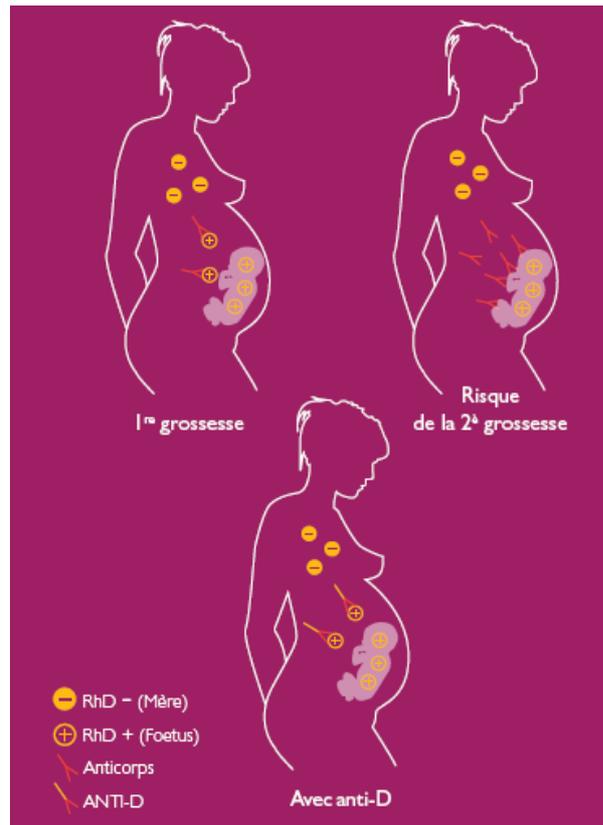
L'hème oxygénase est une enzyme qui catalyse la dégradation de l'hème pour donner une molécule de biliverdine, de fer et de monoxyde de carbone. La molécule de biliverdine sera transformée par la biliverdine réductase en bilirubine. Afin de limiter la synthèse de bilirubine, on utilise des molécules dites inhibiteurs de l'hème-oxygénase. Les métalloporphyrines font partie de cette classe de molécules. Actuellement le traitement systématique de l'hyperbilirubinémie néonatale non conjuguée par métalloporphyrine n'est pas recommandé car aucune preuve en faveur du bénéfice de ce traitement dans l'ictère nucléaire néonatal n'a été rapportée à ce jour (91).

## **PARTIE IV : La prévention de l'allo-immunisation anti-D (anti-RH1) fœto-maternelle**

La prévention est essentielle dans la prise en charge de l'allo-immunisation fœto-maternelle. Elle permet de limiter l'immunisation de la mère par les Ac du fœtus et ainsi d'éviter les risques de complications comme l'ictère néonatal ou l'anasarque. Depuis son instauration, le nombre de cas de MHNN a diminué de manière très significative. En France, cette prévention est pratiquée chez toutes les femmes déterminées RH:-1. Cependant, pour des raisons de sécurité sanitaire et d'économie, les autorités souhaitent pour l'avenir une prévention ciblée c'est-à-dire juste pour les femmes RH:-1 enceintes d'un fœtus RH:1.

### **1- Prophylaxie pendant la grossesse**

La prophylaxie anti-D consiste en l'injection d'IgG anti-D par voie intra-musculaire (IM) ou intraveineuse (IV) au cours de la grossesse. Les IgG anti-D injectées vont se lier aux antigènes D présents à la surface des GR fœtaux qui se trouvent dans la circulation maternelle. La formation du complexe Ag-Ig anti-D va provoquer la destruction des GR fœtaux et ainsi éviter l'immunisation (**Figure 29**).



**Figure 29 :** Mécanisme d'action de la prophylaxie anti-D afin d'éviter l'immunisation de la mère par les globules rouges du fœtus

L'efficacité de cette prévention dépend de la posologie d'Ig anti-D injectée et de la durée entre l'événement potentiellement immunisant et l'immunoprophylaxie.

En 2005, le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF) a publié les recommandations pour la pratique de la prévention de l'allo-immunisation anti-D (anti-RH1) fœto-maternelle (34). Nous présentons ci-dessous ces recommandations.

## 1-1- La prophylaxie au 1<sup>er</sup> trimestre de la grossesse

Au premier trimestre de grossesse, une injection d'IgG anti-D sera envisagée dans les situations à risque modéré de passage des hématies fœtales dans la circulation maternelle. Ces circonstances sont les suivantes :

- fausse-couche spontanée ;
- interruption volontaire ou médicamenteuse de grossesse ;
- grossesse extra-utérine ;
- grossesse molaire ;
- métrorragies ;
- choriocentèse ou amniocentèse ;
- réduction embryonnaire ;
- traumatisme abdominal ;
- cerclage cervical.

La posologie recommandée est une injection de 200 µg d'IgG anti-D par voie IM ou IV sans nécessité de réaliser un test de kleihauer ou une RAI auparavant (34).

## 1-2- La prophylaxie au 2<sup>nd</sup> trimestre de la grossesse

Pendant le second trimestre de grossesse, il est recommandé de rechercher la présence d'hématies fœtales dans la circulation maternelle en cas de facteurs de risque tels que :

- des métrorragies, un cerclage du col utérin, ou une menace d'accouchement prématuré qui sont considérés à risque modéré de passage d'hématies fœtales ;
- une interruption médicale de grossesse, une fausse-couche spontanée tardive, une mort fœtale in utéro, un traumatisme abdominal ou pelvien, une intervention chirurgicale abdominale ou pelvienne, un prélèvement ovulaire (par amniocentèse, cordocentèse, placentocentèse) et un accouchement qui comportent un risque important de passage d'hématies fœtales.

La quantité d'Ig injectée sera fonction du résultat obtenu au test de Kleihauer (**tableau IX**) (34).

En ce qui concerne la voie d'administration, la voie IV sera toujours préférée en cas de prophylaxie post-exposition.

En cas de nouvelle circonstance anténatale à risque, on pourra s'abstenir de renouveler l'injection dans un délai qui sera fonction de la dose antérieurement injectée (9 semaines pour 200 µg et 12 semaines pour 300 µg). Cette abstention s'applique si le risque de passage d'hématies fœtales est modéré, ou si le test de Kleihauer est négatif en cas de situation à risque important de passage d'hématies fœtales.

**Tableau IX :** Adaptation de la dose d'Ig anti-D en fonction du résultat du test de Kleihauer

KLEIHAUER (HF/10000 HA)	Dose de 100 µg*		Dose de 200 µg*		Dose de 300 µg		Voie d'administration
	Doses	µg	Doses	µg	Doses	µg	
0-4	1	100	1	200	1	300	<b>IV directe</b>
5-24	2	200	1	200	1	300	
25-44	3	300	2	400	1	300	
45-64	4	400	2	400	2	600	<b>PERFUSION</b> sur 4 heures Dilué dans 250 ml de NaCl à 9 pour mille
65-84	5	500	3	600	2	600	
85-104	6	600	3	600	2	600	
105-124	7	700	4	800	3	900	
125-144	8	800	4	800	3	900	
145-164	9	900	5	1000	3	900	
165-184	10	1000	5	1000	4	1200	
185-204	11	1100	6	1200	4	1200	
205-224	12	1200	6	1200	4	1200	
225-244	13	1300	7	1400	5	1500	
245-264	14	1400	7	1400	5	1500	
265-284	15	1500	8	1600	5	1500	
285-304	16	1600	8	1600	6	1800	

\* La dose la plus basse actuellement commercialisée en France est de 200 µg. Dans les cas où une dose de 100 µg serait suffisante, il est recommandé de ne pas fractionner les doses.

HF : hématies fœtales ; HA : hématies adultes

### 1-3- La prophylaxie au 3<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse

A partir de la 27<sup>ème</sup> SA, une RAI est nécessaire pour déterminer la démarche à suivre.

Si la RAI ne met pas en évidence d'anticorps anti-D, une injection systématique d'Ig anti-D sera réalisée à la dose de 300 µg par voie IV ou IM à la 28<sup>ème</sup> +/- 1 SA. Cette injection confèrera une protection à la mère pendant 12 semaines soit jusqu'à la fin de la grossesse. Après l'injection des immunoglobulines anti-D, la RAI permettra la détection d'éventuels nouveaux allo-anticorps. Son interprétation devra tenir compte de l'injection d'immunoglobulines anti-D antérieure.

En cas de facteur de risque précédemment cité, il convient de rechercher les hématies fœtales dans la circulation maternelle par le test de Kleihauer et selon les résultats obtenus, d'injecter une dose complémentaire d'Ig anti-D.

Si la patiente n'a pas eu d'injection à la 28<sup>ème</sup> SA, il faudra réaliser une RAI pendant le 8<sup>ème</sup> mois et adapter la prophylaxie comme au second trimestre de grossesse (34).

#### 1-4- La prophylaxie lors de l'accouchement

Le phénotype RhD (RH1) de l'enfant doit être précisé rapidement. Ce test est fait sur le sang du cordon ombilical.

Si le phénotype de l'enfant est RH:1, un test de Kleibauer devra être effectué sur un échantillon de sang maternel prélevé au plus tard 30 minutes après la délivrance. La mère se verra alors proposer une prophylaxie anti-D et la posologie ainsi que la voie d'administration seront adaptées en fonction du test de Kleibauer (**tableau IX**).

En principe, l'injection doit être réalisée dans les 72 heures ; cependant dans le cas où l'injection n'aurait pas été faite pendant cette période, elle pourra être effectuée jusqu'à 30 jours après l'accouchement (34).

Il est également recommandé de réaliser une RAI 6 mois plus tard pour rechercher l'apparition d'éventuels Ac anti-érythrocytaires.

## 1-5- Le récapitulatif de la prophylaxie pendant la grossesse

La prophylaxie de la MHNN au cours de la grossesse appliquée actuellement en France est résumée dans le tableau suivant.

**Tableau X :** Prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D en France

Adapté d'après d'Ercole C., 2011

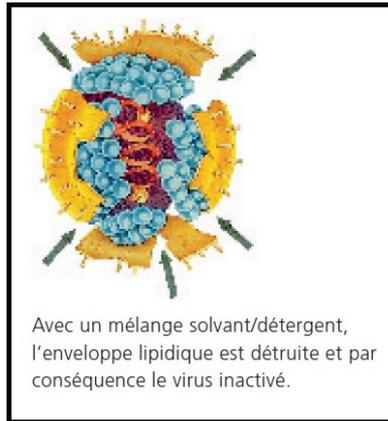
< 15 SA	15 à 27 SA	27 à 29 SA	29 SA à accouchement	Accouchement
Prévention ciblée : - FCS, IVG, GEU, IM - Métrorragies, môle, réduction embryonnaire, cerclage, traumatisme abdominal - Ponction amniotique, biopsie de trophoblaste	Prévention ciblée : - Risque élevé d'HFM : FC tardive, IMG, MIU, traumatisme abdominopelvien, cordocentèse - Risque faible d'HFM : amniocentèse simple, métrorragies, cerclage tardif	Prévention systématique	Prévention ciblée : abstention si 300 µg (28 SA) SAUF SI risque élevé d'HFM (version, MIU, traumatisme abdominopelvien, ponction cordon ou organe fœtal)	Si nouveau-né Rh D positif : ⇒ Injection d'IgRh Abstention possible si : - < 3 semaines après IgRh - ET Kleihauer négatif - ET anti-D > 6 ng/ml
Kleihauer : non	Kleihauer : oui si HFM↑↑	Kleihauer : non	Kleihauer : oui si HFM↑↑	Kleihauer : oui
Rhophylac® 200 IV dans les 72 h	Rhophylac® 200 IV dans les 72 h	Rhophylac®300 IM ou IV	Rhophylac®200 IV dans les 72h	Rhophylac®200 IV dans les 72 h
Avant toute injection d'IgRh, prélever une RAI (sans attendre le résultat) pour s'assurer a posteriori de l'absence d'immunisation				
Après toute injection d'IgRh, assurer la traçabilité (dossier patiente ET pharmacie ; 2 étiquettes dans la boîte)				
Calendrier des RAI : - Premier trimestre (avec groupe sanguin si non fait) ; - 6 <sup>e</sup> mois (peut correspondre à la RAI avant l'injection systématique à 28 SA) ; - 8 <sup>e</sup> mois seulement si Rhophylac® 300 non fait à 28 SA ; - 4 dernières semaines : sécurité transfusionnelle				
FCS : fausse couche spontanée ; IVG : interruption volontaire de grossesse ; GEU : grossesse extra-utérine ; IMG : interruption médicale de grossesse ; HFM : hémorragie fœtomaternelle ; HFM↑↑ : risque élevé d'HFM ; MIU : mort in utero.				

## 2- L'anti-D utilisée en France : RHOPHYLAC®

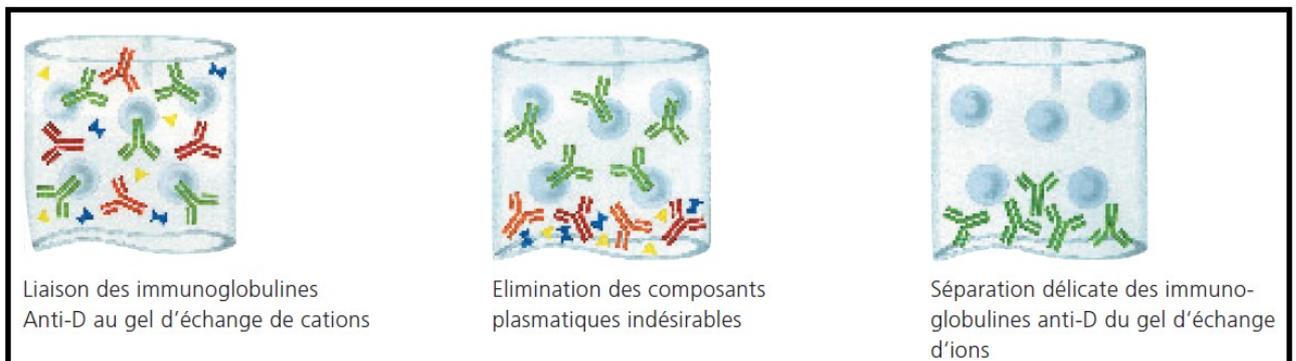
Actuellement, les Ig commercialisées sont d'origine humaine. Elles proviennent de donneurs sains d'Amérique du Nord, hyperimmunisés et rémunérés. Ce médicament présente donc des inconvénients : d'une part, un risque de contamination par le sang et d'autre part, des ruptures de stock potentielles et peu prévisibles. Le laboratoire CSL Behring qui produit le Rhophylac® met tout en œuvre pour diminuer au maximum le risque de contamination.

Dans ce but, les mesures reposent sur :

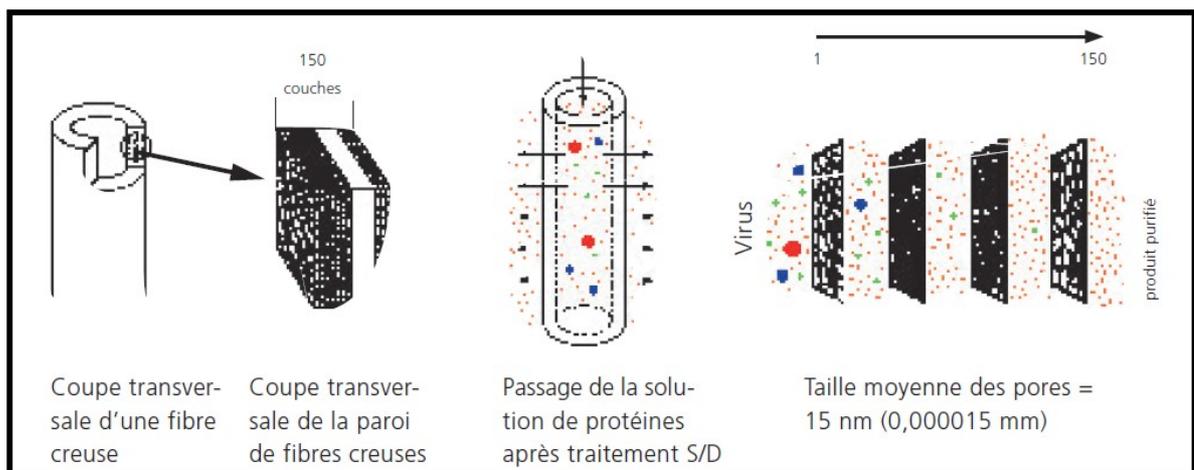
- *la sélection des donneurs, sévère, afin d'éviter le prélèvement de sang contaminé ;*
- *le contrôle du don avec dépistage de l'antigène HBs, des anticorps anti-VIH 1+2, et anti-VHC ainsi qu'un dosage de l'Alanine Amino Transférase ou Glutamate Pyruvate transaminase (ALAT) ;*
- *le dépistage par PCR des virus enveloppés (VIH, VHB, VHC) et des virus sans enveloppe (HAV, parvovirus B19) ;*
- *l'inactivation des virus potentiellement présents par traitement solvant/détergent : mélange de Triton® X-100 et de tri-nbutylphosphate pour les virus, sans effet sur l'activité du médicament (figure 30) ;*
- *l'élimination additionnelle des virus qui sont à cette étape inactivés sur colonne échangeuse d'ions en choisissant les conditions chromatographiques pour favoriser la fixation de l'IgG anti-D et faciliter l'élimination des composants plasmatiques indésirables, des solvants et détergents utilisés pour l'inactivation virale par lavage (figure 31) ;*
- *l'élimination des virus par nanofiltration (figure 32) ;*
- *enfin, un système d'assurance qualité qui certifie la régularité des méthodes de travail lors du prélèvement, du contrôle et du traitement des dons d'origine sanguine.*



**Figure 30 :** Inactivation des virus par traitement solvant/détergent



**Figure 31 :** Chromatographie échangeuse d'ions



**Figure 32 :** Principe de la nanofiltration

Même si le risque viral lié à l'utilisation de produits dérivés du sang existe, il reste extrêmement faible du fait des nombreux traitements d'élimination des virus appliqués.

