



Place du dépistage prénatal dans l'allo-immunisation plaquettaire

R.PETERMANN MD, PhD
Service d'Immunologie Plaquettaire



DEFINITION

Diagnostic prénatal : Article L. 2131- 1

I. – Le diagnostic prénatal s'entend des pratiques médicales, y compris l'échographie obstétricale et fœtale, ayant pour but de détecter in utero chez l'embryon ou le fœtus une affection d'une particulière gravité.



Article R. 2131- 1

II. – Les examens de biologie médicale et d'imagerie à visée diagnostique mentionnés au IV de l'article L. 2131-1 comprennent :

1. Les examens de cytogénétique, y compris les examens moléculaires appliquées à la cytogénétique ;

2. Les examens de génétique moléculaire ;

3. Les examens de biochimie foetale à visée diagnostique ;

4. Les examens en vue du diagnostic de maladies infectieuses ;

5. L'échographie obstétricale et foetale au sens du 2o du III du présent article ;

6. Les autres techniques d'imagerie foetale à visée diagnostique.

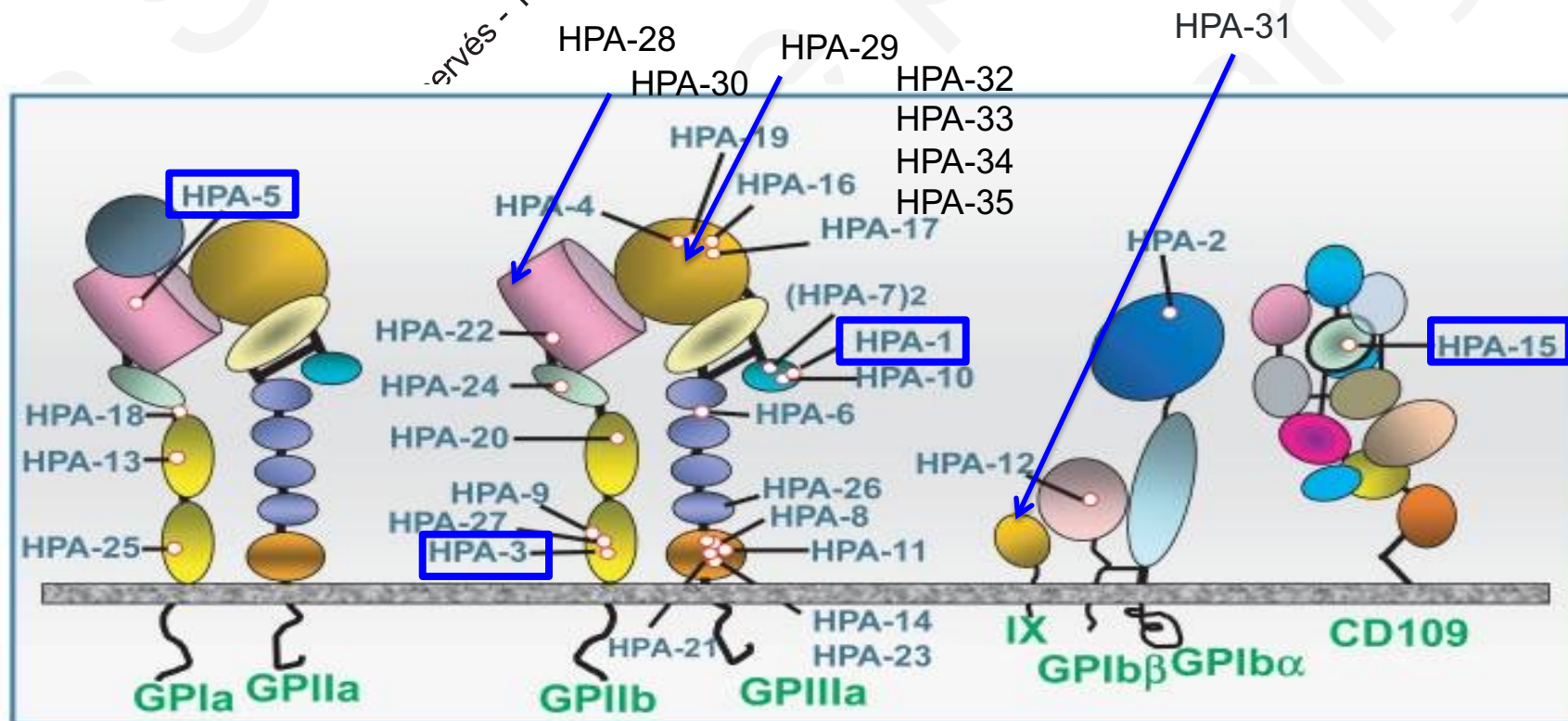


ALLO IMMUNISATION PLAQUETTAIRE MATERNO-FOETALE

2021 © Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction, même partielle est interdite.

