

# NOUVELLES STRATÉGIES DANS LA PRISE EN CHARGE DE L'ALLO-IMMUNISATION FOETO-MATERNELLE ANTI-RHD (RHÉSUS)

J.M. MINON (1), CH. GÉRARD (2), J.F. DRICOT (3), C. NEVE (4), J.M. SENTERRE (5), J.P. SCHAAPS (6), J.M. FOIDART (7)

**RÉSUMÉ :** En dépit de la généralisation de la prévention par injection d'immunoglobulines anti-D, l'allo-immunisation RhD reste la cause principale de maladies hémolytiques fœtales et du nouveau-né (MHNN) sévères. Le suivi immuno-hématologique des femmes enceintes repose sur la détermination du groupe sanguin érythrocytaire ABO/D, le phénotypage Rh/Kell et la recherche d'anticorps irréguliers (RAI). Lorsqu'un anticorps anti-D est détecté chez une femme en cours de grossesse, la connaissance du phénotype RhD du géniteur permet d'estimer la probabilité pour le fœtus, d'avoir hérité de l'antigène cible paternel. En interprétant le titre de l'anticorps, un marqueur prédictif de l'hémolyse *in vivo*, à la lumière de l'histoire obstétricale de la patiente, une amniocentèse est éventuellement envisagée pour mesurer l'indice de Liley et déterminer le statut fœtal *RHD* à partir des amniocytes. La mise au point de techniques de mise en évidence de DNA fœtal libre circulant dans le sang maternel permet aujourd'hui de rechercher la présence du gène *RHD* du fœtus dans le plasma maternel, en évitant ainsi toute manœuvre invasive. Dans le contexte de la prise en charge de la MHNN, la place de cette nouvelle technique de laboratoire couplée à l'écho-Doppler de l'artère cérébrale moyenne (ACM) comme indicateur direct de l'anémie fœtale sera discutée. Le génotypage fœtal *RHD* à partir de sang maternel pourrait être systématiquement proposé à toute patiente RhD négatif pour qu'un suivi obstétrical mieux ciblé aboutisse à une prévention spécifique plus efficace.

**MOTS-CLÉS :** *Maladie hémolytique fœtale - Diagnostic prénatal - Génotype fœtal HRD - Doppler fœtal*

## INTRODUCTION

La maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né (MHNN) liée à une immunisation RhD reste la plus fréquente et la plus grave (1). En effet, l'anti-D est responsable de la grande majorité des MHNN sévères qui nécessitent un traitement transfusionnel *in utero* ou à la naissance. En France (2) et en Hollande (3), l'incidence de la MHNN liée à l'allo-immunisation RhD est proche de 1 cas pour 1.000 naissances (0,09% patientes/an); rapportée aux seules patientes RhD négatif, elle est de 0,66 %. En terme d'incidence, l'allo-immunisation RhD est suivie essentiellement par les immunisations, anti-c, chez la patiente RhD positif, et anti-K, qui peuvent parfois conduire à une anémie fœtale de sévérité comparable.

(1) Chef de Service, (4) Médecin Biologiste, (5) Chef de service adjoint, Service de Biologie Clinique, CHR Citadelle, Liège.

(2) Pharmacien Biologiste, Service de Biologie clinique, CHU Sart Tilman, Liège.

(3) Assistant, (6) Professeur, (7) Professeur, Service de Gynécologie-Obstétrique, CHU Sart Tilman, Liège.

## NEW APPROACHES OF PRENATAL DIAGNOSIS IN FETOMATERNAL ANTI-RHD (RHESUS) INCOMPATIBILITY

**SUMMARY :** Despite generalisation of anti-D immunoprophylaxis, RhD allo-immunisation still remains the major cause of severe haemolytic disease of the fetus and of the newborn (HDFN). The routine follow up of pregnant women comprises : the ABO/D, Rh/Kell red cells typing and the search for irregular antibodies. In case of anti-D immunisation, the paternal Rh phenotype, when known, provides useful information regarding the probability for the fetus to have inherited the D antigen and thereby to be exposed to the risk of HDFN. The antibody titre, which is predictive of possible *in vivo* haemolysis, must be interpreted in the light of the previous obstetric history, and can lead to the decision of invasive amniocentesis. Then the measurement of the optical density ( $\Delta OD_{450 \text{ nm}}$ ) and the fetal RhD typing can be realised on amniotic fluid. New molecular techniques make it possible now to demonstrate the presence of fetal DNA in maternal plasma. These methods lying on non invasive procedures could advantageously be applied to the genotyping of fetal *RHD* during pregnancy. The present paper aims to discuss the predictive values of *RHD* fetal genotype in maternal plasma of RhD negative mothers. The ante-partum management of immunised pregnant women is reviewed in the light of this new molecular approach combined to Doppler ultrasonography of the fetal middle cerebral artery. This non invasive method for determining fetal *RHD* genotype could be systematically proposed to all RhD negative pregnant women for a better targeted prenatal follow-up and an increased efficacy of RhD prophylaxis.