Cependant, l'utilisation de tels produits nécessite une traçabilité. Chaque patiente recevant une injection de ce médicament devra être informée du risque et son dossier patient devra comporter le nom et le numéro de lot du produit qu'on lui a injecté.

Le Rhophylac® est commercialisé sous deux dosages : 200µg et 300 µg.



**Figure 33 :** Boîte de Rhophylac® 300 µg/2mL

Le médicament se conserve à une température comprise entre 2°C et 8°C. Il peut provoquer une douleur au point d'injection IM. Afin de limiter cet effet indésirable, il est préférable, si la dose requise dépasse 5 mL, de fractionner cette dose en des sites d'injection différents (95).

### **3- Les échecs de la prophylaxie**

La prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle a permis une diminution nette du nombre de cas de MHNN par l'antigène RH1. Cette prophylaxie a constitué une révolution dans la prise en charge des femmes enceintes RH:-1. Cependant, il reste un taux d'échec constant de 1 à 2% même dans les meilleures conditions d'application du protocole.

Ces échecs peuvent être liés à :

- *une dose insuffisante d'Ig anti-D injectée ;*
- *une injection trop tardive, dans la mesure du possible et si nécessaire, celle-ci devant être réalisée dans les 72 heures qui suivent l'accouchement ;*
- *une absence de prévention suite à une interruption volontaire de grossesse , un cerclage, une amniocentèse, un prélèvement de sang fœtal, une biopsie de trophoblaste, une fausse couche précoce ;*
- *une erreur transfusionnelle, et si tel est le cas, une injection de 20 µg d'Ig anti-D pour 1 mL de GR transfusés, le plus tôt possible, sera nécessaire ;*
- *une immunisation survenue sans facteur de risque identifié d'hémorragie fœto-maternelle, le plus souvent au cours du troisième trimestre de grossesse qui est un argument en faveur de l'association à la prévention systématique d'une prévention ciblée au début du troisième trimestre (34, 68).*

## **4- L'avenir de la prophylaxie Anti-D**

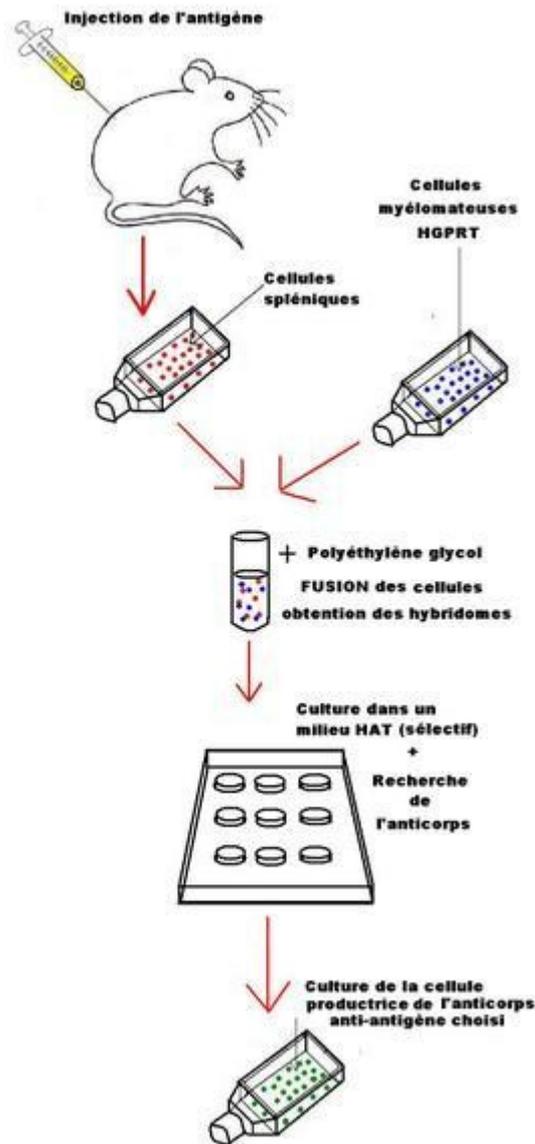
La prophylaxie anti-D par RHOPHYLAC® a révolutionné la prise en charge de l'allo-immunisation fœto-maternelle depuis les années 70. Cependant elle n'est pas dénuée de risques : infectieux d'une part, et rupture de stock intempestive d'autre part. Ce sont les raisons qui poussent les chercheurs à se tourner vers les innovations thérapeutiques que sont les anticorps polyclonaux et monoclonaux.

Les anticorps polyclonaux sont des molécules produites par des cellules B différentes. Ils reconnaissent différents épitopes d'un Ag donné, mais se lient à la même molécule cible. Ces Ac peuvent amplifier le signal de détection car ils sont plusieurs à se lier à la même molécule protéique.

Les anticorps monoclonaux sont produits par un clone unique de lymphocytes B, donc mono spécifiques c'est-à-dire reconnaissent un type unique de site antigénique et sont homogènes contrairement aux anticorps polyclonaux. La production des Ac in-vitro est difficile car les plasmocytes ont une faible durée de vie. In-vivo, la production de ces Ac est réalisée par l'injection chez un animal d'un Ag donné puis extraction des Ac produits dans le sang. Cette méthode est peu utilisée car très coûteuse avec un faible rendement. En 1975, César MILSTEIN et Georges KÖHLER élaborent la technique des hybridomes qui permet d'obtenir une grande quantité d'anticorps à faible coût (96).

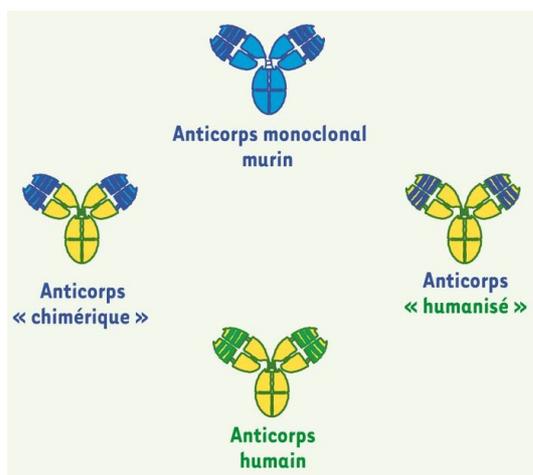
Cette technique comprend plusieurs étapes :

- d'abord, il faut injecter l'antigène d'intérêt chez une souris ;
- puis, il faut prélever, quelques semaines après l'injection, des cellules de la rate parmi lesquelles, se trouvent des plasmocytes sécrétant des Ac dirigés spécifiquement contre l'Ag choisi ;
- on fusionne ces plasmocytes avec des cellules de tumeur (cellules immortelles) grâce à l'addition de polyéthylène glycol (PEG) qui va induire la fusion membranaire et permettre ainsi d'obtenir des hybridomes qui ont la capacité de se multiplier plus rapidement et de se développer indéfiniment par rapport à des cellules normales ;
- ces cellules sont ensuite réparties dans des plaques multi-puits où chaque puits contient une cellule ;
- pour éliminer toutes les cellules non fusionnées, un milieu de culture sélectif (milieu de culture hypoxanthine aminoptérine thymidine ou HAT) est utilisé ;
- après deux semaines, les Ac des puits sont testés afin de déterminer s'ils sont bien dirigés contre l'Ag donné ;
- les cellules productrices sont repiquées et quelques clones cellulaires producteurs seront isolés (97).



**Figure 34 :** La technique des hybridomes

Après obtention d'un clone d'hybridome sécrétant un Ac spécifique, cet Ac sera étudié pour déterminer la classe des chaînes d'Ig, son affinité, ou l'épitope reconnu. Il est aussi possible de déterminer la séquence d'ADN du gène des Ig de ce clone afin de pouvoir le sous-cloner et de le modifier. Ainsi, on pourra produire des Ac chimériques (humain à 60% et murin à 40%) ou humanisés (humain à 90%).



**Figure 35 :** Principe de construction des anticorps chimériques et humanisés

Au cours des 30 dernières années, de nombreux anticorps monoclonaux anti-D ont été développés afin de remplacer les Ig polyclonales anti-D extraites du plasma humain. Pour cela, de nouvelles techniques de production ont vu le jour afin d'obtenir des molécules synthétiques les plus proches possibles des molécules naturelles (100). Certains de ces anticorps monoclonaux ont été évalués dans des études cliniques. Cependant, ils ne permettent pas une destruction et une élimination satisfaisante des hématies RH:1 (101).

Le laboratoire suédois Biovitrum et le laboratoire danois Symphogen travaillent en collaboration sur l'étude d'un anticorps polyclonal Sym001. Cet anticorps est développé dans le but de devenir une alternative au traitement du purpura thrombocytopénique idiopathique (PTI) et de la prévention de la MHNN. En Mars 2007, Sym001 est entré en phase I des essais cliniques. Les résultats obtenus ont montré que Sym001 était une molécule sûre et bien tolérée. La phase II des essais cliniques a été lancée au 1er semestre 2008 mais seulement pour l'indication du PTI. En décembre 2011, Symphogen a présenté les résultats très encourageants de la phase II du Rozrolimupab (SYM001) pour le traitement du PTI (102).

Le LFB (Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies) développe actuellement la fabrication d'un anticorps monoclonal anti-D entièrement humain : le LFB-R593 (Roledumab) (92, 103, 104).

Cet Ac aurait *in vitro* une efficacité égale, voire supérieure, à celle d'un anticorps polyclonal. Depuis octobre 2008, cet Ac est évalué chez des volontaires sains RH:-1. Les premiers résultats obtenus indiquent une bonne tolérance du produit. Une étude européenne de phase II a débuté au deuxième semestre 2009 (105, 106). Les premiers résultats de cette phase II montrent que Roledumab est sûr et bien toléré pour des doses allant jusqu'à 3000 µg en IV et à 300 µg en IM chez les RH:-1 sains bénévoles ce qui est 10 fois supérieur à la dose thérapeutique prévue. Le Roledumab montre un profil pharmacocinétique similaire à l'anti-D humaine purifiée. Une étude de Phase II est actuellement en cours afin de déterminer si Roledumab peut favoriser l'élimination des GR RH:1 chez des volontaires sains RH:-1 bénévoles (107).

## 5- L'élaboration d'une plaquette à destination des patientes concernées par la prévention par Rhophylac®

Actuellement, les autorités de santé souhaitent que tout patient soit informé sur son état de santé afin qu'il devienne un acteur actif de sa santé. Pour cela, les professionnels de santé, comme de nombreuses associations, proposent d'informer au mieux chaque patient via des sites Internet, des brochures, des vidéos, .....

Pour les femmes enceintes, la Haute Autorité de Santé (HAS) a communiqué des recommandations aux professionnels de santé pour les informer au mieux des différents problèmes qu'elles pourraient rencontrer au cours de leur grossesse dont l'allo-immunisation fœto-maternelle et aussi pour les aider à prendre des décisions dans le cadre du suivi de la grossesse et de la naissance (108, 109).

Le Rhophylac® peut être délivré en officine. Afin d'aider le pharmacien d'officine lors de la délivrance de ce médicament, nous avons réalisé une plaquette (Annexe 3).

Le support papier qu'est la plaquette a été choisi pour un certains nombres de raisons :

- il est plus pratique pour le communiquer à la patiente lors de la délivrance à l'officine ;
- il ne comprend que les informations les plus importantes, exprimées le plus simplement possible pour une lecture plus facile ;
- il permet d'engager la conversation si la patiente souhaitait des informations complémentaires ;
- il est facile à réaliser et assez peu coûteux à diffuser.

La plaquette réalisée répond aux questions suivantes pour informer au mieux les patientes :

- Qu'est ce que l'allo-immunisation anti-D (anti-RH1)?
- Quel est le risque (la maladie hémolytique du nouveau-né) ?
- Quelle est la prévention ?
- Quels sont les risques de la prévention ?
- Comment et quand prendre la prévention ?

La plus grande difficulté dans la réalisation de cette plaquette a été de trouver un compromis entre donner suffisamment d'informations et ne pas surcharger la plaquette car l'abondance d'informations peut nuire à l'objectif de la plaquette qui est de délivrer une information claire et facile à retenir.

La plaquette ne comprend que peu d'images qui aurait pourtant pu la rendre plus agréable à lire. La plupart des images qui auraient pu égayer la plaquette nécessitant une autorisation par leur auteur pour les diffuser, nous avons renoncé à leur utilisation.

**CONCLUSIONS**

THESE SOUTENUE PAR : Mademoiselle VELLUTINI Bianca

Les nombreux progrès de ces dernières années ont permis de diminuer la fréquence de l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-érythrocytaire, en particulier anti-D (anti-RH1), à l'origine de maladie hémolytique périnatale et d'en améliorer la prise en charge. Ces progrès ont porté notamment sur le dépistage de l'allo-immunisation anti-D (anti-RH1), l'évaluation de l'atteinte fœtale et la prévention de la maladie.

Dans le cadre du dépistage, la recherche des anticorps irréguliers anti-D (anti-RH1) dans la circulation maternelle, reste indispensable. Pour un meilleur suivi des patientes, ce test est obligatoire dès la première consultation en début de grossesse puis aux 6<sup>e</sup>, 8<sup>e</sup> et 9<sup>e</sup> mois de grossesse.

Par ailleurs, la détermination du groupe sanguin fœtal dans la circulation maternelle est devenue possible dès la 10<sup>e</sup> semaine de gestation grâce à l'étude des gènes qui codent pour les groupes sanguins érythrocytaires et en particulier pour le système Rhésus. Cette technique de génotypage RHD fœtal sur plasma maternel, non invasive, et fiable, permet de cibler les femmes enceintes à risque d'allo-immunisation et ainsi de leur proposer une prophylaxie adaptée. Cependant, l'utilisation de cette technique reste actuellement limitée à des centres spécialisés, mais compte tenu de l'avancée qu'elle représente dans ce domaine, elle devrait être accessible à toutes les patientes concernées dans un avenir proche.

Sur le plan de l'évaluation de l'atteinte fœtale, la sévérité de l'anémie fœtale est évaluée depuis de nombreuses années par la mesure du taux d'hémoglobine dans le sang fœtal après cordocentèse et par le dosage spectrophotométrique de la bilirubine dans le liquide amniotique (indice de Liley) après amniocentèse. Ces techniques invasives (cordocentèse et amniocentèse) présentant des risques pour la mère et son fœtus, sont actuellement en voie de remplacement par la mesure de la vélocité du flux sanguin dans l'artère cérébrale moyenne fœtale par doppler. Cette dernière technique s'impose désormais comme la technique de référence pour évaluer le taux d'hémoglobine du fœtus et de ce fait l'anémie, qu'elle soit modérée ou sévère.