Tous droits réservés - Toute reproduction, même partielle est interdite.

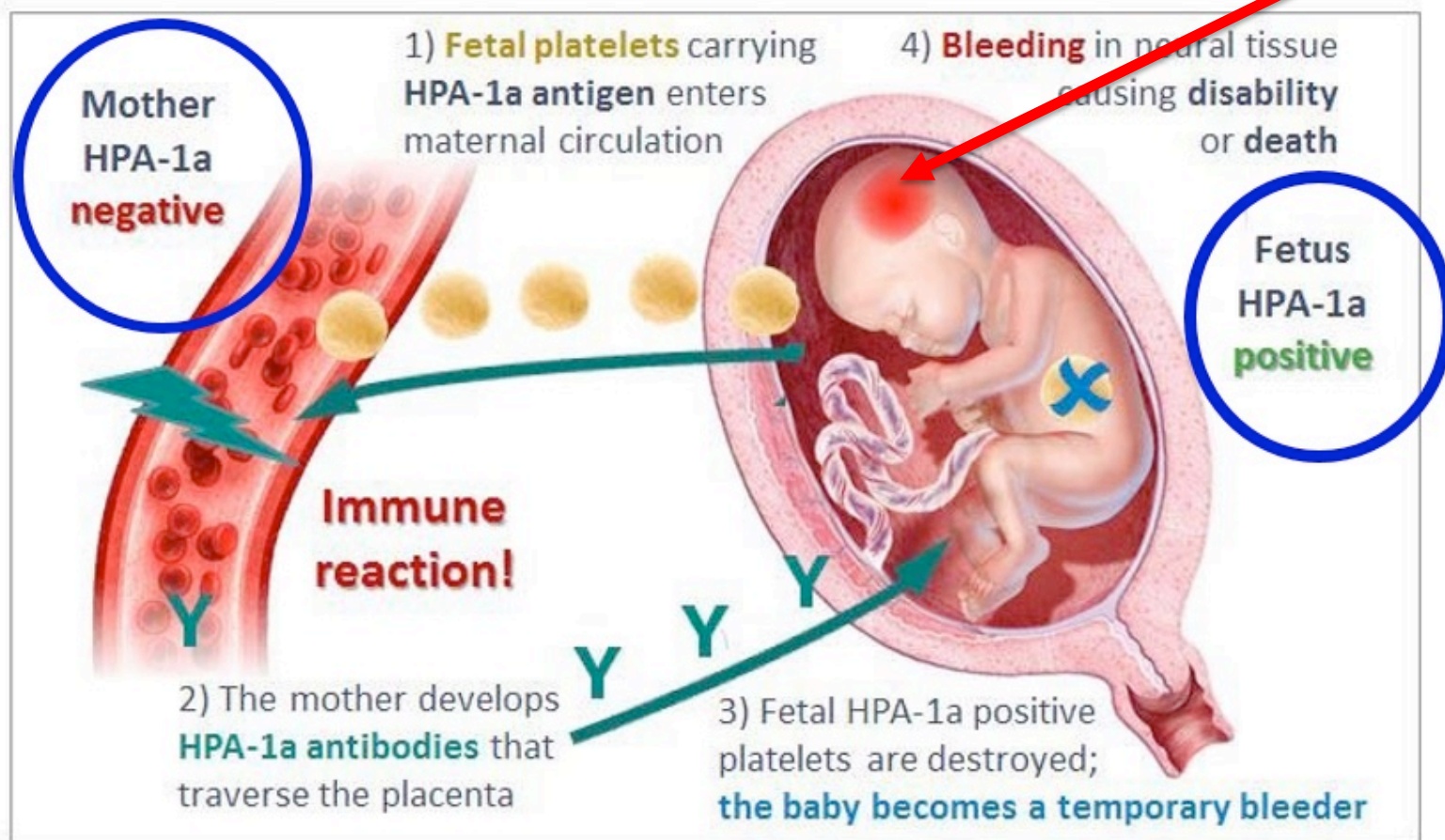




Adaptation from Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. Peterson JA, McFarland JG, Cortis BR, Aster RH. Br J Haematol. Apr 2013; 161(1): 3–14 modified by Platelet Antigen Database - www.versiti.org/medical-professionals/precision-medicine-expertise/platelet-antigen-database#hpa-database