**KEYWORDS :** *Fetal hemolytic disease - Prenatal diagnosis - Fetal RHD genotype - Fetal Doppler*

## SUIVI IMMUNO-HÉMATOLOGIQUE ANTÉNATAL

En début de grossesse, différents examens immuno-hématologiques sont réalisés systématiquement : la détermination du groupe sanguin ABO-RhD, le phénotypage Rh-Kell, et la recherche d'agglutinines irrégulières (RAI).

Les objectifs de ce premier bilan sont triples (4) :

1. Identifier les grossesses à risque de MHNN quel que soit le statut RhD de la mère;
2. Identifier les patientes RhD négatif en prévision d'une éventuelle prophylaxie par immunoglobulines anti-D et assurer un suivi sérologique plus fréquent;
3. Pouvoir répondre sans délai aux urgences transfusionnelles obstétricales.

Une RAI positive impose d'identifier la spécificité de l'allo-anticorps afin de déterminer sa dangerosité potentielle dans la MHNN. Cette dernière est très variable; elle dépend de nom-

breux paramètres parmi lesquels : la nature des anticorps (IgG ou IgM), leur quantité, leur affinité, la densité antigénique sur les hématies fœtales, etc.

Cependant, la présence d'un allo-anticorps chez une femme enceinte, même un anti-D, ne signifie pas automatiquement que le fœtus sera atteint de MHNN. En effet, pour qu'une MHNN se produise, il faut que les hématies de l'enfant portent l'antigène correspondant à l'anticorps maternel. Il est donc important de pouvoir déterminer le statut RhD du fœtus. Si le fœtus ne possède pas l'antigène D, l'allo-immunisation est sans conséquence. Par contre, si l'antigène est présent chez le fœtus, il faut essayer de préciser l'existence et la gravité de l'anémie hémolytique consécutive à la sensibilisation des hématies fœtales par l'anticorps maternel.

Compte tenu de la fréquence génique dans les différentes ethnies, une mère caucasienne RhD négatif a 61% de chances de porter un enfant RhD positif. Cette probabilité est de 72% si le père est RhD positif.

Les technologies modernes permettent d'améliorer significativement la valeur de cette prédiction.

## DÉTERMINATION DU STATUT RHD FŒTAL

### PHÉNOTYPAGE ÉRYTHROCYTAIRE DU GÉNITEUR

Le phénotype érythrocytaire RhD du géniteur permet de savoir s'il possède l'antigène correspondant à l'anticorps maternel et, donc, s'il est susceptible de l'avoir transmis au fœtus. La descendance d'un père RhD négatif et d'une mère RhD négatif ne porte pas l'antigène D et le risque de MHNN liée à une immunisation anti-D est nul.

A l'inverse des antigènes érythrocytaires dialéliques (par exemple C/c, E/e, K/k), l'antigène «d» n'existe pas en tant que tel, ce qui empêche le diagnostic d'homozygotie (D/D) ou d'hétérozygotie (D/-) lorsque le procréateur est RhD positif.

En tenant compte de l'origine ethnique du géniteur, il est toutefois possible de déduire du phénotype paternel, une probabilité d'homo- ou d'hétérozygotie. En effet, dans la population caucasienne par exemple, la probabilité d'homozygotie (D/D) est élevée si le phénotype Rh est C+c-, E+e- ou C+E+. Dans ces cas, la probabilité que le fœtus hérite de l'antigène RhD est respectivement de 97,6 %, 96,6 % et 96,7 %. A l'opposé, pour les phénotypes C+c+, E+e+, la probabilité d'homozygotie n'est que de 4,8% (5).

Malheureusement, lors d'un suivi de grossesse, le phénotypage du géniteur n'est pas toujours facilement accessible, notamment pour des raisons éthiques et déontologiques.

### PHÉNOTYPAGE ÉRYTHROCYTAIRE DU FŒTUS

En 1983, Daffos et al., ont pratiqué la première cordocentèse visant à déterminer le taux d'hémoglobine et le phénotype érythrocytaire du sang foetal prélevé (6). Il s'agit là d'un acte hautement invasif, réservé aux fortes suspicions d'anémie fœtale qui nécessitent habituellement, dans le même temps, une transfusion *in utero*.