La prévention de l'allo-immunisation anti-D (anti-RH1), qui s'est surtout développée dans les années 70, repose aujourd'hui sur l'injection d'immunoglobulines anti-D d'origine humaine dont la dose injectée est fonction du résultat obtenu au test de Kleihauer. A l'époque, une seule injection était effectuée dans les 72h qui suivaient l'accouchement. Depuis peu, la prophylaxie a été renforcée par une injection supplémentaire d'immunoglobulines anti-D à la 27<sup>ème</sup>-28<sup>ème</sup> semaine de gestation pour prévenir les éventuelles allo-immunisations au cours de la grossesse. Compte tenu des inconvénients liés à ce médicament d'origine humaine (risque infectieux et rupture de stock intempestive en particulier), le recours à des anticorps recombinants a fait l'objet d'études. Un anticorps monoclonal anti-D entièrement humain est en phase II d'essais cliniques.

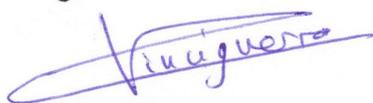
Enfin, il nous a semblé intéressant d'élaborer une plaquette d'information générale sur l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-D (anti-RH1). Cette plaquette pourrait être destinée aux patientes concernées par la prophylaxie anti-D, venant à l'officine. Elle permettrait également à la patiente de mieux comprendre l'utilité d'une telle prévention en ouvrant la possibilité d'un échange avec le pharmacien d'officine.

Malgré les mesures prophylactiques efficaces mises en place depuis plusieurs années, l'allo-immunisation fœto-maternelle anti-érythrocytaires anti-D (anti-RH1) persiste avec une fréquence qui n'a toutefois cessé de diminuer au cours des décennies. La maladie hémolytique du nouveau-né reste encore présente, et dans certains cas encore létale.

**Le Président de la thèse,**

Nom : *C. Vinciguerra*

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le **- 8 OCT. 2012**

Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,



**Professeure C. VINCIGUERRA**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Santavy J. Hemolytic disease in the newborn – History and prevention in the world and the czech republic. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2010; 154 (2): 147–51.
- (2) Dean L. Blood groups and red cell antigens. National Center for biotechnology information, 2005, chap 4.
- (3) Urbaniak S.J., Greiss M.A. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. Blood Reviews. 2000; 14: 44-61.
- (4) Birthing tales. Louise Bourgeois : Observations by the Queen’s midwife on births she presided (1609-1617-1626). <http://www.birthingtales.org/text.php?id=6>, consulté le 15 juin 2011.
- (5) Vannier F. La maladie hémolytique périnatale, revue de la littérature, place du dosage pondéral des IgG Anti-D dans sa surveillance à *propos de 177 cas de maladie hémolytique périnatale par anti-D à Lyon*. Th D Méd, Lyon 1; 1993.
- (6) Wikipédia. Christian Georg Schmorl.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Christian\\_Georg\\_Schmorl](http://en.wikipedia.org/wiki/Christian_Georg_Schmorl), consulté le 15 juin 2011.
- (7) Wikipédia. Hermann Johannes Pfannenstiel.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Hermann\\_Johannes\\_Pfannenstiel](http://en.wikipedia.org/wiki/Hermann_Johannes_Pfannenstiel), consulté le 15 juin 2011.
- (8) Hansen T.W.R. Pioneers in the Scientific Study of Neonatal Jaundice and Kernicterus. Pediatrics. 2000; 106: 1-7. <http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/106/2/e15>, consulté le 17 juin 2011.
- (9) Schmorl C. Zur Kenntnis des ikterus neonatorum, insbesondere der dabei auftretenden gehirnvera'nderungen. Verh Dtsch Pathol Ges. 1904; 6: 109–115
- (10) Diamond L.K., Blackfan K.D., Baty J.M. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus gravis neonatorum and anemia of the newborn. J Pediatr. 1932; 1: 269-309.
- (11) American Society of Hematology. Louis K. Diamond (1902 – 1999).  
<http://www.hematology.org/Publications/Legends/Diamond/3694.aspx>, consulté le 15 juin 2011.
- (12) Bancel C. Détection, quantification des Ac anti-D du système Rhésus, évaluation des sous-classes des IgG anti-D du système Rhésus à l'aide d'une technique immunoenzymatique ELISA. Th D Pharm, Lyon 1; 1986.
- (13) Zacho A. Incompatibilité entre les sangs de même groupe due à la présence d'agglutinines irrégulières chez un receveur. Hospitalstidende, 1935; 78: 225. (compte rendu dans le *Sang*, 1936, n° 6).

- (14) Darrow R.R. Ictère grave (érythroblastose) du nouveau-né. Examen des considérations étiologiques. Arch. Path. 1938; 25: 378-417.
- (15) National Academies Press. Philip Levine. [http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=4560&page=323](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=4560&page=323), consulté le 15 juin 2011.
- (16) Levine P., Stetson R.E. An unusual case of intragroup agglutination. J. Am. Med. Assoc. 1939; 113: 126-7.
- (17) Bernard J., Binet J.L., Bessis M. Histoire illustrée de l'hématologie de l'antiquité à nos jours. Editions Roger Dacosta: Paris; 1992. p. 139-41.
- (18) Bessis M. La maladie hémolytique du nouveau-né et la pathologie de l'enfant liée à l'iso-immunisation de la mère. Edition Masson, 1947. p. 1-3
- (19) Landsteiner K., Wiener A.S. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. Proc Soc Exp Biol Med. 1940; 43: 223.
- (20) Dinosoria. Macaque rhésus. <http://www.dinosoria.com/macaque-rhesus.html>, consulté le 27 juin 2011.
- (21) Wikipédia. Groupe Rhésus. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Groupe\\_Rh%C3%A9sus](http://fr.wikipedia.org/wiki/Groupe_Rh%C3%A9sus), consulté le 06 juin 2011.
- (22) Donner son sang. Karl Landsteiner. <http://www.donnersonsang.com/site/page-180-karl-landsteiner--les-grands-hommes-de-la-transfusion-sanguine.html>, consulté le 15 juin 2011.
- (23) Rhesus Negative. Alexander Solomon Wiener. <http://www.rhesusnegative.net/work/scientists/alexander-solomon-wiener/>, consulté le 15 juin 2011.
- (24) Wiener A.S., Peters H.R. Hemolytic reactions following transfusion of blood of the homologous group, with three cases in which the same agglutinin was responsible. Ann. Int. Med. 1940; 13: 2306-22.
- (25) Levine P., Burnham L., Katzin E.M., Vogel P. The role of iso-immunization in the pathogenesis of erythroblastosis fetalis. Am. J. Obstetr. Gynecol. 1941; 42: 925-7.
- (26) Wiener A.S., Sonn E.B. Perméabilité du placenta humain aux iso-anticorps. J. of Lab. And Clin. Med. 1946; 31 (9): 1020-4.
- (27) Chown B. Anemia from bleeding of the fetus into the mother's circulation. Lancet. 1954; 1: 1213-5.
- (28) Allen F.H., Diamond L.K., Richardson Jones A. Erythroblastosis fetalis. IX. The problems of stillbirths. New Eng. J. of Med. 1954; p 251-453.
- (29) Daffos F., Forstier F. Médecine et Biologie du fœtus humain. Edition Maloine, 1988. p 241-51.

- (30) Liley A.W. Intra-uterine transfusion of foetus in haemolytic disease. Br. Med. J. 1963; 2: 1107-9.
- (31) Wiener A.S., Wexler I.B. Usage de l'héparine dans les exsanguino-transfusions chez les enfants nouveau-nés. J. Pediat. 1946; 31 (9): 1016-9.
- (32) Finn R., Sheppard P.M., Lehane D., Kulke W. Experimental studies on the prevention of Rh hemolytic disease. Brit. Med. J. 1961; 1486: 490.
- (33) Branger B., Winer N. Épidémiologie de l'allo-immunisation anti-D pendant la grossesse. Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction. 2006 ; 35 (supplément 1) : 87-92.
- (34) Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF). Texte des recommandations. Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction. 2006 ; 35 (supplément 1) : 131-5.
- (35) 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 ; 402 : 51-62.
- (36) Colin Y., Cherif-Zahar B., Le Van Kim C., Raynal V., Van Huffel V., Cartron J.P. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. Blood. 1991 ; 78 (10) : 2747-52.
- (37) Genetics Home Reference. Genes : HSPG2. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/HSPG2>, consulté le 10 octobre 2011.
- (38) University of Mississippi Medical Center. Wiener et Fisher-Race Nomenclature. <http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=fisher%20race&source=web&cd=1&ved=0CCwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fcls.umc.edu%2FCOURSES%2FCLS325%2FWeek3%2FRhChart.doc&ei=81HSTtP3DMymsAbM8qjVDA&usg=AFQjCNE4kDWs6lzpLY3GgDOAXzmeXaoQ&cad=rja>, consulté le 27 novembre 2011.
- (39) Le van Kim C., Colin Y. Les antigènes de groupe sanguin Rh : du diagnostic anténatal de la maladie hémolytique du nouveau-né à la fonction de transport d'ammonium. Hématologie. 2004 ; 10 (5) : 372-83.
- (40) Chiaroni J. Groupes érythrocytaires.  
Dans : G. Sébahoun. Hématologie clinique et biologique. 2<sup>ème</sup> éd. Lonrai : Arnette ; 2005 : 485-91.
- (41) Cartron J.P. Aspects structuraux et fonctionnels des antigènes de groupes sanguins.  
Dans : Lefrère J.J., Rouger P. Transfusion sanguine : une approche sécuritaire. Paris : John Libbey Eurotext ; 2000 : 203-43.
- (42) NCBI. Alleles of Rh boxes. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/rbc/xslcgi.fcgi?cmd=bgmut/other\\_rhbox](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/rbc/xslcgi.fcgi?cmd=bgmut/other_rhbox), consulté le 26 février 2012.

- (43) Dulat C., Rey J.L., Trolet C. Répartition ethnique des groupes sanguines en côte d'Ivoire. Médecine d'Afrique Noire . 1989 ; 36 (11) : 880-90.
- (44) Lin M. Taiwan experience suggests that RhD typing for blood transfusion is unnecessary in southeast Asian populations. Transfusion. 2006 ; 46 (1) : 95-8.
- (45) Dean L. Groupes sanguins et érythrocytaires. National Center for Biotechnology Information (États-Unis); 2005. [http://translate.googleusercontent.com/translate\\_c?hl=fr&langpair=en%7Cfr&rurl=translate.google.fr&u=http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/&usg=ALkJrhjARdEamaSWfykIf8oEfUQdhEV7PA](http://translate.googleusercontent.com/translate_c?hl=fr&langpair=en%7Cfr&rurl=translate.google.fr&u=http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/&usg=ALkJrhjARdEamaSWfykIf8oEfUQdhEV7PA), consulté le 09 novembre 2011 (chapitre 7).
- (46) Mannessier L. Suivi de l'allo-immunisation fœto-maternelle. Transfusion Clinique et Biologique. 2003 ; 10 : 258-62.
- (47) 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 ; 14 : 112-9.
- (48) Miquel E., Cavelier B., Bonneau J.C., Rouger P. Incompatibilités fœtomaternelles érythrocytaires (IFME) : de la surveillance immunohématologique des femmes enceintes à la maladie hémolytique de nouveau-né (MHNN). Transfusion Clinique et Biologique. 2005 ; 12 : 45-55.
- (49) Wikipédia. Système Kell. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Syst%C3%A8me\\_Kell](http://fr.wikipedia.org/wiki/Syst%C3%A8me_Kell), consulté le 10 novembre 2011.
- (50) Faculté de médecine Pierre et Marie CURIE. Chapitre 20 - Transfusion sanguine et produits dérivés du sang : indications, complications. **Hémovigilance**. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/hemato/POLY.Chp.20.12.html>, consulté le 10 novembre 2011.
- (51) D'Ercole C., Robert V. Incompatibilités érythrocytaires fœtomaternelles. Dans : G. Sébahoun. Hématologie clinique et biologique. 2<sup>ème</sup> éd. Lonrai : Arnette ; 2005 : 83-9.
- (52) D'Ercole C. Allo-immunisation fœtomaternelle érythrocytaire. EMC (Elsevier Masson SAS), Obstétrique. 2009 ; 5-020-A-20.
- (53) Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A. Immunologie, le cours de Janis Kuby. Paris : Dunod ; 2003.
- (54) Bellier B. Phase effectrice de la réponse immunitaire humorale. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/immun/repimmunhumor/2007lareponseimmunitaire.pdf>, consulté le 17 octobre 2011.
- (55) Carcelain G., Labalette M., Radosavljevic M. Immunité adaptative : la mémoire immunitaire. [http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02\\_files/page82-14.-memoire-immunitaire.pdf](http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02_files/page82-14.-memoire-immunitaire.pdf), consulté le 17 octobre 2011.

- (56) Université de Rouen. Les immunoglobulines spécifiques Ig anti-D Rhophylac 200µg, 300µg. <http://www.univ-rouen.fr/servlet/com.univ.utils.LectureFichierJoint?CODE=1191935548103&LANGUE=0>, consulté le 19 octobre 2011.
- (57) Magdelaine-Beuzelin C., Ohresser M., Watier H. FcRn, un récepteur d'IgG aux multiples facettes. Médecine Sciences. 2009 ; 25 (12) : 1053-56.
- (58) Brossard Y., Parnet-Mathieu F., Larsen M. Incompatibilités fœto-maternelles érythrocytaires.  
Dans : Lefrère J.J., Rouger P. Transfusion sanguine : une approche sécuritaire. Paris : John Libbey Eurotext ; 2000 : 290-318.
- (59) Pape O. Mise en place préliminaire d'une méthode de détermination non invasive du Rhésus D fœtal par analyse de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel au sein du réseau sécurité naissance des pays de la Loire. Th D Méd, Nantes; 2008.
- (60) Arrêté du 19 avril 1985 modifiant l'arrêté du 27 août 1971 relatif aux examens médicaux pré et postnatals (J.O. 30 mai 1985).
- (61) Décret no 92-143 du 14 février 1992 relatif aux examens obligatoires pré-nuptial, pré et postnatal (J.O. 16 février 1992).
- (62) Kleihauer E., Braun H., Betke K. Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear. Klin Wochenschr. 1957; 35 (12): 637-8.
- (63) Institut de Puériculture et de Périnatalogie. Test de Kleihauer. <http://ipp-perinat.com/spip.php?article404>, consulté le 18 février 2012.
- (64) Vie. Incompatibilité fœto-maternelle. <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/gpes-sanguins/03merefoetus.htm>, consulté le 18 février 2012.
- (65) Tulane University. Hematopathology Images. [http://tulane.edu/som/departments/pathology/training/hematopathology\\_images\\_21.cfm](http://tulane.edu/som/departments/pathology/training/hematopathology_images_21.cfm), consulté le 26 juin 2012.
- (66) Wikipédia. Robin Coombs. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Robin\\_Coombs](http://fr.wikipedia.org/wiki/Robin_Coombs), consulté le 18 février 2012.
- (67) Wikipédia. Antiglobuline. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Antiglobuline#Test\\_direct\\_.C3.A0\\_1.27antiglobuline](http://fr.wikipedia.org/wiki/Antiglobuline#Test_direct_.C3.A0_1.27antiglobuline), consulté le 18 février 2012.
- (68) Lansac J., Carbonne B., Babault C. Incompatibilités sanguines fœto-maternelles.  
Dans Lansac J., Berger C., Magnin G. Soutoul J.H. Obstétrique. Masson ; 2003 : 211-24.
- (69) Bennett P.R., Le Van Kim C., Colin Y., Warwick R.M., Cherif-Zahar B., M. Fisk N.M. et al. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. N Engl J Med. 1993; 329 (9): 607-10.