Chez les Caucasiens :

HPA-1 est impliqué dans plus de 70% des cas de FNAIT; HPA-1, -3, -5 and -15 dans plus de 90%.



2021 © Société Française de Transfusion

www.koo-roeselare.be/NL/Nieuws/28
est interdite.

Incidence de FNAIT :

1 pour 1000-2000 naissances vivantes → 10 % HIC → Décès et handicaps profonds



GENOTYPAGE PLAQUETTAIRE FŒTAL



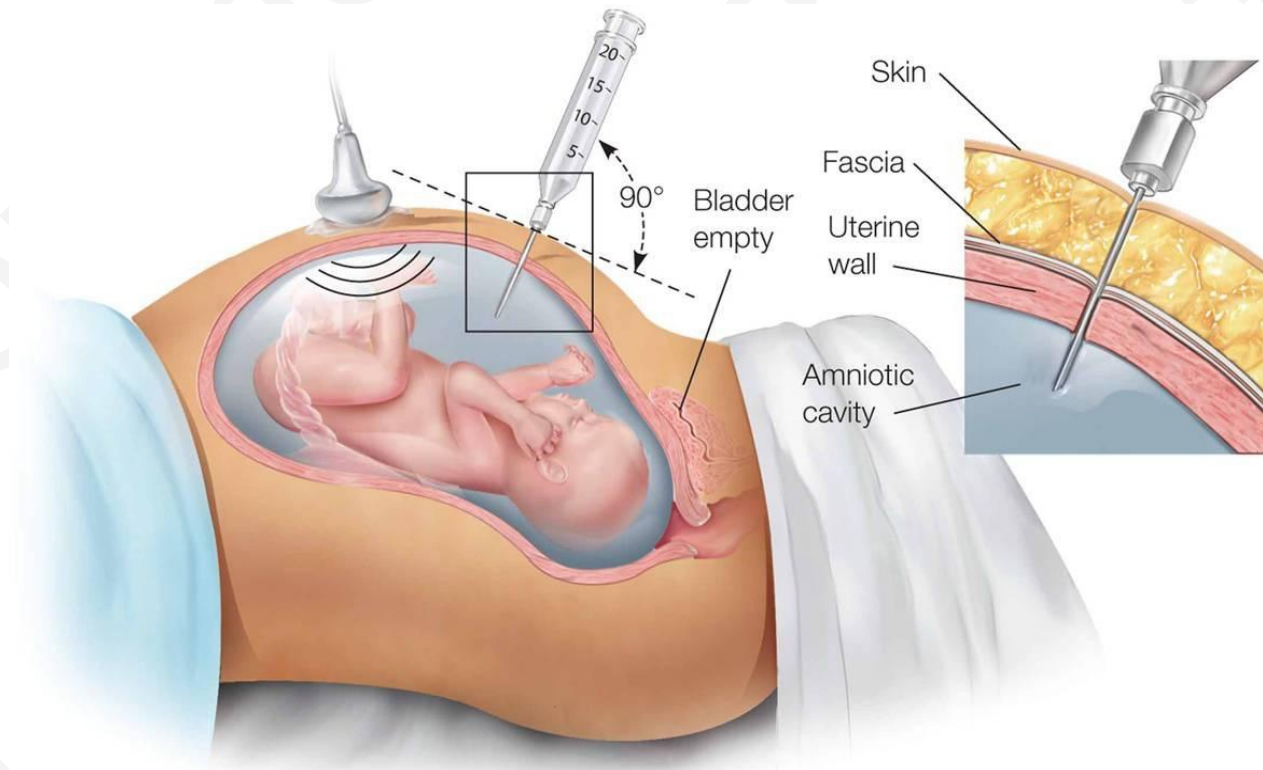
ENJEU

Le diagnostic prénatal est un enjeu majeur pour la prise en charge du fœtus et de la mère :