### GÉNOTYPAGE RHD FŒTAL SUR AMNIOCYTES

La compréhension, dans les années 90, des bases moléculaires du polymorphisme RhD a permis de développer des tests de biologie moléculaire utilisant le principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction) visant à déterminer le génotype RHD du fœtus dans un prélèvement obtenu par ponction amniotique dès la 15<sup>ème</sup> semaine de grossesse (7, 8). Cette technique reste néanmoins invasive et, par conséquent, susceptible d'aggraver l'allo-immunisation maternelle.

### GÉNOTYPAGE RHD FŒTAL SUR DNA LIBRE CIRCULANT DANS LE PLASMA MATERNEL

Une alternative beaucoup moins agressive a vu le jour suite à la mise en évidence de DNA foetal circulant dans le sang maternel (9).

Cette nouvelle approche du génotype foetal à partir de plasma maternel repose sur trois éléments majeurs :

1. La présence d'ADN foetal libre dans le plasma maternel (7). La quantité d'ADN foetal augmente en cours de grossesse : elle est estimée respectivement à 3,4% (25 équivalents génome foetal/ ml de plasma maternel) et 6,2% (100 équivalents génome foetal/ ml de plasma maternel) de l'ADN plasmatique total maternel pendant les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestres de grossesse (10). Cet ADN foetal circulant disparaît rapidement après l'accouchement (11).

2. La sensibilité et la spécificité des techniques de Polymerase Chain Reaction en temps réel (ou PCR cinétique) sont supérieures à celles des techniques d'amplification conventionnelles qui utilisent l'électrophorèse comme moyen de détection (12). Elles permettent donc d'étudier l'ADN foetal en très faible quantité dans le plasma maternel.

3. La présence du gène recherché dans le génome foetal et son absence du génome maternel. Dans la population caucasienne, une délétion

tion complète du gène *RHD* explique dans la quasi majorité des cas le manque d'expression de l'antigène RhD (13, 14). Dès lors, la détection de séquences du gène *RHD* dans le plasma d'une patiente enceinte RhD négatif (qui ne possède pas le gène *RHD*) indique la présence d'un fœtus RhD positif (Fig. 1).

Cette technique est appliquée dans notre laboratoire en routine clinique dans la prise en charge des patientes RhD négatif depuis novembre 2002 (15). Elle a fait l'objet d'une étude prospective qui a montré une excellente concordance entre les résultats des génotypes *RHD* fœtal, obtenus à partir de sang maternel au cours de 218 grossesses par PCR cinétique, dès 12 semaines d'aménorrhée, et ceux obtenus par le phénotypage sérologique classique RhD des nouveau-nés.

Pour éviter les résultats faussement positifs dus à des variants non fonctionnels du gène *RHD*, principalement retrouvés dans les populations non caucasiennes (16), l'amplification de segments spécifiques du gène *RHD* fonctionnel (séquences de l'exon 4,5) a été appliquée en plus de celle de l'exon 10 (17, 18). Un faux positif pourrait, en effet, conduire à poser des actes médicaux inutiles, voire néfastes, lors de la prise

en charge d'une grossesse faussement à risque de MHNN.

Un autre écueil du génotypage *RHD* prénatal est le risque de faux négatif, c'est-à-dire déclarer un fœtus D négatif alors qu'il est D positif (19) et ainsi ne pas surveiller la grossesse comme elle devrait l'être. Pour éviter cet écueil, l'amplification concomitante de plusieurs régions du gène *RHD* au niveau des exons 4, 5, 10 est réalisée en duplicate, ce qui confère à la méthode une excellente sensibilité.

Comme contrôle interne, une séquence du gène *SRY* (chromosome Y) est soumise à amplification qui, en cas de positivité, confirme la présence d'ADN fœtal d'un fœtus mâle. L'amplification du gène *CCR5* (gène ubiquitaire d'un récepteur aux chémokines) indique la présence d'ADN dans l'éluat, sans en spécifier son origine maternelle ou fœtale.