- (70) Minon J.M., Schaaps J.P., Retz M.C., Dricot J.F., Foidart J.M., Senterre J.M. Utilisation en routine clinique du génotypage fœtal RHD sur plasma maternel: bilan de deux ans d'activité. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 2005; 34: 448-53.
- (71) Lo Y.M.D., Corbette N., Chamberlain P.F, Rai V., Sargent I.L., Redman C.W. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997; 350 (9076): 485-7.
- (72) Lo Y.M.D., Tein M.S.C., Lau T.K., Haines C.J., Leung T.N., Poon P.M.K. et al. Quantitative analysis of foetal DNA in maternal plasma and serum: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998; 62 (4): 768-75.
- (73) Lo Y.M.D., Zhang J., Leung T.N., Lau T.K., Chang A.M.Z., Hjelm N.M. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999; 64 (1): 218-24.
- (74) Carbonne B., Cortey A., Rouillac-Le Sciellour C., Brossard Y. Génotypage RhD fœtal non invasif sur sang maternel: vers une utilisation chez toutes les femmes enceintes RhD négatif. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité.* 2008; 36: 200-3.
- (75) Laboratoire de génétique moléculaire et laboratoire SESEP. Méthodes d'analyse de l'ADN et Applications médicales et médico-légales.  
<http://www.sesep.uvsq.fr/formation/methodes.html>, consulté le 26 février 2012.
- (76) Institut de biotechnologies Jacques Boy. Free *DNA Fetal Kit*® RhD: Kit de génotypage fœtal *RHD* à partir d'ADN fœtal libre du sang maternel (Technique PCR Temps réel).  
[http://www.biotechjboy.com/biologie\\_moleculaire/biologie\\_moleculaire.htm](http://www.biotechjboy.com/biologie_moleculaire/biologie_moleculaire.htm), consulté le 26 février 2012.
- (77) Gyneweb. Diagnostic Biologique d'une Immunisation fœtomaternelle.  
<http://www.gyneweb.fr/sources/biologie/hemato/immunofetomater.html#survgrossD>, consulté le 10 mars 2012.
- (78) Gillain N., Minon J.M., Schaaps J.P., Retz C. Concentration de la bilirubine dans le liquide amniotique et indice de Liley au cours du deuxième trimestre de la grossesse. *Immuno-analyse et biologie spécialisée.* 2008 ; 23 : 35-44.
- (79) Carbonne B., Castaigne-Meary V., Cynober E., Gougeul-Tesnière V., Cortey A., Soulié J.C. et al. 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 ; 37 : 163-9.
- (80) Mari G., Deter R.L., Carpenter R.L., Rahman F., Zimmerman R., Moise K.J. et al. Noninvasive diagnosis by doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *N Engl J Med.* 2000 ; 342 (1) : 9-14.
- (81) Mari G., Zimmermann R., Moise K.J., Deter R.L. Correlation between middle cerebral artery peak systolic velocity and fetal hemoglobin after 2 previous intrauterine transfusions. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2005 ; 193 (3) : 1117–20.

- (82) Arlettaz R., Blumberg A., Buetti L., Fahnenstich H., Mieth D. Roth-Kleiner M. et al. Prise en charge thérapeutique des nouveau-nés âgés d'au moins 35 semaines de gestations présentant une hyperbilirubinémie. *Paediatrica*. 2006 ; 17 (3) : 30-3.
- (83) Académie nationale de médecine. Prise en charge de l'ictère du nouveau-né. [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:TU92R\\_1ybAkJ:www.academie-medecine.fr/Upload/anciens/rapports\\_144\\_fichier\\_lie.rtf+prise+en+charge+de+l%27ict%C3%A8re+du+nouveau&cd=1&hl=fr&ct=clnk&gl=fr](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:TU92R_1ybAkJ:www.academie-medecine.fr/Upload/anciens/rapports_144_fichier_lie.rtf+prise+en+charge+de+l%27ict%C3%A8re+du+nouveau&cd=1&hl=fr&ct=clnk&gl=fr), consulté le 17/03/2012.
- (84) Groupe d'études en néonatalogie Nord – PDC. Prise en charge de l'ictère néonatal en maternité. <http://www.gen-nordpasdecalais.fr/images/documents/ictere.pdf>, consulté le 17/03/2012.
- (85) Société canadienne de pédiatrie. Lignes directrices pour la détection, la prise en charge et la prévention de l'hyperbilirubinémie chez les nouveau-nés à terme et peu prématurés (35 semaines d'âge gestationnel ou plus). <http://www.cps.ca/francais/enonces/FN/fn07-02.htm>, consulté le 17/03/2012.
- (86) Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of Hyperbilirubinemia in the Newborn Infant 35 or More Weeks of Gestation. *Pediatrics*. 2004 ; 114 : 297-316.
- (87) Soulié J.C., Larsen M., Andreu G., Berry M., Gabai A., Galiay J.C. et al. Étude rétrospective de l'exsanguinotransfusion du nouveau-né au moyen de sang reconstitué. Bilan de 60 échanges. *Transf Clin Biol*. 1999 ; 6 : 166-73.
- (88) Wallerstein H. Treatment of severe erythroblastosis by simultaneous removal and replacement of the blood of the newborn infant. *Science*. 1946 ; 103 : 583-4.
- (89) Médecine et enfance. Ictère simple du nouveau-né. [http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=lipavlon+ict%C3%A8re&source=web&cd=9&ved=0CFgQFjAI&url=http%3A%2F%2Fwww.medecine-et-enfance.net%2Fshowpdf.html%3Ffile%3D%2Fdata%2Fpdf%2FJ\\_2005\\_06\\_319.pdf&ei=8rZIT6GIGuec0QXLR6C9CA&usg=AFQjCNE-r5vILye9ZitIU\\_fRMzzq5ZhDmg&cad=rja](http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=lipavlon+ict%C3%A8re&source=web&cd=9&ved=0CFgQFjAI&url=http%3A%2F%2Fwww.medecine-et-enfance.net%2Fshowpdf.html%3Ffile%3D%2Fdata%2Fpdf%2FJ_2005_06_319.pdf&ei=8rZIT6GIGuec0QXLR6C9CA&usg=AFQjCNE-r5vILye9ZitIU_fRMzzq5ZhDmg&cad=rja), consulté le 18/03/2012.
- (90) Bourget P., Broise I., Quinquis-Desmaris V., Gabilan J.C. Pharmacocinétique du clofibrate chez le nouveau-né à terme ictérique. *Arch. Pédiatr*. 1995 ; 2 : 722-8.
- (91) OMS. Métalloporphyrines dans le traitement de l'hyperbilirubinémie non conjuguée chez le nouveau-né. <http://apps.who.int/rhl/newborn/reviews/cd004207/fr/index.html>, consulté le 18/03/2012.
- (92) LFB. Les anticorps monoclonaux. [http://www.lfb.fr/fr/la\\_plateforme\\_EMABling.html](http://www.lfb.fr/fr/la_plateforme_EMABling.html), consulté le 07 Avril 2012.
- (93) ZLB Behring. Immunoglobuline anti-D de la dernière génération. [http://www.geburtshilfe.usz.ch/Documents/HealthProfessionals/Guidelines/Rhophylac\\_Find.pdf](http://www.geburtshilfe.usz.ch/Documents/HealthProfessionals/Guidelines/Rhophylac_Find.pdf), consulté le 31/03/2012.
- (94) Biofact. Plasma Products / Rhophylac. [http://biofact.ie/?page\\_id=133](http://biofact.ie/?page_id=133), consulté le 31/03/2012.

- (95) Vital Durand D., Le jeune C. Guide pratique des médicaments DOROSZ. 29<sup>e</sup> éd. Paris : Maloine ; 2010.
- (96) Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 ; 5517: 495-7.
- (97) Wikipédia. Anticorps monoclonal. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Anticorps\\_monoclonal](http://fr.wikipedia.org/wiki/Anticorps_monoclonal), consulté le 27 Juin 2012.
- (98) Biotechnologie. Les anticorps monoclonaux. <http://biotechnologie.over-blog.com/article-17887488.html>, consulté le 27 Juin 2012.
- (99) Bellet D., Dangles-Marie V. Anticorps humanisés en thérapeutique. *Médecine sciences*. 2005 ; 21 (12) : 1054-62.
- (100) Tonye Libyh M., Goossens D., Oudin S., Gupta N., Dervillez X., Juszczak G., *et al.* A recombinant human scFv anti-Rh (D) antibody with multiple valences using a c-terminal fragment of C4-Binding protein. *Blood journal*. 1997 ; 90 : 3978-83.
- (101) Béliard R. Monoclonal anti-D antibodies to prevent alloimmunization : lessons from clinical trials. *Transfusion clinique et biologique*. 2006 ; 13 : 58-64.
- (102) Symphogen. News. [http://www.symphogen.com/web/guest/newsarchive/readmore?p\\_p\\_id=56\\_INSTANCE\\_ZUuU&articleId=134719](http://www.symphogen.com/web/guest/newsarchive/readmore?p_p_id=56_INSTANCE_ZUuU&articleId=134719), consulté le 27 Juin 2012.
- (103) LFB. Le LFB annonce la délivrance du brevet américain sur ses anticorps monoclonaux à forte activité. [http://www.lfb.fr/le\\_lfb\\_annonce\\_la\\_delivrance\\_du\\_brevet\\_americaain\\_sur\\_ses\\_anticorps\\_monoclonaux\\_a\\_forte\\_activite.html](http://www.lfb.fr/le_lfb_annonce_la_delivrance_du_brevet_americaain_sur_ses_anticorps_monoclonaux_a_forte_activite.html), consulté le 07 Avril 2012.
- (104) Urbain R., Teillaud J.L., Prost J.F. EMABling antibodies: from fetomaternal alloimmunisation prophylaxis to chronic lymphocytic leukaemia therapy. *Med Sci (Paris)*. 2009; 25 (12): 1141-4.
- (105) LFB. Communiqué. <http://www.lfb.fr/Upload/News/Fichier5/657.pdf>, consulté le 07 Avril 2012.
- (106) Pharmaceutiques. Les premiers anticorps monoclonaux du LFB entrent en clinique. [http://www.pharmaceutiques.com/biopharma/archive/bp\\_1744.html](http://www.pharmaceutiques.com/biopharma/archive/bp_1744.html), consulté le 07 Avril 2012.
- (107) Yver A., Homery M.C., Fuseau E., Guemas E., Dhainaut F., Quagliaroli D., *et al.* Pharmacokinetics and safety of roledumab, a novel human recombinant monoclonal anti-RhD antibody with an optimized Fc for improved engagement of FC $\gamma$ RIII, in healthy volunteers. *Vox Sang*. 8 Mai 2012. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1423-0410.2012.01603.x/abstract>, consulté le 27/06/2012.

(108) HAS. Comment mieux informer les femmes enceintes? Recommandations pour les professionnels de santé. [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/infos\\_femmes\\_enceintes\\_rap.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/infos_femmes_enceintes_rap.pdf), consulté le 28 Juin 2012.

(109) HAS. Synthèse : Comment mieux informer les femmes enceintes? [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/Infos\\_femmes\\_enceintes\\_fiche.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/Infos_femmes_enceintes_fiche.pdf), consulté le 28 Juin 2012.

# ANNEXES

K	3,31 gr 0	48,02 gr N
L	3,33 gr 0	48,02 gr N
M	3,33 gr 0	48,03 gr N
N	3,34 gr 0	48,03 gr N

Art. 3. - Le permis d'exploitation est accordé pour une durée de cinq ans à compter de la publication du présent arrêté au *Journal officiel* de la République française.

Art. 4. - Conformément aux dispositions de l'article 29 du décret n° 80-204 du 11 mars 1980, susvisé, la redevance trifoncière due par les titulaires du permis d'exploitation aux propriétaires des terrains compris dans le périmètre dudit permis est fixée à la somme une fois payée de 100 F par hectare.

Art. 5. - Un extrait du présent arrêté sera, par les soins du commissaire de la République, affiché dans la préfecture des Pyrénées-Atlantiques ainsi que dans les neuf communes mentionnées à l'article 1<sup>er</sup>. De plus, cet extrait sera inséré au recueil des actes administratifs dudit département et publié, aux frais des titulaires du permis d'exploitation, dans un journal régional ou local dont la diffusion s'étend à toute la zone couverte par le présent titre.

Art. 6. - Le directeur général de l'énergie et des matières premières est chargé de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 14 mai 1985.

*Le ministre du redéploiement industriel  
et du commerce extérieur,  
Pour le ministre et par délégation :  
Le directeur général de l'énergie  
et des matières premières,  
J. SYROTA*

*Le secrétaire d'Etat auprès du ministre  
du redéploiement industriel et du commerce extérieur,  
chargé de l'énergie,*

*Pour le secrétaire d'Etat et par délégation :*

*Le directeur général de l'énergie  
et des matières premières,  
J. SYROTA*

*Nota.* - La carte mentionnée à l'article 2 peut être éventuellement consultée à la direction générale de l'énergie et des matières premières (bureau de législation), 97, rue de Grenelle, à Paris (7<sup>e</sup>), ainsi que dans les bureaux de la direction régionale de l'industrie et de la recherche d'Aquitaine, 26, cours Xavier-Arnozan, à Bordeaux.

#### **Arrêté du 15 mai 1985 prolongeant la validité d'un permis d'exploitation de mines**

Par arrêté du ministre du redéploiement industriel et du commerce extérieur en date du 15 mai 1985, la validité du permis d'exploitation de mines de fluorine et substances connexes, dit « Permis de

Régner » (Allier), accordé à la Compagnie industrielle et minière par arrêté du 9 avril 1979 (*Journal officiel* du 29 avril 1979), est prolongée jusqu'au 29 avril 1989.

#### **Arrêté du 20 mai 1985 modifiant l'arrêté du 20 février 1985 relatif au renouvellement de l'épreuve des bouteilles en acier utilisées pour la plongée sous-marine**

Le ministre du redéploiement industriel et du commerce extérieur, Vu le décret du 18 janvier 1943 modifié portant règlement sur les appareils à pression de gaz ;

Vu l'arrêté du 23 juillet 1943 modifié réglementant les appareils de production, d'emmagasinage ou de mise en œuvre des gaz comprimés, liquéfiés ou dissous ;

Vu l'arrêté du 20 février 1985 relatif au renouvellement de l'épreuve des bouteilles en acier utilisées pour la plongée sous-marine ;

Vu l'avis en date du 30 avril 1985 de la commission centrale des appareils à pression (section permanente) ;

Sur la proposition du directeur de la qualité et de la sécurité industrielles,

Arrête :

Art. 1<sup>er</sup>. - L'article 4 de l'arrêté du 20 février 1985 susvisé est remplacé par l'article suivant :

« Art. 4. - L'article 2 du présent arrêté entre en vigueur :

« - le 1<sup>er</sup> juin 1985 pour les bouteilles dont la dernière épreuve réglementaire a été effectuée avant le 1<sup>er</sup> juin 1982.

« Toutefois, pour les bouteilles ayant subi leur dernière épreuve après le 1<sup>er</sup> juin 1981, la date d'entrée en vigueur de l'article 2 est reportée au 1<sup>er</sup> mars 1986, si elles subissent préalablement à leur premier remplissage postérieur au 1<sup>er</sup> juin 1985 une vérification intérieure et extérieure conformément à l'article 16 de l'arrêté du 23 juillet 1943 susvisé ;

« - le 1<sup>er</sup> juin 1986 pour les autres bouteilles. »

Art. 2. - Le directeur de la qualité et de la sécurité industrielles est chargé de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 20 mai 1985.

*Pour le ministre et par délégation :  
Par empêchement du directeur général  
de l'industrie :*

*L'ingénieur en chef des mines,  
D. PETIT*

### **MINISTÈRE DES AFFAIRES SOCIALES ET DE LA SOLIDARITÉ NATIONALE**

#### **Décret n° 85-555 du 28 mai 1985 modifiant le décret n° 75-19 du 8 janvier 1975 relatif au régime d'assu- rance invalidité-décès des travailleurs non salariés des professions industrielles et commerciales**

Le Premier ministre,

Sur le rapport du ministre de l'économie, des finances et du budget, du ministre des affaires sociales et de la solidarité nationale, porte-parole du Gouvernement, et du ministre du commerce, de l'artisanat et du tourisme,

Vu le code de la sécurité sociale, et notamment l'article L. 663-12 ;

Vu le décret n° 75-19 du 8 janvier 1975 modifié relatif au régime d'assurance invalidité-décès des travailleurs non salariés des professions industrielles et commerciales ;

Vu l'avis du conseil d'administration de la Caisse nationale de l'organisation autonome d'assurance vieillesse des travailleurs non salariés des professions industrielles et commerciales en date du 4 décembre 1984,

Décète :

Art. 1<sup>er</sup>. - Le premier alinéa de l'article 3 du décret du 8 janvier 1975 susvisé est modifié ainsi qu'il suit :

« Le montant annuel de la cotisation est fixé à 444 F dont 376 F au titre de l'assurance invalidité et 68 F au titre de l'assurance décès. »

Art. 2. - Les dispositions du présent décret s'appliquent à compter du 1<sup>er</sup> janvier 1985.

Art. 3. - Le ministre de l'économie, des finances et du budget, le ministre des affaires sociales et de la solidarité nationale, porte-parole du Gouvernement, le ministre du com-

merce, de l'artisanat et du tourisme et le secrétaire d'Etat auprès du ministre de l'économie, des finances et du budget, chargé du budget et de la consommation, sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent décret, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 28 mai 1985.