- Limiter la sévérité de la thrombopénie par l'introduction d'un traitement maternel anténatal par IgIV
- Adapter au mieux la surveillance de la grossesse (biologique, échographique) et discuter la voie d'accouchement
- Adapter la prise en charge transfusionnelle du nouveau-né

METHODES DE RECUEIL

Méthode invasive (DPN):



2021 © Société Française de Transfusion Sanguine. Tous droits réservés.

même partielle est interdite.

→ Obtenir du matériel foetal (liquide amniotique ou cellules trophoblastiques ou prélèvement de sang foetal)

→ Risque de saignements et de fausses couches (1%)
Augmentation du titre d'anticorps et sévérité de la thrombopénie

THE LANCET

Early report

Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum

Y M Dennis Lo, Noemi Corbetta, Paul F Chamberlain, Vik Rai, Ian L Sargent, Christopher W G Redman, James S Wainscoat

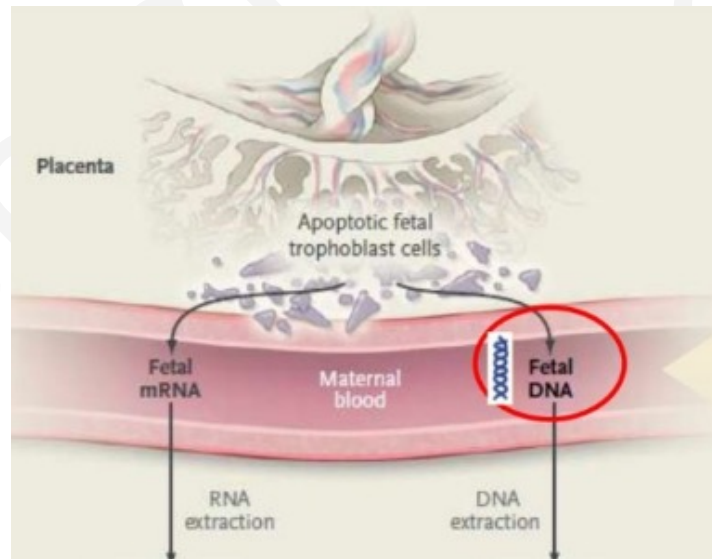
*Lancet 1997; **350**: 485–87*

2021 © Société Française

Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle

Méthode non invasive (DPNI) :

→ Obtenir du matériel foetal à partir d'un prélèvement de sang maternel



elle est interdite.

<https://expertadn.fr/le-test-genetique-non-invasif-de-la-trisomie-13-18-et-21-foetale/>

Lancet 1997; **350**: 485–87

→ Mais difficultés de cette méthode

1. Faible proportion de DNA foetal circulant (3.4 à 6.2%) (*Lo et al, Lancet, 1997*)
2. Fraction foetale (5 à 10%) dépendant de l'âge gestationnel et body mass index

3. Variation de la proportion de DNA fœtal due aux conditions pré-analytiques

- prélèvement d'échantillons de sang (tube EDTA vs tube Cell Free DNA, différents fournisseurs)
(Alidousty et al, *J Mol Diagn*, 2017 et Parackal et al, *Practical Laboratory Medicine*, 2019)
- délai dans la prise en charge de l'échantillon
(Angert et al, *Clin Chem*, 2003)

4. Petite taille des fragments du DNA circulant dans le plasma < 200 pb

(Lo et al, *Prenatal Diagnosis*, 2010)

5. Présence de marqueurs internes pour quantifier le DNA foetal
(Jiang et al, *Bioinformatics*, 2012)

- marqueur génétique (Single Nucleotide Polymorphism (SNP) par exemple)
- marqueur épigénétique (*RASSF1A* gène promoteur)

INDICATIONS

1. Père hétérozygote et mère homozygote pour 1 ou plusieurs systèmes antigéniques HPA

2. Père indisponible ou absent

dans le cas où ATCD de FNAIT +/- associée HIC

Lieberman et al, Br J Haematol, 2019

Petermann et al, J Thromb Haemost, 2018

Tous droits réservés

A new efficient tool for non-invasive diagnosis of platelet antigen incompatibility