En combinant l'amplification des trois exons, la concordance entre le génotype fœtal *RHD* dans le plasma maternel et le phénotype RhD à la naissance est de 100 % (15). Une réaction positive isolée par PCR pour l'exon 10 a été observée dans 4 cas de grossesses où le nouveau-né était RhD négatif. Cette positivité était liée dans trois cas à la présence du pseudogène *RHD* (Fig. 1). La fréquence du pseudogène *RHD*

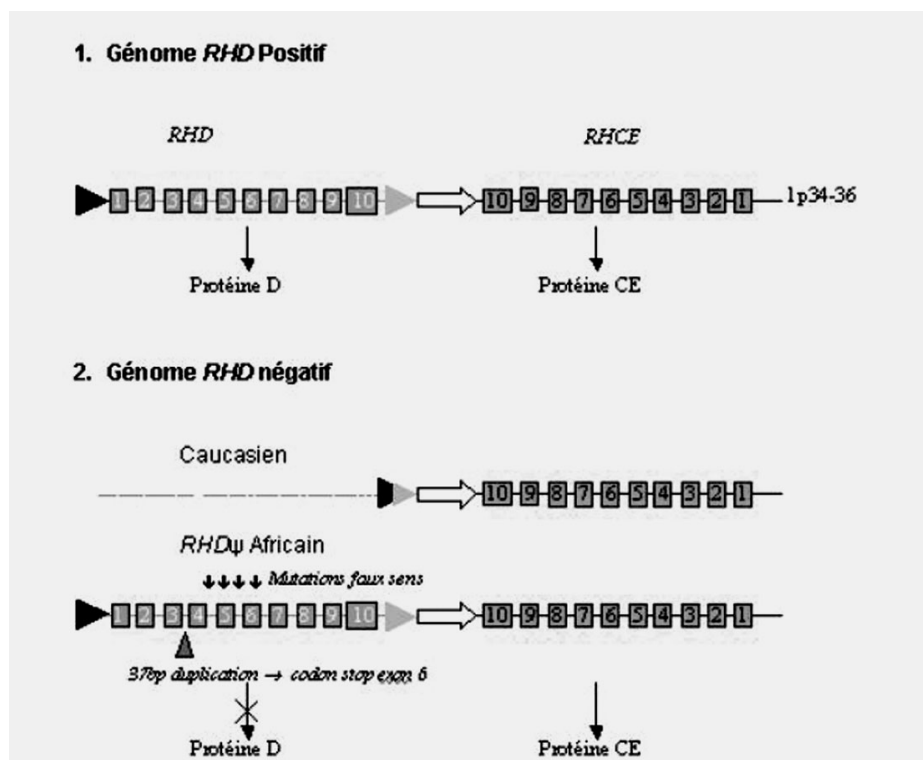


Figure 1: Biologie moléculaire du locus RH

non fonctionnel dans la population RhD négatif est estimée à 66% en Afrique, et 19% chez les noirs américains (20). Dans le dernier cas, elle était liée à l'existence d'un haplotype Cde<sup>S</sup> en relation avec un gène hybride *RHD-RHCE-RHD*.

Le génotypage *RHD* lors de cinq grossesses gémellaires a permis d'exclure la présence du gène *RHD* chez les fœtus d'une même grossesse (absence de faux négatif) ou d'indiquer la présence d'au moins un gène *RHD* chez un des deux fœtus. En cas de grossesse dizygote, il ne permet cependant pas de préciser si les deux fœtus sont RhD positif ou si un seul l'est.

Notre expérience, comme celle d'autres équipes (17, 21-24), confirme que cette technique est devenue la méthode de choix pour évaluer le statut RhD fœtal chez les mères RhD négatif.

#### MÉTHODES D'ÉVALUATION DU RISQUE D'ANÉMIE IN UTERO

Lorsque la détermination du statut *RHD* du fœtus indique qu'il est porteur de l'antigène D, le suivi de la grossesse est focalisé sur l'appréciation de l'anémie fœtale.

Un témoin indirect du risque d'anémie fœtale est l'intensité de l'hémolyse observée *in utero*. Deux paramètres prédictifs de l'hémolyse sont régulièrement utilisés : 1) le titre des allo-anticorps maternels et, 2) l'indice de Liley ( $\Delta OD_{450}$ ) mesuré dans un prélèvement de liquide amniotique.

L'association de ces deux indicateurs a une valeur prédictive élevée. Cependant, les complications liées à la répétition des amniocentèses (perte fœtale et aggravation de la sensibilisation maternelle) ont conduit à rechercher des méthodes non invasives pour l'évaluation de l'anémie fœtale. L'étude du pic de vitesse systolique au niveau de l'artère cérébrale moyenne par écho-Doppler est aujourd'hui reconnue comme le moyen direct le plus fiable (25).