LAURENT FABIUS

Par le Premier ministre :

*Le ministre des affaires sociales  
et de la solidarité nationale,  
porte-parole du Gouvernement,  
GEORGINA DUFOIX*

*Le ministre de l'économie, des finances et du budget,  
PIERRE BÉRÉGOVOY*

*Le ministre du commerce, de l'artisanat  
et du tourisme,  
MICHEL CRÉPEAU*

*Le secrétaire d'Etat auprès du ministre de l'économie,  
des finances et du budget, chargé du budget  
et de la consommation,  
HENRI EMMANUELLI*

#### **Arrêté du 19 avril 1985 modifiant l'arrêté du 27 août 1971 relatif aux examens médicaux pré et postnataux**

Le ministre des affaires sociales et de la solidarité nationale, porte-parole du Gouvernement,

Vu les articles L. 159 et L. 160 du code de la santé publique ;

Vu l'article 7 du décret n° 62-840 du 19 juillet 1962 relatif à la protection maternelle et infantile complété par l'article 3 du décret n° 64-931 du 3 septembre 1964 ;

Vu l'arrêté du 27 août 1971 relatif aux examens pré et postnataux ;  
Vu l'arrêté du 30 décembre 1975, modifié par les arrêtés du 18 avril 1979, du 21 février 1980 et du 24 octobre 1984, fixant les diplômes exigés pour l'exécution de certains actes de biologie médicale ;

Vu l'arrêté du 23 mai 1977 modifiant un précédent arrêté relatif aux examens médicaux pré et postnataux ;

Vu l'arrêté du 8 février 1984 relatif aux caractéristiques et normes des réactifs utilisés en immuno-hématologie érythrocytaire ;

Vu l'arrêté du 3 avril 1985 fixant la nomenclature des actes de biologie médicale, notamment le chapitre B (V) ;

Vu l'avis de l'Académie nationale de médecine ;

Sur la proposition du directeur général de la santé,

Arrête :

Art. 1<sup>er</sup>. - L'alinéa 4 de l'article 2 de l'arrêté du 27 août 1971 susvisé est abrogé et remplacé par les dispositions suivantes :

« Doivent être recherchés notamment les antécédents d'accidents obstétricaux, la tuberculose, la syphilis, les néphropathies, les cardiopathies, le diabète ainsi que les risques d'incompatibilités sanguines fœtomaternelles. L'examen doit aussi s'attacher à définir l'état d'immunité de la future mère vis-à-vis de la rubéole et de la toxoplasmose. »

Les alinéas 7 et 8 sont abrogés et remplacés par :

« Dans le cas d'une première grossesse, en l'absence de carte de groupe sanguin, une détermination des groupes sanguins (A, B, O, phénotypes rhésus complet et Kell) doit être effectuée. Dès le premier examen, à chaque grossesse, chez toute femme rhésus négatif ainsi que chez toute femme rhésus positif présentant un risque d'allo-immunisation par suite d'une transfusion sanguine, une recherche d'anticorps irréguliers doit être obligatoirement exécutée, de même que chez les femmes antérieurement immunisées ou ayant présenté un accident obstétrical évocateur d'une étiologie allo-immune. »

« Les examens nécessaires à la détermination des groupes sanguins et au dépistage des allo-immunisations fœtomaternelles et leur identification seront exécutés conformément aux instructions données en annexe du présent arrêté. »

Art. 2. - L'article 9 de l'arrêté du 27 août 1971 susvisé est abrogé et remplacé par les dispositions suivantes :

« Les dispositions de l'arrêté du 7 juillet 1965 relatives à l'habilitation des laboratoires en vue de la pratique de la détermination nécessaire au dépistage des incompatibilités sanguines fœtomaternelles demeurent en vigueur en ce qui concerne les laboratoires publics. »

Art. 3. - Le directeur général de la santé est chargé de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 19 avril 1985.

Pour le ministre et par délégation :  
Le directeur général de la santé,  
J. ROUX

#### ANNEXE

##### INSTRUCTIONS POUR LE DÉPISTAGE SYSTEMATIQUE DES ALLO-IMMUNISATIONS FËTOMATERNELLES

Conformément aux dispositions figurant à l'article 1<sup>er</sup> de l'arrêté du 19 avril 1985, il doit être pratiqué chez toutes les primipares lors du premier examen prénatal la détermination du groupe sanguin, du phénotype Rh - complet - (D, C, c, E et éventuellement Cw et e) et du phénotype Kell. Cette mesure s'applique également aux multipares n'ayant pas été soumises à ce dépistage.

La pénétration par voie transfusionnelle ou fœtale d'un antigène érythrocytaire chez un receveur qui ne le possède pas peut entraîner une allo-immunisation qu'il importe de dépister précocement par la recherche et, si celle-ci s'avère positive, le titrage systématique des anticorps qui signalent l'immunisation. Ce risque est particulièrement élevé chez les femmes rhésus négatif et chez celles qui ont été transfusées.

L'obligation de la recherche des anticorps d'immunisation est étendue à toutes les femmes enceintes qu'elle soient rhésus négatif ou rhésus positif.

#### I. - Groupe sanguin (G.S.)

##### 1. Groupe ABO : deux épreuves doivent obligatoirement être réalisées

Epreuve de Beth-Vincent ou épreuve globulaire : elle consiste à mettre en évidence à la surface des hématies la présence des antigènes A ou B à l'aide de trois antisérums : anti A, anti B et anti A + B.

La garantie d'activité anticorps de ces sérums est liée à la présence d'un numéro de conformité délivré par le Centre national de référence pour les groupes sanguins (C.N.R.G.S.).

Epreuve de Simonin ou épreuve sérique : elle consiste à rechercher des anticorps anti A ou anti B dans le sérum. Ces anticorps sont détectés à l'aide d'hématies A1, A2, B et O préparées selon les règles définies à l'article 12, paragraphe 1 de l'arrêté du 8 février 1984.

Ces deux épreuves (épreuve globulaire et épreuve sérique) doivent être réalisées par deux techniciens différents, à l'aide de deux séries de réactifs différents.

L'ensemble de ces tests correspond à une détermination.

#### 2. Détermination du phénotype Rh standard (D)

Cet examen est réalisé au moyen de deux sérums-tests anti D. En même temps que la réaction sera réalisée une épreuve témoin à l'aide d'un réactif « témoin », de constitution identique aux réactifs et dépourvue de toute activité anticorps spécifique.

L'ensemble de ces tests correspond à une détermination. L'activité anticorps des sérums anti D sera attestée par le numéro de conformité délivré par le C.N.R.G.S.

Il faut rappeler que l'on doit désigner par Rh + les sujets dont les globules rouges sont agglutinés par les sérums anti D et par Rh - ceux dont les globules rouges ne le sont pas. Ces déterminations doivent être réalisées par deux techniciens différents et à l'aide de deux séries de réactifs différents.

Il convient de souligner que les résultats de groupage sanguin ne pourront être considérés comme définitifs qu'après une seconde détermination pratiquée ultérieurement à partir d'un nouveau prélèvement à distance du précédent et selon l'ensemble des modalités indiquées ci-dessus.

#### II. - La détermination des phénotypes érythrocytaires

En dehors de la détermination des phénotypes ABO et Rh standard, il est justifié chez la femme enceinte de déterminer le phénotype dans les systèmes de groupes sanguins rhésus (D, c, Cw, E, e) et Kell (K).

En effet, celle-ci est susceptible de recevoir des transfusions qui devront être pratiquées avec du sang phénotypé afin d'éviter une allo-immunisation.

Ces phénotypes doivent être réalisés à l'aide d'antisérums contrôlés par le C.N.R.G.S. selon l'arrêté du 8 février 1984. Les résultats de la détermination des phénotypes doivent être consignés sur la carte de groupe sanguin et la fiche d'accompagnement.

#### III. - La recherche des anticorps irréguliers anti-érythrocytaires (R.A.I.) à l'exclusion des anticorps dirigés contre les antigènes A et B

##### A. - Indications

Les anticorps irréguliers anti-érythrocytaires sont actuellement encore responsables d'accidents transfusionnels ou fœtomaternels qui sont d'autant plus regrettables qu'une bonne organisation de détection de ces anticorps a montré que ces accidents pouvaient être évités.

La recherche d'anticorps irréguliers autres que A et B doit être :

a) Systématique chez les femmes enceintes de phénotype Rh négatif au moins à quatre reprises :

- avant la fin du troisième mois (premier examen prénatal) ;

- au cours du sixième mois (deuxième examen prénatal) ;

- dans les quinze premiers jours du huitième mois (troisième examen prénatal) ;

- à l'accouchement ou dans les huit semaines suivantes.

b) Systématiquement, au moins une fois, chez les femmes enceintes de phénotype Rh +, à l'occasion du deuxième ou troisième examen prénatal.

En cas de présence d'anticorps susceptibles d'entraîner des accidents d'incompatibilité fœtomaternelle, une nouvelle programmation des examens est possible et des titrages doivent être effectués à périodes rapprochées.

##### B. - Réalisation

La recherche d'anticorps irréguliers (R.A.I.) est un examen de réalisation difficile et d'interprétation souvent complexe. Cet examen réalisé dans de bonnes conditions est la base de la sécurité immunologique des transfusions et de la prévention et de la détection des accidents d'allo-immunisation fœtomaternelle.

Les modalités de prélèvement pour l'exécution de cet examen doivent répondre aux mêmes règles que celles observées pour la détermination du groupage sanguin.

La recherche d'anticorps irréguliers se déroule toujours en deux temps : le dépistage et l'identification.

Le dépistage est le premier temps de toute recherche d'anticorps irréguliers ; au terme de cette épreuve d'identification qui consiste à déterminer la spécificité du ou des anticorps présents.

Les recherches d'anticorps irréguliers sont essentiellement pratiquées selon des techniques manuelles. Trois techniques exécutées conjointement sont nécessaires pour mettre en évidence la totalité des anticorps irréguliers : le test d'agglutination en « saline » à 22 °C, le test de Coombs indirect et un test aux enzymes. Le titrage de l'A.I. est obligatoire pendant la grossesse.

Le matériel utilisé dans les épreuves permettant la recherche des anticorps irréguliers doit être particulièrement bien défini :

1. Les panels de globules rouges tests doivent répondre aux données de l'arrêté du 8 février 1984 susvisé.

2. Les antiglobulines doivent avoir été contrôlées par le C.N.R.G.S. et porter de ce fait un numéro de conformité.

3. Les enzymes protéolytiques.

c) Résultats :

Les résultats de ces examens doivent être mentionnés en clair sur le compte rendu d'examen en vue de la transcription sur la carte de groupes sanguins. Sur le document de résultats, le laboratoire doit notamment mentionner :

a) L'utilisation de panels de « n » hématies répondant au texte du 9 mai 1977 ;

b) Les techniques utilisées.

#### Recommandations importantes

Les résultats du groupage sanguin, du groupage rhésus standard et la recherche des anticorps irréguliers devront être transcrits sur les dossiers médicaux. Un double de ces résultats sera remis aux femmes enceintes en leur recommandant de présenter ce document aux médecins appelés à diriger l'accouchement.

Il est recommandé instamment, chaque fois qu'un prélèvement de sang doit être transmis pour analyse au laboratoire, de procéder à cet envoi suivant les modalités suivantes :

Etiquetage du flacon portant :

Mention du nom, prénom, nom de jeune fille de la parturiente ;

Date et lieu de naissance ;

Date de prélèvement.

Fiche d'accompagnement sur laquelle figurent :

La nature de l'examen demandé ;

Les mentions d'état civil énumérées ci-dessus ;

Le domicile de la malade ;

La date du prélèvement ;

Le nom, la qualité, la signature de la personne ayant effectué le prélèvement ;

Quelques renseignements cliniques s'il y a lieu, et notamment la date des grossesses et des transfusions éventuelles antérieures.

D'autre part, la plus grande attention doit être apportée à la transcription des résultats émanant du laboratoire tant sur les dossiers médicaux que sur la fiche remise à la parturiente.

La non-observation rigoureuse de ces recommandations pourra entraîner des erreurs lourdes de conséquences, tout particulièrement dans le cas de prélèvements simultanés à la naissance, chez la mère et l'enfant.

#### Arrêté du 23 avril 1985 relatif à l'agrément de certains accords de travail applicables dans les établissements des secteurs social ou sanitaire à but non lucratif

Le ministre des affaires sociales et de la solidarité nationale, porte-parole du Gouvernement,

Vu l'article 16 de la loi n° 75-535 du 30 juin 1975 ;

Vu le décret n° 82-1040 du 7 décembre 1982 modifiant le décret n° 77-1113 du 30 septembre 1977 relatif à l'agrément de conventions collectives et accords de retraite applicables aux salariés des établissements et services à caractère social ou sanitaire à but non lucratif ;

Vu l'avis de la commission interministérielle d'agrément prévue à l'article 2 du décret n° 77-1113 du 30 septembre 1977,

Arrête :

Art. 1<sup>er</sup>. - Sont agréés sous réserve de l'application des dispositions législatives ou réglementaires en vigueur à compter de la date prévue dans le texte ou, à défaut, de la date de signature des accords collectifs de travail (1) suivants :

##### I. - Convention collective nationale du 31 octobre 1951

Avenant n° 85-02 du 25 mars 1985 fixant la valeur du point à 20,44 F au 1<sup>er</sup> février 1985 et la valeur du point médical « traditionnel » à 57,81 F.

##### II. - Convention collective nationale du 15 mars 1966

Avenant n° 160 du 25 février 1985 ayant pour objet la mise en conformité avec les dispositions des lois Auroux.

Avenant n° 161 du 25 février 1985 fixant la valeur du point à 17,20 F au 1<sup>er</sup> février 1985.

##### III. - Convention collective de l'A.D.M.R. du 6 mai 1970

Avenant n° 121 ayant pour objet la mise à jour de la convention collective de l'A.D.M.R. concernant les différentes catégories de personnel.

Avenant n° 123 du 8 mars 1985 relatif à l'augmentation des indemnités kilométriques « automobile ».

Avenant n° 124 du 8 mars 1985 relatif à l'augmentation des indemnités kilométriques « vélomoteur ».

##### IV. - Convention collective du 11 mai 1983

Avenant n° 1-85 du 8 janvier 1985 relatif au personnel soignant (infirmiers et aides-soignants).

##### V. - Accords collectifs de travail applicables dans les centres d'hébergement et de réadaptation sociale

Protocole d'accord n° 51 du 27 février 1985 relatif à l'augmentation des indemnités kilométriques « automobile ».

##### VI. - Union départementale des sociétés mutualistes de la Côte-d'Or

Avenant n° 19 du 4 janvier 1985 ayant pour objet de régulariser la situation des éducateurs techniques avant diplôme (C.A.F.E.T.S.) lors de leur recrutement.

##### VII. - Association départementale des pupilles de l'enseignement public de l'Aveyron

Accord n° 11 du 12 février 1985 relatif aux congés exceptionnels pour enfants malades octroyés à la mère ou au père de famille.

##### VIII. - Association interprofessionnelle de services sociaux de Valenciennes

Avenant n° 70 du 25 janvier 1985 ayant pour objet de fixer la valeur du point à 21,87 F au 1<sup>er</sup> décembre 1984.

##### IX. - Institut médico-pédagogique Bell Estello au Pradet

Protocole d'accord du 12 juillet 1985 relatif au droit d'expression des salariés.

Art. 2. - Ne sont pas agréés les accords collectifs de travail suivants :

##### I. - Union mutualiste tarnaise

Avenant n° 16 ayant pour objet d'introduire dans la convention collective des dispositions prises par le comité d'entente des organismes mutualistes.

##### II. - Union départementale des sociétés mutualistes de la Côte-d'Or

Avenant n° 20 du 4 janvier 1985 ayant pour objet de créer une classification des éducateurs techniques non titulaires du certificat d'aptitude aux fonctions d'éducateur technique spécialisé.

##### III. - Association départementale des pupilles de l'enseignement public de l'Aveyron

Accord d'entreprise n° 3 du 12 février 1985 ayant pour objet l'aménagement du temps de travail des femmes enceintes.

Accord d'entreprise n° 4 du 12 février 1985 concernant les heures d'information syndicale.

Accord d'entreprise n° 5 du 12 février 1985 concernant le repos compensateur ou la rémunération compensatrice d'un jour férié non pris.

Accord d'entreprise n° 7 du 12 février 1985 concernant les autorisations exceptionnelles aux élus du conseil d'administration.