Ouzegdouh Mammasse Y, Chenet C, Drubay D, Martageix C, Cartron JP, Vainchenker W, Petermann
Haematol. 2020 Sep;190(5):787-798. doi: 10.1111/bjh.16593

Transf
and H



Transfusion and Apheresis Science

Volume 59, Issue 1, February 2020, 102708



Received: August 8, 2019
Accepted: October 24, 2019
Published online: December 5, 2019

Intro
Bloo
Plas

Recent advances in non-invasive fetal HPA-1a typing

Marion Núria Nogués ^{a, b}

Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Heidelberg University, Medical Faculty Mannheim,
German Red Cross Blood Service Baden-Württemberg – Hessen, Mannheim, Germany

ddPCR

4 systèmes HPA-1,-3,-5 et -15
(n=47)

Avantages : plusieurs HPA
simultanément; promoteur du
gène *RASSF1A* comme
marqueur d'ADN fœtal

ddPCR

2 systèmes HPA-1 et 5
(n=13)

Avantage : 3 SNP bi-
alléliques comme
marqueurs d'ADN fœtal

GENOTYPAGE PLAQUETTAIRE FOETAL

➤ **Terme : à partir de 12 SA**

➤ **2 Prélèvements de sang maternel :**

➤ **Tube Cell Free DNA (≤ 7 jours), volume = 20 mL**

➤ **Rendu de résultats après l'analyse du second prélèvement
(2 déterminations)**



- 1. Extraction of cfDNA from maternal plasma (QIAamp Circulating Nucleic Acid, Qiagen, Germany)**
- 2. Platelet genotyping by ddPCR (QX200 Droplet Digital PCR System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)**



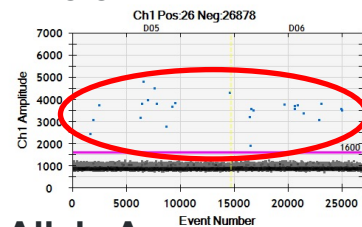
CE-IVD Instruments QX200 AutoDG ddPCR

Droplet Digital PCR – 4 étapes

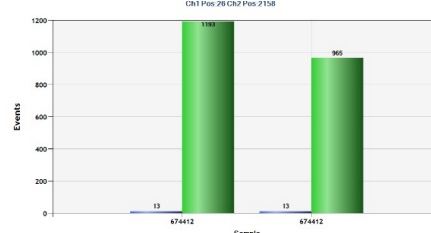
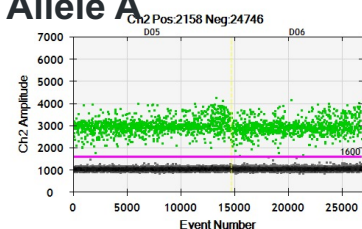
1. Préparation des éch de PCR
(primers + probes + ddPCR supermix + éch DNA)
2. Génération de 20000 gouttelettes
3. Amplification PCR
4. Lecture et analyse des données

HPA-5

Allele B



Allele A



En routine pour chaque plaque

Contrôles : duplicates

- 1 contrôle négatif pour chaque système HPA et *RASSF1A*/ Actin
- 2 contrôles positifs pour chaque système HPA (aa et bb)

Patient : duplicates

- Systèmes HPA testés
- Contrôle Actin B/A digestion
- *RASSF1A* B/A digestion

1 patient avec 2 HPA à étudier : 14 puits pour les contrôles and 8 pour le patient