#### TITRAGE DES ALLO-ANTICORPS ANTI-D

Le titre des anticorps détermine le risque d'hémolyse, mais ne permet pas de prévoir la sévérité de l'anémie fœtale. Il constitue en pratique un test de dépistage utilisé pour déterminer le moment où il sera nécessaire de suivre l'évolution de la grossesse avec d'autres moyens que la sérologie. Pour rappel, le titre, qui dépend de la constante d'affinité des anticorps, ne permet d'apprécier que la quantité d'anticorps capables de se fixer *in vitro* sur des hématies tests. Il ne

tient pas compte de la quantité totale d'anticorps présents, ni de la sous-classe d'IgG porteuse de l'activité, ni des autres paramètres intervenant dans la physiopathologie de l'hémolyse chez le fœtus : perméabilité placentaire, maturation du système immunitaire foetal, capacité de phagocytose du système réticuloendothélial, ...

Lorsque le fœtus est *RHD* incompatible, le titre augmente en cours de grossesse, mais cette augmentation est inconstante. A l'inverse, une élévation du titre des anticorps maternels est une preuve indirecte de l'existence d'une incompatibilité foeto-placentaire. L'évolution du taux est cependant imprévisible de sorte que cet examen doit être répété tous les mois jusqu'à 20 semaines d'aménorrhée, puis tous les 15 jours au delà, voire toutes les semaines en fin de grossesse. En effet, la fréquence des hémorragies foeto-maternelles augmentant en fonction de l'âge de la grossesse, celles-ci sont susceptibles d'aggraver l'alloimmunisation préexistante.

En fonction des antécédents obstétricaux de la patiente, le titre «seuil» varie entre 1/16 ou 1/32. Certains auteurs recherchent une augmentation du titre de l'anticorps d'un facteur 4 (de 1/8 à 1/64, par exemple). Dans tous les cas, il est essentiel que les biologistes utilisent la technique de référence pour réaliser le titrage des allo-anticorps anti-D (4, 26). Cette technique est la technique en milieu salin à 37°C, utilisant la réaction de Coombs indirecte avec une antiglobuline spécifique anti-IgG. Les techniques en gel doivent être proscrites, car il n'existe pas de titre critique défini dans la littérature, ni de corrélation avec les titres déterminés par la technique de référence en tubes. De plus, si la patiente est suivie par plusieurs laboratoires utilisant des méthodes différentes, les titres plus élevés obtenus avec les techniques gel peuvent conduire à conclure erroneusement à une augmentation du titre. Pour qu'un suivi soit valable, il est recommandé que le titre des anticorps soit toujours déterminé dans le même laboratoire qui peut ainsi tester en parallèle le sérum actuel avec le sérum antérieur.

Dès qu'un acte invasif, tel qu'une ponction de liquide amniotique, est pratiqué, le suivi du titre n'a plus de sens, car l'acte invasif en lui-même a souvent pour effet de restimuler la production des anticorps maternels.

#### INDICE DE LILEY DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

La variation de densité optique à 450 nm dans le liquide amniotique est un reflet de la bilirubinémie. Elle témoigne de l'intensité du processus hémolytique et donc, indirectement, de l'anémie. La valeur de cet indice reporté sur le diagramme de Liley en fonction de l'âge de la

grossesse permet d'estimer le degré de sévérité de l'anémie fœtale. Le diagramme de Queenan présente l'avantage d'être utilisable avant 27 semaines d'aménorrhée et peut donc être utilisé dès le deuxième trimestre de grossesse (27). Quatre zones de gravité croissante sont définies sur le graphique : fœtus non affecté, risque d'atteinte légère, atteinte fœtale modérée à sévère, risque de décès *in utero*. La surveillance par colorimétrie (la  $\Delta OD_{450}$ ) est répétée toutes les 2 à 3 semaines et des actions spécifiques de suivi sont recommandées, en fonction de la zone de gravité dans laquelle se trouve la mesure.

#### VÉLOCIMÉTRIE DE L'ARTÈRE CÉRÉBRALE MOYENNE FŒTALE

L'utilisation du Doppler fœtal à la recherche du pic systolique de l'artère cérébrale moyenne (ACM) a permis à certaines équipes de réduire d'environ 70% les tests invasifs dans la prise en charge des allo-immunisations (28). Toute anémie fœtale diminue la viscosité sanguine et augmente le débit cardiaque (29). Une conséquence de ces changements physiologiques est l'augmentation des flux sanguins. Ceux-ci sont étudiés par échographie Doppler au niveau de l'ACM. L'échographie Doppler a bien démontré

l'existence d'une relation inversement proportionnelle entre la gravité de l'anémie fœtale et l'augmentation des pics de flux systoliques au niveau de l'ACM (30). L'équipe de Mari a codifié la manière de procéder à l'évaluation de l'ACM et propose, en première intention, un suivi de l'anémie fœtale sur base échographique. Les examens invasifs ne sont proposés que lorsque l'anémie devient pathologique et en vue d'une éventuelle transfusion *in utero* (25, 31, 32). La sensibilité de la technique diminue au-delà de 35 semaines d'aménorrhée.