Accord d'entreprise n° 8 du 12 février 1985 concernant l'indemnité de sujétions spéciales pour contact avec les mineurs.

Accord d'entreprise n° 9 du 12 février 1985 relatif au délai de carence.

Accord d'entreprise n° 10 du 12 février 1985 relatif aux transferts.

##### IV. - Fédération audoise des œuvres laïques

Accord collectif d'entreprise.

Avenant n° 1 relatif à la réduction progressive de la durée hebdomadaire du travail à trente-huit heures.

Avenant n° 2 relatif à la revalorisation des salaires.

##### V. - Association Le Salvaret à Villars-sur-Var (06)

Accord du 30 juin 1984 concernant la prise en charge des frais de trajet domicile-travail.

##### VI. - Comité dauphinois d'action socio-éducative

Protocole d'accord du 20 février 1985 relatif au droit d'expression des salariés.

##### VII. - Œuvre des pupilles de l'enseignement public de la Côte-d'Or

Accord du 7 mars 1985 relatif à l'extension des six jours de congés supplémentaires.

Art. 3. - Le directeur de l'action sociale et le directeur des hôpitaux sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 23 avril 1985.

Pour le ministre et par délégation :  
Le directeur de l'action sociale,

M. GIRARD

(1) Le texte de ces accords sera publié au *Bulletin officiel* du ministère des affaires sociales et de la solidarité nationale.

## ANNEXE 2 :

JORF n°104 du 4 mai 2002 page 8375  
texte n° 80

### ARRETE

#### **Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale**

NOR: SANP0221588A

Le ministre délégué à la santé,

Vu le code de la santé publique, et notamment les articles L. 6211-8 (4°), L. 6213-1, L. 6213-2, L. 6213-3, L. 1131-1, L. 1131-2, L. 1131-3 ;

Vu le décret n° 76-1004 du 4 novembre 1976, modifié notamment par le décret n° 93-354 du 15 mars 1993, fixant les conditions d'autorisation des laboratoires d'analyses de biologie médicale ;

Vu le décret n° 83-104 du 15 février 1983, modifié notamment par le décret n° 93-354 du 15 mars 1993, relatif au contrôle de bonne exécution des analyses de biologie médicale prévu par l'article L. 6213-2 du code de la santé publique ;

Vu l'arrêté du 12 janvier 1999 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en assistance médicale à la procréation ;

Vu l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale ;

Vu la proposition du directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé du 26 octobre 2001, modifiée le 12 décembre 2001 et le 5 avril 2002 ;

Vu l'avis de la Commission nationale permanente de biologie médicale du 16 janvier 2002,  
Arrête :

#### Article 1

Le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale annexé à l'arrêté du 26 novembre 1999 est modifié ainsi qu'il suit :

Au III du guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale, le premier paragraphe du 2.2.2 est supprimé ;

Le IV du guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale est complété par un C ainsi intitulé : « C. - Cas particulier des bonnes pratiques de laboratoire en immuno-hématologie érythrocytaire », dont les dispositions et les annexes figurent en annexe du présent arrêté.

#### Article 2

Le directeur général de la santé, le directeur de l'hospitalisation et de l'organisation des soins et le directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire et des produits de santé sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié ainsi que ses annexes au Journal officiel de la République française.

ANNEXE GÉNÉRALE  
C. - CAS PARTICULIER DES BONNES PRATIQUES DE  
LABORATOIRE EN IMMUNO-HÉMATOLOGIE ÉRYTHROCYTAIRE

En vue de mettre en oeuvre une sécurisation des analyses et des résultats en immuno-hématologie érythrocytaire quelle que soit la finalité des analyses prescrites, ainsi qu'une sécurisation de la transmission des résultats, il est fixé pour ces analyses :

- les champs d'application ;
- les règles de réalisation ;
- le contrôle de qualité interne ;
- les conditions d'automatisation et d'informatisation ;
- la carte de groupes sanguins.

I. - Champ d'application

Les champs d'application concernant les analyses d'immuno-hématologie érythrocytaire suivantes :

- le groupage ABO-RH1 (RhD) ;
  - le phénotypage RH-KEL 1 (Rh-K) ;
  - le phénotypage étendu ;
  - la recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI) ;
  - le titrage des anticorps anti-érythrocytaires autres que anti-A, anti-B et le dosage pondéral des anti-RH ;
  - l'épreuve directe de compatibilité au laboratoire ;
  - le test direct à l'antiglobuline,
- sont définis dans l'annexe D I.

II. - Règles de réalisation des analyses

Tous les réactifs nécessaires aux examens d'immuno-hématologie érythrocytaire doivent être conformes à la législation et à la réglementation relative aux conditions particulières de mise sur le marché en vigueur à la date de lancement.

1. Le groupage ABO-RH1 (RhD)

1.1. Définition de l'analyse

Cette analyse consiste à déterminer de manière indissociable les phénotypes ABO et RH1 (RhD) du système RH.

1.2. Modalités de mise en oeuvre

1.2.1. Le principe

Une réalisation du groupage sanguin ABO-RH1 :

Une réalisation du groupage sanguin ABO repose sur deux épreuves complémentaires :

- une épreuve globulaire qui consiste à rechercher les antigènes A (ABO1) et B (ABO2) avec les réactifs monoclonaux suivants : anti-A (anti-ABO1), anti-B (anti-ABO2) et anti-AB (anti-ABO3) ;

- une épreuve plasmatique qui consiste à rechercher les anticorps anti-A et anti-B avec les hématies-tests A1 et B. Au moins une de ces hématies doit être de phénotype RH :-1.

Une réalisation du groupage sanguin RH1 comporte obligatoirement l'utilisation d'un réactif anti-RH1 d'origine monoclonale et du réactif témoin dépourvu de toute activité anticorps mais dont la capacité d'agglutination d'hématies sensibilisées est strictement identique au réactif anti-RH1.

Une détermination du groupage sanguin ABO-RH1 :

Sa définition est fonction des conditions techniques :

- si les opérations du groupage sanguin, incluant les modalités de vérification et d'enregistrement des échantillons et des prescriptions, sont strictement réalisées dans les conditions d'automation et d'informatisation décrites à l'article IV Automation et informatisation, une détermination repose sur une seule réalisation exécutée à l'aide d'un lot de réactifs, d'un lot d'hématies-tests et par un technicien ;

- dans tous les autres cas, une détermination repose sur deux réalisations exécutées par deux techniciens différents. La saisie manuelle des résultats doit aussi passer par une double saisie effectuée par deux personnes différentes.

Un groupage sanguin ABO-RH1 valide :

Un groupage sanguin ABO-RH1 valide est réalisé sur deux prélèvements différents à raison d'une détermination par prélèvement.

### 1.2.2. Les contrôles qualité internes

En ce qui concerne la détermination ABO, le système analytique doit être contrôlé en utilisant une série d'échantillons de contrôle de phénotypes garantis (typage obtenu par un processus technique différent de celui qui doit être contrôlé par ces échantillons) comprenant au minimum :

- un échantillon de groupe A ;
- un échantillon de groupe B ;
- un échantillon de groupe O.

En ce qui concerne la détermination du groupe RH1, le système analytique doit être contrôlé en utilisant une série d'échantillons de contrôle de phénotypes garantis (typage obtenu par un processus technique différent de celui qui doit être contrôlé par ces échantillons) comprenant au minimum :

- un échantillon de groupe RH : 1 ;
- un échantillon de groupe RH : -1.

### 1.2.3. Interprétation et validation des résultats, gestion des anomalies (Annexe D II)

## 2. Le phénotypage RH-KEL 1 (Rh-K)

### 2.1. Définition de l'analyse

Cette analyse comprend l'étude des antigènes RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e) et KEL 1 (K).

## 2.2. Modalités de mise en oeuvre

### 2.2.1. Le principe

Une réalisation du phénotypage RH-KEL 1 :

Une réalisation du phénotypage RH-KEL 1 comporte obligatoirement l'utilisation des réactifs anti-RH2, anti-RH3, anti-RH4, anti-RH5, anti-KEL 1 et du (des) réactif(s) témoin(s) adéquat(s). Il est recommandé d'utiliser des réactifs d'origine monoclonale.

Une détermination du phénotypage RH-KEL 1 :

Sa définition est fonction des conditions techniques :

- si les opérations du phénotypage RH-KEL 1, incluant les modalités de vérification et d'enregistrement des échantillons et des prescriptions, sont strictement réalisées dans les conditions d'automatisation et d'informatisation décrites à l'article IV Automatisation et informatisation, une détermination repose sur une seule réalisation exécutée à l'aide d'un lot de réactifs et par un technicien ;
- dans tous les autres cas, une détermination repose sur deux réalisations exécutées par deux techniciens différents. La saisie manuelle des résultats doit aussi passer par une double saisie effectuée par deux personnes différentes.

Un phénotypage RH-KEL 1 valide :

Un phénotypage RH-KEL 1 valide est réalisé sur deux prélèvements différents à raison d'une détermination par prélèvement.

### 2.2.2. Les contrôles qualité internes

Le système analytique doit être contrôlé en utilisant une série d'échantillons de contrôle de phénotypes garantis (typage obtenu par un processus analytique différent de celui qui doit être contrôlé par ces échantillons) comprenant pour chaque spécificité les hématies suivantes :

- anti-RH2 : un échantillon RH :2,4 et un échantillon RH :-2,4 ;
- anti-RH3 : un échantillon RH :3,5 et un échantillon RH :-3,5 ;
- anti-RH4 : un échantillon RH :2,4 et un échantillon RH :2,-4 ;
- anti-RH5 : un échantillon RH :3,5 et un échantillon RH :3,-5 ;
- anti-KEL 1 : un échantillon KEL :1 et un échantillon KEL :-1.

### 2.2.3. Interprétation et validation des résultats, gestion des anomalies (Annexe D III)

#### 3. Le phénotypage étendu

##### 3.1. Définition de l'analyse

Cette analyse consiste à rechercher un ou plusieurs antigènes érythrocytaires autres que ceux qui sont définis par le groupe ABO.RH1 et par le phénotypage RH-KEL 1.

#### 3.2. Modalités de mise en oeuvre

##### 3.2.1. Le principe

Une réalisation du phénotypage étendu :

pour un système donné la recherche de chaque antigène est basée sur l'utilisation du réactif spécifique et du témoin adéquat.

Une détermination du phénotypage étendu :

Sa définition est fonction des conditions techniques :

- si les opérations du phénotypage étendu, incluant les modalités de vérification et d'enregistrement des échantillons et des prescriptions, sont strictement réalisées dans les conditions d'automatisation et d'informatisation décrites à l'article IV Automatisation et informatisation, une détermination repose sur une seule réalisation exécutée à l'aide d'un lot de réactifs et par un technicien ;
- dans tous les autres cas, une détermination repose sur deux réalisations exécutées par deux techniciens différents. La saisie manuelle des résultats doit aussi passer par une double saisie effectuée par deux personnes différentes.

Un phénotypage étendu valide :

Un phénotypage étendu valide est réalisé sur deux prélèvements différents à raison d'une détermination par prélèvement.

### 3.2.2. Les contrôles qualité internes

Le système analytique doit être contrôlé en utilisant, pour chaque spécificité, deux échantillons de contrôle de phénotypes garantis (typage obtenu par un processus analytique différent de celui qui doit être contrôlé par ces échantillons). L'un de ces échantillons doit être négatif et l'autre d'expression « hétérozygote ».

### 3.2.3. Interprétation et validation des résultats, gestion des anomalies (Annexe D IV)

## 4. La recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI)

### 4.1. Définition de l'analyse

A l'aide de gammes d'hématies-tests d'origine humaine, telles qu'elles sont définies en 4.2.1, on dépiste puis identifie, sur du sérum ou du plasma, les anticorps dirigés contre les antigènes érythrocytaires autres que A et B.

## 4.2. Modalités de mise en oeuvre

### 4.2.1. Le principe

La recherche d'anticorps anti-érythrocytaires comporte deux étapes dont l'enchaînement est sous la responsabilité du biologiste :

- une étape de dépistage au terme de laquelle le laboratoire pourra répondre « dépistage positif » ou « dépistage négatif » d'anticorps anti-érythrocytaires. En cas de dépistage positif, l'identification de l'anticorps est obligatoire.

Cette étape repose sur l'utilisation d'une gamme d'au moins trois hématies-tests de groupe O qui doit permettre la détection des anticorps correspondants aux antigènes RH1 (D), RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e), KEL 1 (K), KEL 2 (Cellano), KEL 4 (Kpb), FY1 (Fya), FY2 (Fyb), JK1 (Jka), JK2 (Jkb), MNS1 (M), MNS2 (N), MNS3 (S), MNS4 (s), LE1(Lea), LE2 (Leb), P1, LU2 (Lub).

Les phénotypes RH suivants doivent être obligatoirement représentés sur la gamme de dépistage :

RH : 1,2,-3,-4,5 ;

RH : 1,-2,3,4,-5 ;

RH : -1,-2,-3,4,5.

De plus, une expression phénotypique « homozygote » doit être respectée pour les antigènes FY1, JK1, JK2, MNS3 et recommandée pour les antigènes FY2 et MNS4.

En aucun cas ces hématies ne feront l'objet de mélange.

Une étape d'identification qui consiste à déterminer la spécificité du ou des anticorps présents, en confrontant la distribution des réactions positives et négatives obtenues avec la distribution des antigènes sur les gammes d'hématies-tests utilisées.

Cette étape est réalisée sur un échantillon non décanté et non ouvert si possible, si elle est mise en oeuvre par un laboratoire différent de celui qui a réalisé le dépistage.

Cette étape repose sur l'utilisation, outre la gamme de dépistage, d'au moins 10 hématies-tests.

L'ensemble de ces hématies de groupe O doit comporter les antigènes suivants : RH1, RH2, RH3, RH4, RH5, RH6, RH8 (Cw), KEL 1, KEL 2, KEL 3 (Kpa), KEL 4, FY1, FY2, JK1, JK2, MNS1, MNS2, MNS3, MNS4, LE1, LE2, P1, LU1 (Lua), LU2.

Les phénotypes suivants doivent être représentés au moins sur deux hématies : KEL 1, FY :1,-2, FY :-1,2, JK :1,-2, JK :-1,2, MNS :3,-4, MNS :-3,4, P :-1.

Cette phase doit permettre l'identification d'un anticorps courant isolé ainsi qu'une orientation dans l'identification des mélanges d'anticorps.

Les techniques :

Pour les deux étapes, la méthodologie technique repose sur la mise en oeuvre d'un test indirect à l'antiglobuline polyspécifique ou anti-IgG permettant de détecter, sur colonne de filtration ou en immuno-adhérence, un anti-RH1 humain de concentration égale à 20 ng/ml ou d'autres techniques de sensibilité au moins égale.

Lors de la phase d'identification, il peut être utile voire indispensable d'utiliser en complément les techniques dites enzymatiques notamment dans le cadre de difficulté d'identification (association d'alloanticorps) et lors des étapes de diagnostic biologique des accidents immunohémolytiques transfusionnels.

#### 4.2.2. Les contrôles qualité internes

Le système analytique sera contrôlé en utilisant des échantillons de contrôle comportant des anticorps (natifs ou réactifs) de spécificité et de titre connus avec au minimum un anticorps de titre à 4 dans la technique d'utilisation et sur une hématie comportant l'antigène correspondant d'expression « hétérozygote ».

#### 4.2.3. Interprétation et validation des résultats (Annexe D V)

5. Le titrage des anticorps anti-érythrocytaires immuns autres que les anti-A et anti-B et le dosage pondéral des anti-RH

#### 5.1. Définition de l'analyse

Le titrage consiste à tester le plasma ou le sérum des patientes et ses dilutions vis-à-vis d'hématies - tests possédant les antigènes spécifiques. La surveillance de l'évolution du taux des anticorps est basée obligatoirement sur le titrage par le test indirect à l'antiglobuline. Le dosage pondéral consiste à mesurer par méthode semi-quantitative et automatisée, la concentration en anticorps. Applicable aux seuls anti-RH, elle consiste en un dosage comparatif par rapport à l'étalon international anti-RH1 dont la concentration est connue. Le plasma ou le sérum des femmes enceintes immunisées et ses dilutions sont testés vis-à-vis d'hématies - tests possédant l'antigène spécifique correspondant.

## 5.2. Modalités de mise en oeuvre

### 5.2.1. Le principe

Le titrage des anticorps consiste à tester le plasma ou le sérum ainsi que ses dilutions de raison géométrique 2 vis à vis d'hématies possédant l'antigène correspondant à l'anticorps identifié de façon extemporanée.