ETUDE

Octobre 2020 – Juin 2021

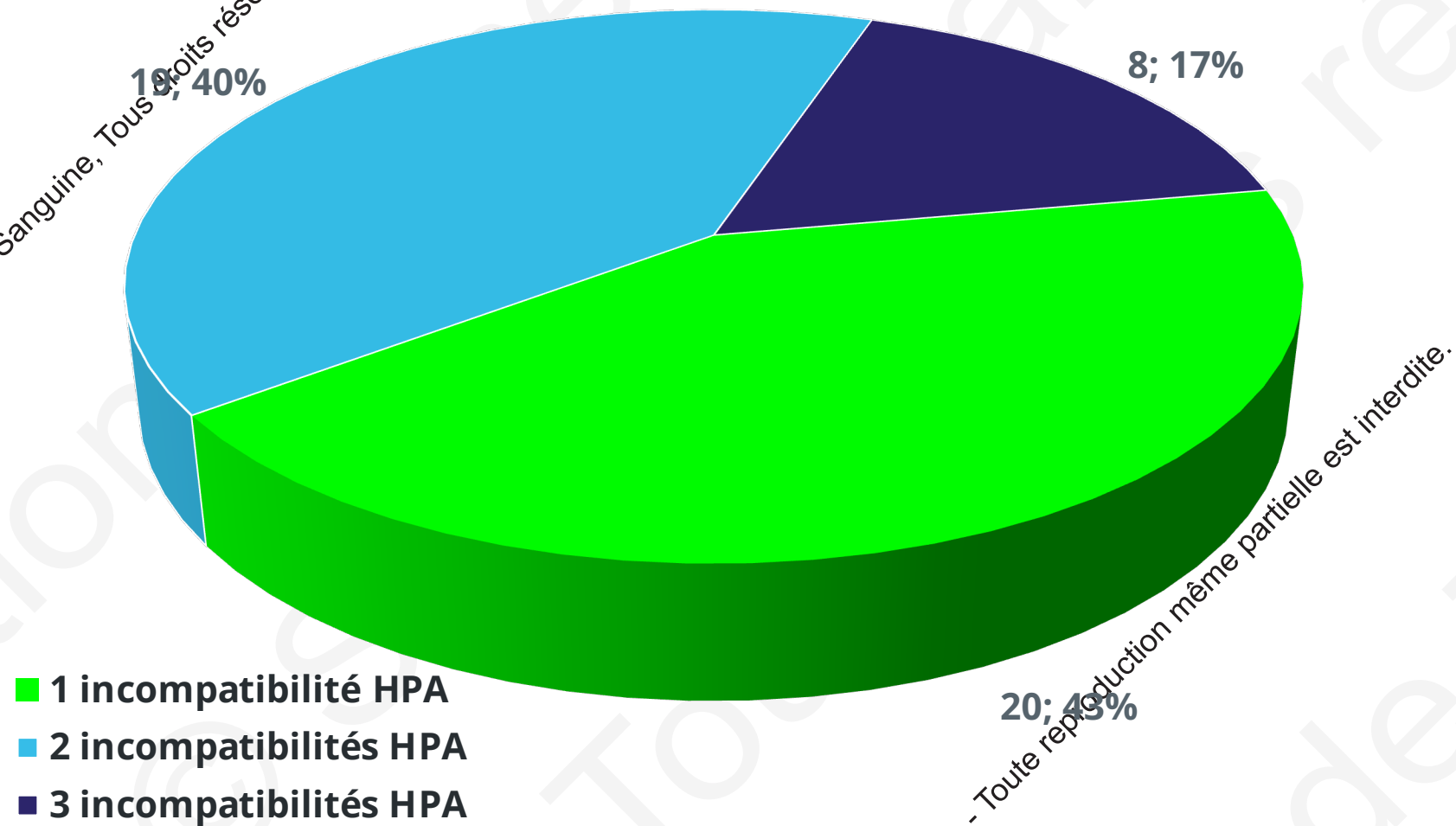
Patientes : n= 47

26 immunisées majoritairement
par des allo-anticorps anti-HPA-5b
(n= 21 soit 44.7%)