#### RÉVISION DE L'ALGORITHME DE SUIVI DES PA-TIENTES ALLO-IMMUNISÉES

Les deux techniques non invasives dont il est question : la recherche du gène *RHD* fœtal dans le plasma maternel et la mesure du pic systolique de vélocité sur l'ACM par échodoppler, ont modifié l'algorithme de suivi des patientes allo-immunisées anti-D (Fig. 2).

Dès qu'une patiente est identifiée comme immunisée anti-D, un génotypage *RHD* fœtal est réalisé dès la 12<sup>ème</sup> semaine de grossesse à partir du plasma maternel. S'il est négatif, la patiente est rassurée et une prise en charge convention-

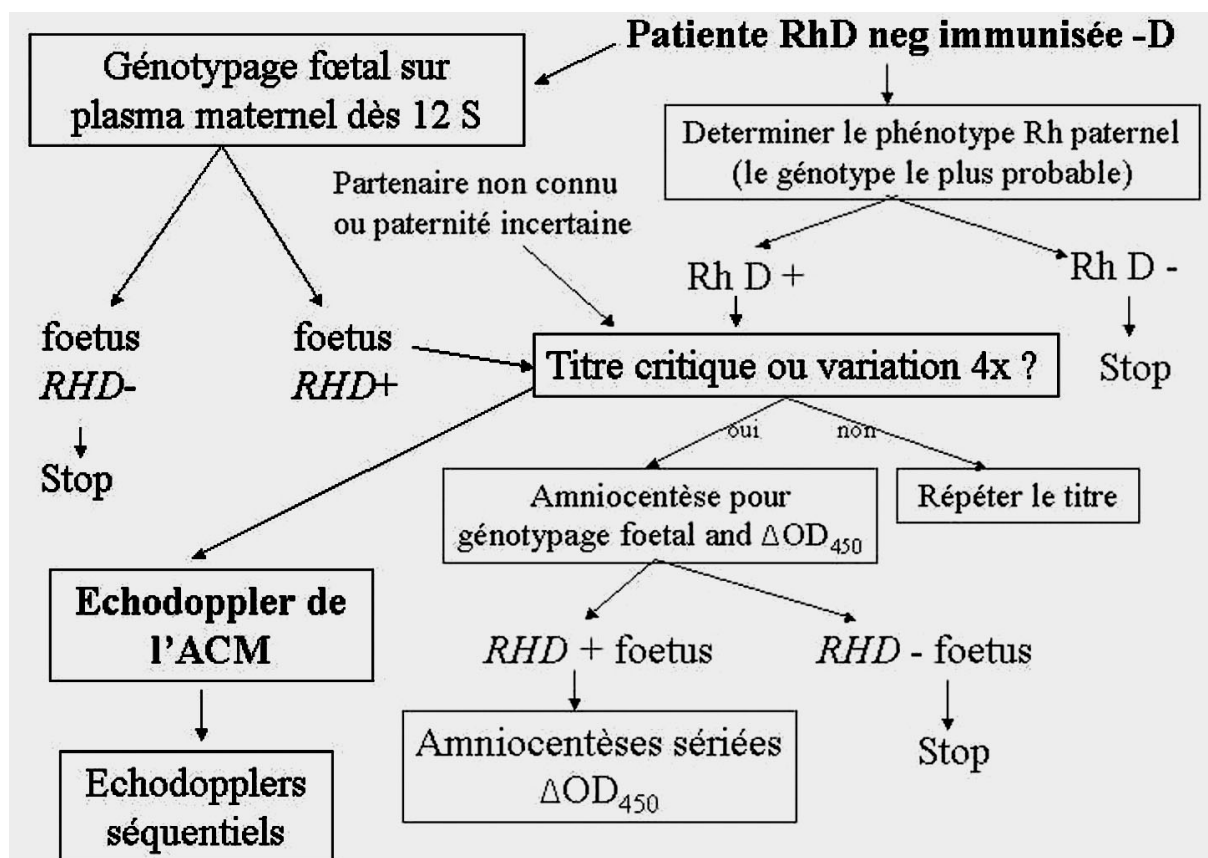


Figure 2 : Algorithme de prise en charge d'une patiente RhD négatif immunisée anti-D