La technique de référence est le test indirect à l'antiglobuline technique tube, en utilisant des hématies natives en solution saline 0,15M.

La technique doit être standardisée, c'est à dire pratiquée :

- avec des réactifs identiques : antiglobuline et mélange d'hématies - tests de même phénotype érythrocytaire ;
- par rapport à un standard anti-RH1 de titre connu ;
- avec reprise en parallèle de l'échantillon précédent conservé congelé à une température inférieure ou égale à - 30° C ;
- en automatisant si possible la réalisation des dilutions à l'aide d'un diluteur. Par ailleurs, la dilution sera extemporanée et si possible portera sur un volume minimum de 100 µ l.

Un mélange de trois variétés d'hématies natives doit être utilisé. Elles seront prélevées depuis moins de quatorze jours en solution de conservation et de phénotype suivant RH :1, 2, 3, 4, 5 pour les anti-RH1 purs ou associés à un anti-RH2 ou un anti-RH3, d'expression hétérozygote pour les antigènes correspondant aux autres anticorps à tester.

### 5.2.2. Les contrôles qualité internes

Ils comportent l'étude du standard anti-RH1 de concentration connue à différentes dilutions.

### 5.2.3. Validation analytique

(Annexe D VI)

## 6. L'épreuve directe de compatibilité au laboratoire

### 6.1. Définition de l'analyse

C'est une analyse qui consiste à tester l'échantillon de sérum ou de plasma du receveur vis-à-vis des hématies de la tubulure du produit sanguin à transfuser.

## 6.2. Modalités de mise en oeuvre

### 6.2.1. Le principe

L'épreuve directe de compatibilité au laboratoire se déroule en trois étapes :

1° Sélection des unités à compatibiliser conformément aux bonnes pratiques de distribution.

Cette sélection prend en compte :

Le statut immuno-hématologique du receveur dont la définition minimale préalable repose obligatoirement, en absence d'antériorité valide, sur :

- le groupage ABO.RH1 ;
- le phénotypage RH-KEL 1 ;
- le phénotypage autre que RH-KEL 1 d'un ou plusieurs antigènes immunogènes si une antigène ou séro compatibilité les concernant doit être respectée ;
- le dépistage d'anticorps anti-érythrocytaires dont le délai par rapport à la date effective de la

transfusion est conforme aux dispositions réglementaires ;  
- l'identification d'anticorps anti-érythrocytaires en cas de dépistage positif.  
La mention d'un protocole transfusionnel éventuel spécifique à la situation clinique considérée.

2° Préparation des hématies de la tubulure.

Cette étape a pour but de conditionner les hématies de la tubulure afin qu'elles puissent être testées dans les mêmes conditions techniques que la RAI.

Au cours de cette étape, il convient d'être particulièrement attentif aux modalités d'identification de la tubulure et des échantillons secondaires à partir du numéro codé en barres de l'unité de produit sanguin.

3° Exécution technique.

Les conditions techniques sont identiques à celles utilisées par la RAI.

#### 6.2.2. Les contrôles qualité internes

Le système analytique doit être contrôlé en utilisant des échantillons de contrôle identiques à ceux utilisés pour la RAI.

#### 6.2.3. Interprétation et validation des résultats (Annexe D VII)

##### 7. Le test direct à l'antiglobuline

###### 7.1. Définition de l'analyse

Le test direct à l'antiglobuline permet la mise en évidence de la sensibilisation in vivo des hématies humaines par des anticorps de nature IgG et/ou des fractions du complément. Ce test doit être réalisé sur un échantillon de préférence anticoagulé.

##### 7.2. Modalités de mise en oeuvre

###### 7.2.1. Le principe

La mise en évidence de la sensibilisation in vivo des hématies repose sur l'utilisation d'antiglobuline(s) humaine(s) dont la portion Fab reconnaît les marqueurs isotypiques d'immunoglobulines ou des fractions du complément spécifiquement fixées sur l'hématie. La réalisation de cette analyse impose d'utiliser de façon simultanée et indépendante une antiglobuline anti-IgG et un anti-C3d ainsi que des réactifs témoins appropriés.

#### 7.2.2. Les contrôles qualité internes

Le système analytique sera contrôlé en utilisant des hématies préalablement sensibilisées in vitro par des IgG et éventuellement du complément.

#### 7.2.3. Interprétation et validation des résultats (Annexe D VIII)

##### III. - Contrôle de qualité interne (CQI)

Le biologiste devra organiser un contrôle de qualité interne conformément au guide de bonne

exécution des analyses de biologie médicale (GBEA) et qui repose notamment sur l'analyse d'échantillons de contrôle effectuée dans les mêmes conditions que celles appliquées aux échantillons biologiques. Les résultats relatifs à ces échantillons de contrôle doivent être connus et garantis. La mise en oeuvre de ces contrôles est, au minimum, quotidienne.

#### IV. - Automation. - Informatisation

##### 1. Automation et exécution analytique

Les caractéristiques, les modalités de mise en place et le fonctionnement des matériels automatiques et informatiques seront conformes aux règles générales d'exécution des analyses de biologie médicale prévues par le GBEA en vigueur.

##### 1.1. Objectifs de l'automation et de l'informatisation au laboratoire d'immuno-hématologie (Annexe D IX)

1.2. Définition des caractéristiques minimales d'un système permettant de dire que le processus d'analyse immuno-hématologique est automatique

Quel que soit le degré d'automatisation du processus analytique, sa qualité est directement liée à la phase préanalytique qui comporte des opérations manuelles critiques dont l'erreur peut remettre en cause la fiabilité du résultat :

- acceptation des échantillons et des documents accompagnateurs (prescription - fiche de suivi médical),

- saisie de l'état civil,

- établissement du lien entre patient - support d'identification positive - échantillon.

Ces opérations doivent faire l'objet de procédures écrites et détaillées permettant d'éviter toute erreur de saisie ou d'identification. Il est nécessaire de mettre en oeuvre des opérations spécifiques permettant une vérification de la saisie et du lien entre le patient et son échantillon.

A ce titre, la saisie informatique de l'état civil à partir de la prescription doit être suivie d'un contrôle basé sur une deuxième saisie réalisée à partir des informations inscrites sur l'échantillon et après une identification positive de celui-ci.

La qualification « d'automatique » pour un système donné impose que celui-ci puisse prendre en charge certaines phases de l'exécution analytique apparaissant comme critiques pour la fiabilité des résultats et puisse associer de façon automatique et univoque le patient aux résultats correspondants via le support d'identification positive de l'échantillon. Cette conception peut donc s'appliquer aussi bien aux automates qu'aux semi-automates tels qu'ils sont définis en biologie médicale et qui fonctionnent dans un système informatique donné.

L'attribution de cette qualification repose donc sur la prise en charge, par le système (ensemble de l'automate et de l'environnement informatisé du laboratoire) concerné, des opérations mentionnées en annexe D X.

##### 2. Sécurisation du transfert des résultats du laboratoire sur le centre de distribution (Annexe D XI)

##### V. - Carte de groupes sanguins

La carte de groupes sanguins est un document de synthèse de données biologiques permettant d'assurer la sécurité transfusionnelle immunologique du patient.

La carte de groupes sanguins est éditée par un système informatique validé. Toute retranscription manuelle ou utilisation d'étiquettes de groupe autocollantes est interdite. Les deux déterminations portées sur la carte seront effectuées par le même laboratoire. L'ensemble des mentions nécessaires à la sécurité transfusionnelle immunologique doit apparaître sur une seule face de la carte.

1. Mentions apparaissant  
sur la carte de groupes sanguins  
1.1. Identification du laboratoire qui a édité la carte  
de groupes sanguins

Nom du laboratoire.  
Adresse.  
Téléphone.  
Signature du biologiste.

1.2. Identification du patient

Nom de naissance complété s'il y a lieu du nom marital.  
Prénom(s) et en cas de prénom composé, transcription du prénom complet en toutes lettres.  
Sexe.  
Date de naissance.  
En cas de changement de nom marital, la carte reste valide si les autres identifiants sont corrects.

1.3. Groupes sanguins et phénotypes érythrocytaires

Le résultat de chaque détermination est suivi de la date de sa réalisation.  
Une mention rappelle que les groupes sanguins et les phénotypes ne sont valides qu'après deux déterminations. Cette mention peut être portée au dos de la carte.  
Il est recommandé d'utiliser la nomenclature alphanumérique internationale.

1.4. Recherche d'anticorps anti-érythrocytaires

La présence d'un ou plusieurs anticorps anti-érythrocytaires est mentionnée sur la carte suivie de la date de découverte de l'anticorps. Il n'est pas fait mention des caractéristiques (liste des antigènes) des gammes d'hématies-tests qui ont été utilisées, ainsi que leur provenance.  
Une recherche d'anticorps anti-érythrocytaire négative ne fait l'objet d'aucune mention sur la carte de groupes sanguins.  
Il est recommandé d'utiliser la nomenclature alphanumérique internationale.

2. Cas particulier du nouveau-né

La détermination des groupes sanguins chez un nouveau-né ou un nourrisson nécessite un prélèvement de sang veineux. Elle ne peut pas être réalisée à partir d'un prélèvement de sang effectué au cordon.

Le document de groupes sanguins n'est valide que jusqu'à l'âge de six mois. Il doit mentionner : « groupe sanguin de nouveau-né - valide jusqu'au - date de naissance + 6 mois- ».

A N N E X E D  
BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE  
EN IMMUNO-HÉMATOLOGIE ÉRYTHROCYTAIRE

A N N E X E D I  
CHAMPS D'APPLICATION

1. Groupage ABO-RH1

En absence de résultats valides, cette analyse est réalisée :

- dans un contexte prétransfusionnel avéré ou potentiel ;
- dans un contexte prénuptial, pré ou périnatal conformément aux dispositions réglementaires relatives au suivi de la grossesse. Dans ce contexte les réactifs anti-RH1 utilisés doivent détecter la plupart des variants RH1 ;
- pour la validation de l'identification d'anticorps anti-érythrocytaires ;
- en l'absence de résultats valides du phénotype RH-KEL 1 cette analyse est obligatoirement complétée par un phénotypage RH-KEL 1.

2. Phénotypage RH-KEL 1

En absence de résultats valides, cette analyse est réalisée :

- dans un contexte prétransfusionnel avéré ou potentiel. La prise en compte du résultat s'inscrit dans le cadre des bonnes pratiques de distribution ;
- dans le contexte prénuptial, pré ou périnatal conformément aux dispositions réglementaires relatives au suivi de la grossesse ;
- pour la validation de l'identification d'anticorps anti-érythrocytaires ;

En absence de résultats valides de groupage ABO-RH1 :

- cette analyse est obligatoirement complétée par un groupage ABO-RH1.

3. Phénotypage étendu

En absence de résultats valides, cette analyse est réalisée :

- systématiquement dans les cas d'allo-immunisation anti-érythrocytaire complexe et proposée, à titre préventif, chez certains patients transfusés de manière itérative. Dans ce dernier cas l'analyse concerne les antigènes courants suivants : FY1, FY2, JK1, JK2, MNS3 et si possible MNS4.
  - pour la validation de l'identification d'anticorps anti-érythrocytaires dirigés contre un ou plusieurs antigènes érythrocytaires autres que ceux qui sont définis par le groupage ABO-RH1 et par le phénotypage RH-KEL 1 et pour lesquels les réactifs sont disponibles sur le marché.
- En absence de résultats valides de groupage ABO-RH1 et/ou de phénotypage RH-KEL 1, cette analyse est obligatoirement complétée par un groupage ABO-RH1 et un phénotypage RH-KEL 1.

4. Recherche d'anticorps anti-érythrocytaires

Cette analyse doit être réalisée dans le cadre de la prévention des accidents immuno-

hémolytiques transfusionnels :

- chez tout patient susceptible à court terme d'être transfusé ;
- chez le transfusé itératif, en bonne place au cours des séries de transfusions ;
- chez le patient transfusé dans le cadre du suivi post-transfusionnel préconisé par la réglementation.

Elle doit être réalisée en contexte de greffe ou transplantation.

Elle doit être réalisée en contexte pré ou périnatal conformément aux dispositions réglementaires relatives au suivi de la grossesse.

En l'absence de prescription, ces analyses doivent être réalisées à l'initiative du biologiste.

#### 5. Titrage des anticorps anti-érythrocytaires autres que anti-A, anti-B et dosage pondéral des anti-RH

Le titrage, indissociable de la recherche des anticorps anti-érythrocytaires, est obligatoire chez toute femme enceinte possédant un anticorps immun. Il permet d'estimer l'évolution de l'allo-immunisation en rapport avec un passage d'hématies fœtales qui peut éventuellement se produire dès le premier trimestre de la grossesse. L'activité fonctionnelle (pouvoir hémolytique) de l'anticorps dépendant de sa concentration et de son affinité, pour les anticorps du système RH, l'association au dosage pondéral est nécessaire afin de mieux appréhender le risque hémolytique anté-natal.

En cas d'allo-immunisation une nouvelle programmation des RAI (avec titrage et éventuellement dosage pondéral) est nécessaire. Il est classiquement reconnu qu'un contrôle mensuel est suffisant, dans la majorité des cas, jusqu'à la 20<sup>e</sup> semaine d'aménorrhée. Au-delà, un contrôle tous les quinze jours est à envisager. Dans certains cas d'immunisation sévère, un contrôle fréquent est nécessaire, même avant la 20<sup>e</sup> semaine d'aménorrhée, et d'autant plus en fin de grossesse où le rythme peut être hebdomadaire.

En l'absence de prescription, ces analyses doivent être réalisées à l'initiative du biologiste.

#### 6. Epreuve directe de compatibilité au laboratoire

Cette analyse est réalisée dans les circonstances suivantes :

- s'il s'agit d'un receveur présentant ou ayant présenté un (ou plusieurs) allo-anticorps anti-érythrocytaires ;
- s'il s'agit d'un nouveau-né présentant un test direct à l'antiglobuline positif ou né de mère allo-immunisée.

#### 7. Test direct à l'antiglobuline

Cette analyse doit s'inscrire dans l'un des contextes suivants :

- dans le cadre d'un syndrome hémolytique clinique ou biologique pour démontrer l'origine immunologique de cette hémolyse ;
- dans le cadre de la mise en évidence d'auto-anticorps lors de la RAI afin de détecter leur capacité à se fixer in vivo ;
- dans le cadre d'une maladie hémolytique du nouveau-né pour démontrer la sensibilisation des hématies du nouveau-né par les allo-anticorps de nature IgG d'origine maternelle ;
- dans le cadre d'une réaction transfusionnelle pour démontrer l'origine immuno-hémolytique de l'incident ;

- dans le cadre d'une anémie hémolytique auto-immune pour démontrer la sensibilisation des hématies du patient par les auto-anticorps et/ou par du complément ;
- dans le cadre d'une anémie hémolytique d'origine médicamenteuse pour démontrer la sensibilisation des hématies par des anticorps reconnaissant certains médicaments ;
- dans le cadre de l'exploration biologique d'autres maladies auto-immunes.

## ANNEXE D II GROUPAGE ABO-RH1

Dans l'épreuve globulaire de réalisation du groupage sanguin ABO, le réactif anti-B utilisé ne doit pas donner de réaction croisée vis-à-vis de l'antigène B acquis. L'un des deux réactifs, anti-A ou anti-AB, doit pouvoir reconnaître les hématies Ax.

### 1. Interprétation et validation des résultats

La validation analytique repose sur :

- résultats conformes des CQI ;
- absence d'ambiguïté réactionnelle avec chaque réactif ;
- absence de double population. A ce titre, il est indispensable que tout antécédent transfusionnel récent (moins de quatre mois) soit signalé au laboratoire lors de la prescription de l'analyse ;
- profil réactionnel cohérent par rapport à la table d'interprétation des groupes ABO-RH1 ;
- absence de discordance entre deux réalisations ;
- absence de discordance avec antériorité.

### 2. Gestion des anomalies

La constatation d'une anomalie lors de la phase de validation analytique du groupe sanguin ABO-RH1 impose l'intervention du biologiste. La gestion de l'anomalie repose alors sur :

Une attitude sécurisée en termes d'exploitation :

- ne pas rendre le résultat ;
- rendre un conseil transfusionnel provisoire en cas d'urgence ;

Une nouvelle détermination du groupe sanguin :

- si l'anomalie n'est pas retrouvée, le résultat est validé ;
- si l'anomalie est retrouvée, une poursuite de l'exploration.