Indications du génotypage plaquettaire fœtal cf ISTH

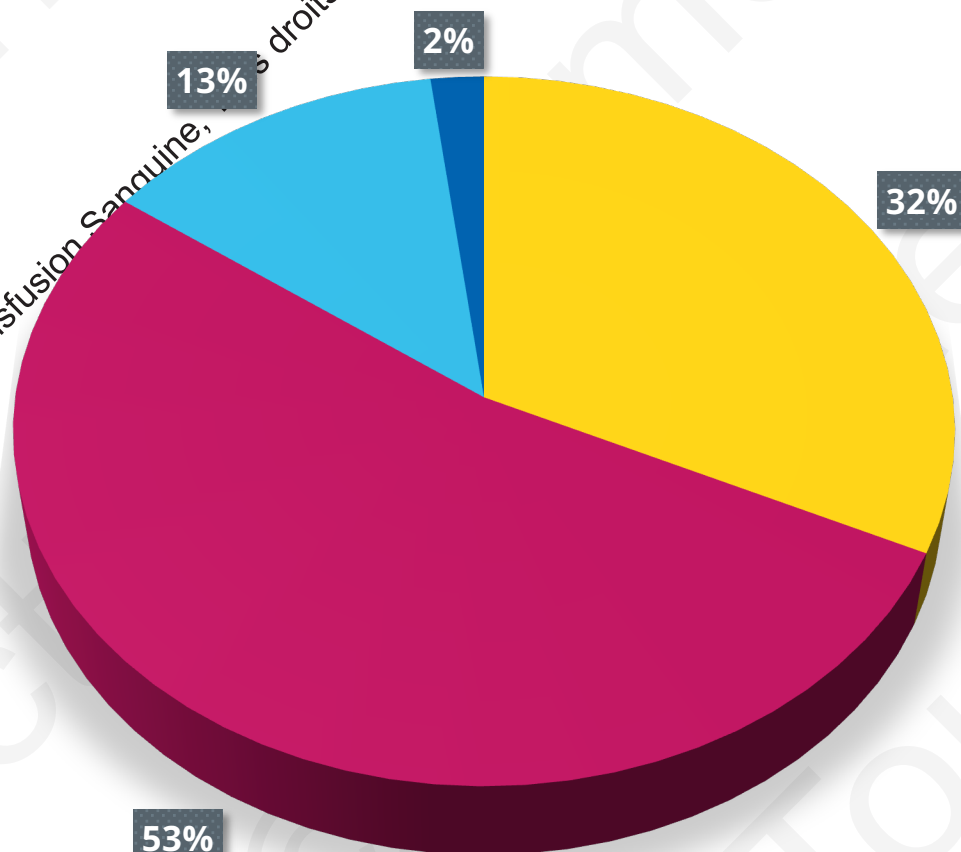
père hétérozygote/mère homozygote
(n=43) ou père absent (n=4) dans un
contexte d'antécédents de FNAIT ou
d'hémorragie intracrânienne (HIC) ou
de découverte d'une HIC pendant la
grossesse

Incompatibilité potentielle entre les 2 conjoints



2021 © Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés

Statut fœtal après génotypage plaquettaire foetal



■ Compatibilité

■ Incompatibilité dans 1 système HPA

■ Incompatibilité dans 2 systèmes HPA

■ Incompatibilité dans 3 systèmes HPA

CONCLUSION

- ✓ Technique de génotypage plaquettaire foetal doit être sensible et fiable
- ✓ **Pour la ddPCR**, guideline de validation exigeant pour définir les paramètres critiques (LoB, LoD, cut-off des contrôles négatif et positif pour chaque allèle) et validation statistique selon un protocole strict
- ✓ **Limites :**
 - ✓ quantité de DNA foetal circulant non maitrisable,
 - ✓ technique très sensible d'où maitrise technique dans un laboratoire de référence
 - ✓ respect des pré-requis analytiques

✓ **Respect des pré-requis analytiques**

- ✓ Volume de 20 mL de sang total (nombre de systèmes à étudier, nouvelle extraction en cas de pb technique)
- ✓ Tube Cell Free DNA (meilleure conservation du DNA foetal circulant par rapport à l'EDTA)
- ✓ Connaître les génotypages des parents (au moins celui de la mère)
- ✓ Nécessité d'avoir tous les documents dûment remplis (terme, traitement, éléments cliniques pertinents...)

- ✓ **Visée prospective de l'étude menée**
 - ✓ Améliorer les pratiques (cf terme d'envoi des échantillons [12 SA et 33 SA + 3]) , impact résultat/ prise en charge)
 - ✓ Elaboration de recommandations
- ✓ **Développement technique en cours (HPA-2 dans un proche avenir)**



**MERCI
POUR VOTRE
ATTENTION**



Tous droits réservés - Tous droits réservés - Tous droits réservés

BioRad



Centre de Recherche des Cordeliers
Plateforme de PCR digitale



Association Recherche et Transfusion



Tous droits réservés

Tous les
praticiens
impliqués dans
les FNAIT en
France, dans les
territoires
d'outre-mer et à
l'étranger pour
l'envoi
d'échantillons
patient