nelle identique à celle d'une patiente Rh positif est poursuivie. Si le fœtus est *RHD* positif, le pic systolique sur l'ACM est mesuré dès que le titre d'anticorps atteint le seuil critique ou, à défaut, lors des contrôles échographiques réglementaires. Un contrôle du pic des vitesses cérébrales est répété régulièrement. Le suivi du titre des anticorps est alors discutable et de peu d'intérêt. En cas d'altération des vitesses cérébrales, les techniques invasives seront envisagées.

#### AUTRES PERSPECTIVES DU GÉNOTYPAGE FŒTAL *RHD* À PARTIR DE SANG MATERNEL

Le génotypage fœtal à partir de plasma maternel permet de rassurer la patiente en cas de fœtus *RHD* négatif.

À l'heure actuelle, dans le cadre de la prévention de l'allo-immunisation anti-D foeto-maternelle, les injections de gammaglobulines anti-D sont réalisées en cours de grossesse à la faveur d'événements spontanés ou de gestes obstétricaux susceptibles d'immuniser la patiente, ainsi qu'à l'accouchement lorsque le nouveau-né est Rh positif. Or, les immunoglobulines actuellement commercialisées sont d'origine humaine et leur totale innocuité ne peut être garantie, notamment vis-à-vis des agents émergents transmissibles par le sang qui ne font pas l'objet d'un dépistage systématique.

Connaître le statut *RHD* du fœtus pendant la grossesse conduirait à un meilleur ciblage de la prévention de l'immunisation chez les patientes Rh négatif porteuses d'un fœtus RhD positif.

Dans les pays anglo-saxons, une injection d'immunoglobulines anti-D est réalisée systématiquement chez les femmes Rh négatif dès la 28<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée. C'est la raison pour laquelle la prévalence de l'allo-immunisation foeto-maternelle anti-D dans ces pays (33) est significativement inférieure à la nôtre (<0.03%). Une extension de la prévention à la période prénatale réservée exclusivement aux femmes porteuses d'un fœtus Rh positif pourrait être proposée. Elle fait l'objet d'une évaluation financière en termes de santé publique par un des auteurs.

#### CONCLUSION

Malgré l'efficacité de la prévention par immunoglobulines spécifiques, l'allo-immunisation anti-D foeto-maternelle reste responsable d'un trop grand nombre d'anémies fœtales et néonatales sévères.

La place des tests biologiques classiques dans la surveillance des grossesses des femmes

immunisées anti-D est aujourd'hui modifiée par le rôle central qu'occupe le génotypage *RHD* de l'ADN fœtal circulant dans le sang de la mère. Celui-ci pourrait aussi conduire à une prévention plus judicieuse car mieux ciblée par immunoglobulines anti-D en cours de grossesse.

La place de l'amniocentèse dans l'évaluation du risque hémolytique est très sérieusement remise en question à la faveur de l'appréciation directe de l'anémie fœtale par l'échodoppler de l'artère cérébrale moyenne.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. Daniels G.— Blood group antibodies in haemolytic disease of the fetus and newborn in Hadley A and Soothil P Ed., Alloimmune disorders of pregnancy. *Cambridge University Press*, Cambridge, 2002, 21-40.
2. Brossard Y, Parnet-Mathieu F, Larsen M.— Incompatibilités foeto-maternelles érythrocytaires in Lefrère J et Rouger P. Ed. Transfusion sanguine : une approche sécuritaire, John Libbey Eurotext, Montrouge, 2000, 294.
3. Van Dijk BA, Hirasing RA, Overbeeke MAM.— Hemolytic disease of the newborn and irregular blood group antagonism in the Netherlands : prevalence and morbidity. *Ned Tijdschr Geneesk*, 1999, **143**, 1465-1469.
4. Wood K.— Standard Haematology Practice/3. Guidelines for blood grouping and red-cell antibody testing during pregnancy and for performing red-cell alloantibody titrations. *Blackwell Science Ltd*, Oxford, 2000, 201-206.
5. Petz LD, Garratty G.— Immune Hemolytic Anemias. Deuxième édition. *Churchill Livingstone*, Philadelphia, 2004, 526.
6. Daffos F, Capella-Pavlosky M, Forestier F.— A new procedure for fetal blood sampling in utero : preliminary results of fifty-three cases. *Am J Obstet Gynecol*, 1983, **146**, 985-987.
7. Bennett PR, Le Van Kim C, Colin Y, et al.— Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *N Engl J Med*, 1993, **329**, 607-610.
8. Avent ND, Finning KM, Martin PG, Soothill P.— Prenatal determination of fetal blood group status. *Vox Sang*, 2000, **78**, 155-162.
9. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, et al.— Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 1997, **350**, 485-487.
10. Lo YMD, Tein MS, Lau TK, et al.— Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum : implications for non invasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*, 1998, **62**, 768-775.
11. Ariga H, Ohto H, Busch MP, et al.— Kinetics of fetal cellular and cell free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Transfusion*, 2001, **41**, 1524-1530.
12. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM.— Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996, **6**, 984-986.
13. Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, et al.— Genetic basis of the RhD positive and RhD negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood*, 1991, **78**, 2747-2752.
14. Avent ND.— Molecular biology of the Rh blood group system. *J Ped Hematol Oncol*, 2001, **23**, 394-402.