Une attitude cohérente en termes d'exploration de l'anomalie qui tiendra compte :

- du contexte clinique ;
- du profil réactionnel obtenu ;
- du résultat des témoins du groupage ABO :
  - le témoin « auto » qui consiste à tester, dans les mêmes conditions techniques, le plasma du sujet vis-à-vis de ses propres hématies ;
  - les témoins « allo » et éventuellement « A2 » qui consistent à tester, dans les mêmes conditions techniques, le plasma du sujet vis-à-vis d'une gamme d'hématies-tests O et A2 dont la constitution antigénique permettra de détecter les anticorps anti-érythrocytaires, autres que anti-A et anti-B, susceptibles d'interférer avec l'épreuve plasmatique ;
  - le témoin « réactif » qui consiste à tester, dans les mêmes conditions techniques, les hématies du sujet vis-à-vis d'un réactif témoin n'ayant pas d'activité anticorps.

ANNEXE D III  
PHÉNOTYPAGE RH-KEL 1

1. Interprétation et validation des résultats

La validation analytique repose sur :

- résultats conformes des CQI ;
- absence d'ambiguïté réactionnelle avec chaque réactif ;
- absence de double population. A ce titre, il est indispensable que tout antécédent transfusionnel récent (moins de quatre mois) soit signalé au laboratoire lors de la prescription de l'analyse ;
- profil réactionnel cohérent par rapport à la table d'interprétation des phénotypes RH-KEL 1 ;
- absence de discordance entre deux réalisations ;
- absence de discordance avec antériorité.

2. Gestion des anomalies

La constatation d'une anomalie lors de la phase de validation analytique du phénotypage RH-KEL 1 impose l'intervention du biologiste. La gestion de l'anomalie repose alors sur :

Une attitude sécurisée en termes d'exploitation :

- ne pas rendre le résultat ;
- rendre un conseil transfusionnel provisoire en cas d'urgence ;

Une nouvelle détermination du phénotype :

- si l'anomalie n'est pas retrouvée, le résultat est validé ;
- si l'anomalie est retrouvée une poursuite de l'exploration ;

Une attitude cohérente en termes d'exploration de l'anomalie qui tiendra compte :

- du contexte clinique ;
- du profil réactionnel obtenu (témoins adéquats inclus).

ANNEXE D IV  
PHÉNOTYPAGE ÉTENDU

1. Interprétation et validation des résultats

La validation analytique repose sur :

- résultats conformes des CQI ;
- absence d'ambiguïté réactionnelle avec chaque réactif ;
- absence de double population. A ce titre, il est indispensable que tout antécédent transfusionnel récent (moins de quatre mois) soit signalé au laboratoire lors de la prescription de l'analyse ;
- profil réactionnel cohérent par rapport à la table d'interprétation des phénotypes étendus ;
- absence de divergence entre deux réalisations ;
- absence de discordance avec antériorité.

2. Gestion des anomalies

La constatation d'une anomalie lors de la phase de validation analytique du typage érythrocytaire étendu impose l'intervention du biologiste. La gestion de l'anomalie repose

alors sur :

Une attitude sécurisée en termes d'exploitation :

- ne pas rendre le résultat ;
- rendre un conseil transfusionnel provisoire en cas d'urgence ;

Une nouvelle détermination du phénotype :

- si l'anomalie n'est pas retrouvée, le résultat est validé ;
- si l'anomalie est retrouvée, une poursuite de l'exploration ;

Une attitude cohérente en termes d'exploration de l'anomalie qui tiendra compte :

- du contexte clinique ;
- du profil réactionnel obtenu.

#### ANNEXE D V RECHERCHE D'ANTICORPS ANTI-ÉRYTHROCYTAIRES Interprétation et validation des résultats

L'identification d'un ou plusieurs anticorps anti-érythrocytaires impose :

De valider la spécificité de chaque anticorps par l'obtention d'une réaction positive avec toutes les hématies porteuses de l'antigène correspondant (au moins 3 hématies) et d'une réaction négative avec toutes les hématies non porteuses de cet antigène (au moins 3 hématies). Le seuil minimal de 3 hématies en terme de réactivités positives ou négatives ne s'applique pas en cas d'association d'anticorps de spécificité anti-RH.

Lorsque cette correspondance exacte n'est pas obtenue, l'interprétation doit prendre en compte le caractère « homozygote » ou « hétérozygote » des hématies utilisées. Dans ces conditions, une étape supplémentaire avec un plus grand nombre d'hématies informatives doit être mise en oeuvre ;

D'éliminer des anticorps supplémentaires éventuels :

- par la mise en oeuvre de techniques complémentaires ;
- par la présence, sur les hématies négatives, des antigènes présents sur la gamme de dépistage ne correspondant pas à la (aux) spécificité(s) préalablement identifiée(s) ;

De contrôler l'absence de l'antigène correspondant à chaque allo-anticorps identifié lorsque les réactifs sont disponibles sur le marché.

En absence de résultats valides, l'identification d'un anticorps anti-érythrocytaire doit être complétée par un groupage ABO-RH1 et un phénotypage RH-KEL 1.

#### ANNEXE D VI

TITRAGE DES ANTICORPS ANTI-ÉRYTHROCYTAIRES IMMUNS AUTRES QUE LES ANTI-A ET ANTI-B ET LE DOSAGE PONDÉRAL DES ANTI-RH La validation analytique repose sur les résultats obtenus avec un standard anti-RH1, les résultats comparatifs entre les 2 échantillons n et n - 1 de la patiente et les résultats de l'antériorité.

#### ANNEXE D VII ÉPREUVE DIRECTE DE COMPATIBILITÉ AU LABORATOIRE Interprétation et validation des résultats

Une procédure doit définir les modalités de libération des produits sanguins labiles compatibilisés en fonction des résultats de cette épreuve :

- résultats conformes des CQI ;

- en absence de réactivité dans la technique considérée :
- l'unité est déclarée compatible. Sa libération est autorisée avec identification spécifique de l'unité conformément aux dispositions réglementaires en vigueur ;
- en cas de réactivité dans la technique considérée :
- l'unité est déclarée incompatible. En fonction du contexte, sa libération peut être autorisée conformément aux dispositions réglementaires prévues par les bonnes pratiques de distribution et le conseil transfusionnel. Par ailleurs, une exploration complémentaire peut être entreprise afin d'expliquer ces résultats et sélectionner de nouvelles unités en tenant compte de ces explorations.

ANNEXE D VIII  
TEST DIRECT À L'ANTIGLOBULINE  
Interprétation et validation des résultats

- résultats conformes des CQI ;
- absence d'ambiguïté réactionnelle avec chaque réactif ;
- profil réactionnel cohérent par rapport à la logique d'interprétation préétablie.

ANNEXE D IX  
OBJECTIFS DE L'AUTOMATION ET INFORMATISATION  
AU LABORATOIRE D'IMMUNO-HÉMATOLOGIE

1. Diminuer le risque d'erreur humaine

En immuno-hématologie érythrocytaire, l'automatisation et l'informatisation des analyses et du transfert des résultats apporte une sécurité supplémentaire par rapport à la réalisation manuelle en réduisant plusieurs risques possibles d'erreurs, et en particulier les erreurs relatives à :

- l'enregistrement de la demande ;
- la sélection de l'échantillon ;
- la sélection du réactif ;
- l'exécution de l'analyse elle-même ;
- la transcription ;
- l'interprétation ;
- la saisie des résultats.

2. Garantir la traçabilité

La compréhension et la correction d'éventuels dysfonctionnements reposent sur une analyse précise des défaillances qui peuvent survenir au niveau d'un processus. L'efficacité de cette exploration a posteriori est intimement liée à une traçabilité fiable de tous les éléments ayant contribué aux opérations analytiques. Aussi les opérations suivantes, relatives à chaque analyse, doivent être archivées, accessibles et exploitables :

- date de l'analyse ;
- couple distributeur-lecteur ;
- réactifs : types - spécificités - numéro de lot ;
- liaison avec les CQI (types - spécificités- numéro de lot - résultats) ayant permis la validation ;
- opérateur ;

- résultats réactionnels obtenus avec chaque réactif ;
- notion de correction manuelle éventuelle survenue avec l'un d'entre eux ;
- résultats analytiques interprétés.

### 3. Gérer les alarmes de fonctionnement du système

#### Remarques :

- en l'absence de connexion informatique, le risque d'erreur de transcription existe toujours, même en cas de double saisie ;
- l'optimisation des systèmes automatiques impose de mettre l'accent sur une formation adaptée des opérateurs.

#### A N N E X E D X

##### a) Traitement et identification des échantillons

Vous pouvez consulter le tableau dans le JO  
n° 104 du 04/05/2002 page 8375 à 8382

##### b) Gestion des réactifs

Vous pouvez consulter le tableau dans le JO  
n° 104 du 04/05/2002 page 8375 à 8382

##### c) Gestion du support réactionnel (microplaque ou support filtration)

Vous pouvez consulter le tableau dans le JO  
n° 104 du 04/05/2002 page 8375 à 8382

##### d) Gestion de la phase de préparation distribution

Vous pouvez consulter le tableau dans le JO  
n° 104 du 04/05/2002 page 8375 à 8382

##### e) Traitement de la lecture des réactions

Vous pouvez consulter le tableau dans le JO  
n° 104 du 04/05/2002 page 8375 à 8382

#### f) Traitement des informations

Vous pouvez consulter le tableau dans le JO  
n° 104 du 04/05/2002 page 8375 à 8382

#### g) Exploitation des informations

La décision finale de la validation analytique revient à l'opérateur :

- par contrôle visuel de chaque support avec analyse de cohérence avec les résultats rendus par le système ;
- par appréciation de la qualité des contrôles qualité internes autorisant la validation analytique.

Vous pouvez consulter le tableau dans le JO  
n° 104 du 04/05/2002 page 8375 à 8382

#### h) Validation biologique

Conforme à la réglementation en vigueur (GBEA).

### A N N E X E D X I SÉCURISATION DU TRANSFERT DES DONNÉES IMMUNO HÉMATOLOGIE VERS LE SERVICE DE DISTRIBUTION

Elle repose en partie sur la fiabilité des données immuno-hématologiques du receveur introduites dans le système.

Afin d'éviter leur prise en compte manuelle à partir de résultats écrits, ces données doivent être transférées en totalité et informatiquement, après validation, vers le site de distribution de l'Établissement français du sang ou le dépôt de distribution de l'établissement de santé autorisé à attribuer les produits sanguins labiles.

Le transfert des données doit respecter le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA) et les recommandations suivantes :

#### La transmission de données nominatives

Les procédures utilisées doivent garantir la confidentialité :

Les données doivent être cryptées lorsque celles-ci doivent transiter sur un réseau ouvert.

Elles doivent également être cryptées lorsqu'elles doivent transiter sur un réseau interne sur lequel peut se connecter du personnel non médical et non paramédical ;

L'identification de l'émetteur, du destinataire et la vérification des droits de celui-ci à recevoir ces données sont obligatoires. Le destinataire pouvant être une personne physique ou un ordinateur.

## L'intégrité des données transmises

Le protocole de transfert des données doit comporter des procédures efficaces de contrôle des échanges vérifiant que le ou les messages reçus sont identiques au(x) message(s) envoyé(s) et que ces procédures soient effectivement actives.

Au cas où de telles procédures ne seraient pas utilisées (en raison de problèmes momentanés, par exemple), le message émis doit en comporter la mention en clair afin d'avertir le receveur de la possibilité d'erreurs dans la transmission des données.

En cas d'échec de transmission ou de rupture de communication en cours, il faut retransmettre automatiquement et intégralement le ou les messages.

## L'archivage des transmissions

Il est nécessaire d'archiver ces transmissions pendant toute la durée légale d'archivage des dossiers des patients. Ces archives doivent pouvoir être éditables et consultables à tout moment en comportant la date et l'heure d'émission du message acquitté par le receveur.

En cas de transmissions multiples d'un même dossier pour complément ou mise à jour, chacune des transmissions doit être archivée sous la même forme.

Les messages de transfert utilisés doivent répondre aux dispositions normatives en vigueur qui concernent la transfusion sanguine.

Fait à Paris, le 26 avril 2002.

Bernard Kouchner

**ANNEXE 3** : Plaquette d'information sur la prophylaxie anti-D à destination des patientes concernées

**Vous êtes du groupe sanguin Rhésus négatif et enceinte ...**  
**L'allo-immunisation foeto-maternelle anti-Rhésus peut vous concerner ...**



**Numéros utiles :**

- Médecin généraliste : .....

- Gynécologue : .....

- Laboratoire d'analyse : .....

- Autres : .....

**Pour que votre grossesse se déroule au mieux ...**



**... et que votre enfant naisse en bonne santé ...**



**... ayez un suivi régulier de grossesse**

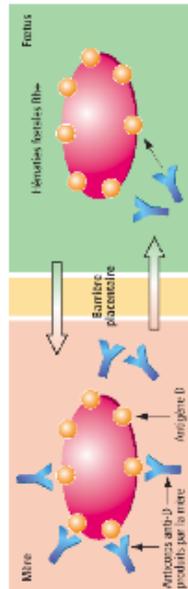
## Qu'est-ce que l'allo-immunisation anti-Rhésus ?

L'allo-immunisation feto-maternelle correspond à la production par une femme enceinte d'anticorps dirigés contre son propre enfant.

### Quelles sont les femmes concernées ?

Les femmes de groupe sanguin **Rhésus négatif** (c'est à dire ne possédant pas l'antigène RH1 (D) sur leurs globules rouges) enceintes d'un enfant **Rhésus positif** (possédant l'antigène RH1 sur ses globules rouges).

### Quel est le mécanisme ?



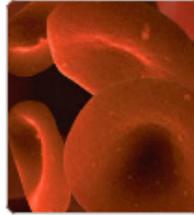
Au cours de la grossesse, des hémorragies feto-maternelles spontanées ou provoquées (par une fausse couche, une interruption de grossesse, ou lors de l'accouchement...) peuvent survenir. Elles entraînent le passage de globules rouges du fœtus dans la circulation sanguine de la mère. Cela crée une situation d'incompatibilité.

Le système immunitaire maternel, qui ne connaît pas l'antigène RH1, est alors activé et produit des anticorps spécifiques contre cet antigène. La femme est alors **immunisée** dans le système Rhésus. On parle ainsi d'allo-immunisation feto-maternelle anti-RH1 (ou anti-D).

## Le risque : La maladie hémolytique périnatale

Si une femme Rhésus négatif préalablement **immunisée** dans le système Rhésus, est enceinte d'un fœtus **Rhésus positif**, les anticorps anti-RH1 qu'elle possède dans son sang traversent la barrière placentaire et vont se fixer sur les antigènes RH1 présents à la surface des globules rouges de son fœtus.

La rencontre de l'antigène RH1 avec son anticorps spécifique correspondant, conduit à la destruction rapide des globules rouges fœtaux par un mécanisme appelé « **hémolyse** ».



### Sur le plan clinique :

L'hémolyse peut débuter in utero et se traduire dans sa forme la plus grave, par l'apparition d'une anémie sévère avec insuffisance cardiaque et œdèmes (c'est l'anasarque fœtale).

La maladie dite "hémolytique" se manifeste toujours après la naissance par une anémie (due à la destruction des globules rouges), évolutive avec une jaunisse sévère potentiellement toxique pour le cerveau de l'enfant.

## La prévention de la maladie

La prévention de la maladie actuellement recommandée en France est très efficace.

### Elle repose sur :

- l'identification des femmes Rhésus négatif enceintes et leur information
- l'injection systématique de doses adaptées d'**immunoglobulines anti-D (= anti-RH1)** chez la femme enceinte d'un fœtus Rhésus positif, pour empêcher une éventuelle allo-immunisation.

### Mécanisme d'action :

Les immunoglobulines anti-D injectées se lient aux antigènes RH1 présents sur les globules rouges fœtaux passés dans la circulation maternelle et provoquent leur destruction.

Les immunoglobulines anti-D font partie de la classe des médicaments dérivés du sang. Toute injection d'immunoglobulines anti-D fait l'objet d'une traçabilité.

### Modalités du traitement ?

Il consiste en **2 injections** par voie intramusculaire ou intraveineuse :

- l'une, **au début du 3<sup>ème</sup> trimestre** de grossesse
- l'autre, **dans les 72h** qui suivent l'accouchement si l'enfant est Rhésus positif
- En cas de saignement, une injection supplémentaire sera réalisée avant le 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.