15. Minon JM, Schaaps JP, Retz MC et al.— Prenatal determination of fetal RHD in maternal plasma: two-years experience of routine clinical use. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 2005, **34**, 448-453.
16. Westhoff CM.— The Rh blood group system in review: a new face for the next decade. *Transfusion*, 2004, **44**, 1663-1673.
17. Finning KM, Martin PG, Soothill P, Avent ND.— Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new non invasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion*, 2002, **42**, 1079-1085.
18. Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, et al.— Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med*, 1998, **339**, 1734-1738.
19. Van der Schoot E, Tax M, Rijnders R, et al.— Prenatal typing of the Rh and Kell blood group system antigens : the edge of a watershed. *Transf Med Rev*, 2003, **17**, 31-44.
20. Singleton BK, Green CA, Avent ND, et al.— The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the RhD negative blood group phenotype. *Blood*, 2000, **95**, 12-18.
21. Rouillac-Le Sciellour C, Puillandre P, Gillot R, et al.— Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women. *Mol Diagn*, 2004, **8**, 23-31.
22. van der Schoot CE, Soussan AA, Dee R, et al.— Screening for foetal RHD-genotype by plasma PCR in all-negative pregnant women is feasible. *Vox Sanguinis*, 2004, **87**, 9.
23. Gautier E, Benachi A, Giovangrandi Y, et al.— Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, **192**, 666-669.
24. Brojer E, Zupanska B, Guz K, et al.— Non invasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free in maternal plasma. *Transfusion*, 2005, **45**, 1473-1480.
25. Segata M, Mari G.— Fetal anemia : new technologies. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2004, **16**, 153-158.
26. American Association of Blood Banks.— Technical Manual. *Bethesda*, 2002, **14**, 730-731.
27. Queenan JT, Tomai TP, Ural SH, King JC.— Deviation in amniotic fluid optical density at a wavelength of 450 nm in Rh-immunized pregnancies from 14 to 40 week' gestation: a proposal for clinical management. *Am J Obstet Gynecol*, 1993, **168**, 1370-1376.
28. Mari G, Deter RL, Carpenter RL, et al.— Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *N Engl J Med*, 2000, **342**, 9-14.
29. Fan FC, Chen MZ, Schuessler GB, et al.— Effects of hematocrit variations on regional hemodynamics and oxygen transport in the dog. *Am J Physiol*, 1984, **238**, 545-552.
30. Delle Chiaie LD, Buck G, Grab D, et al.— Prediction of fetal anemia with Doppler measurement of the middle cerebral artery peak systolic velocity in pregnancies complicated by maternal blood group alloimmunization or parvovirus B19 infection. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2001, **18**, 232-236.
31. Detti L, Mari G.— Noninvasive diagnosis of fetal anemia. *Obstet Gynecol*, 2003, **46**, 923-930.
32. Mari G, Abuhamad A, Cosmi E et al.— Middle cerebral artery peak systolic velocity, techniques and variability. *J Ultrasound Med*, 2005, **24**, 425-430.
33. Bowman J.— Thirty-five years of Rh prophylaxis. *Transfusion*, 2003, **43**, 1661-1666.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Dr Jean-Marc MINON, Service de Biologie Clinique CHR de la Citadelle, Boulevard du 12ème de Ligne, 1, 4000 Liège, Belgique.  
[jean.marc.minon@chrcitadelle.be](mailto:jean.marc.minon@chrcitadelle.be)