

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 2^e du III du présent article ;
6. Les autres techniques d'imagerie foetale à visée diagnostique.

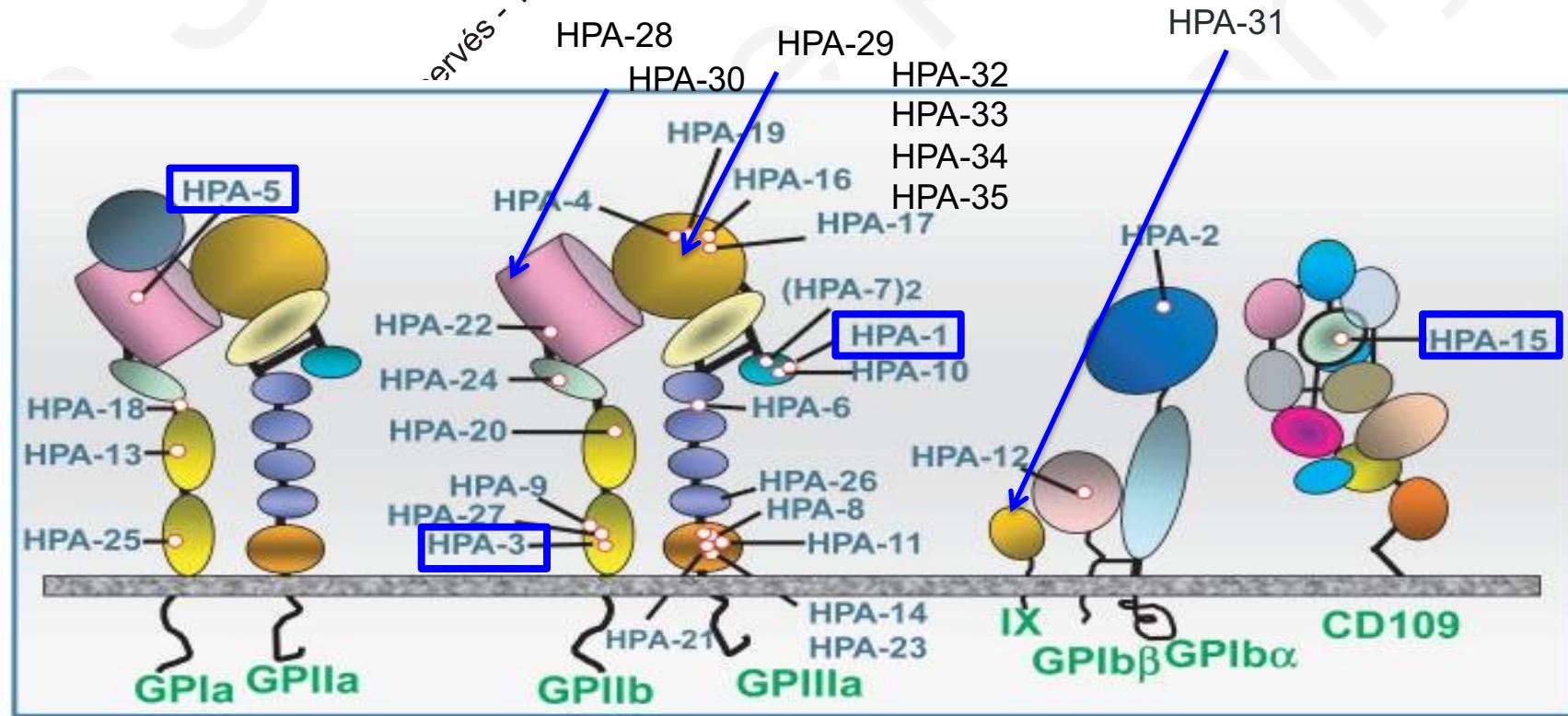


ALLO IMMUNISATION PLAQUETTAIRE MATERNO-FOETALE

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

Tous droits réservés - Toute reproduction partielle est interdite.

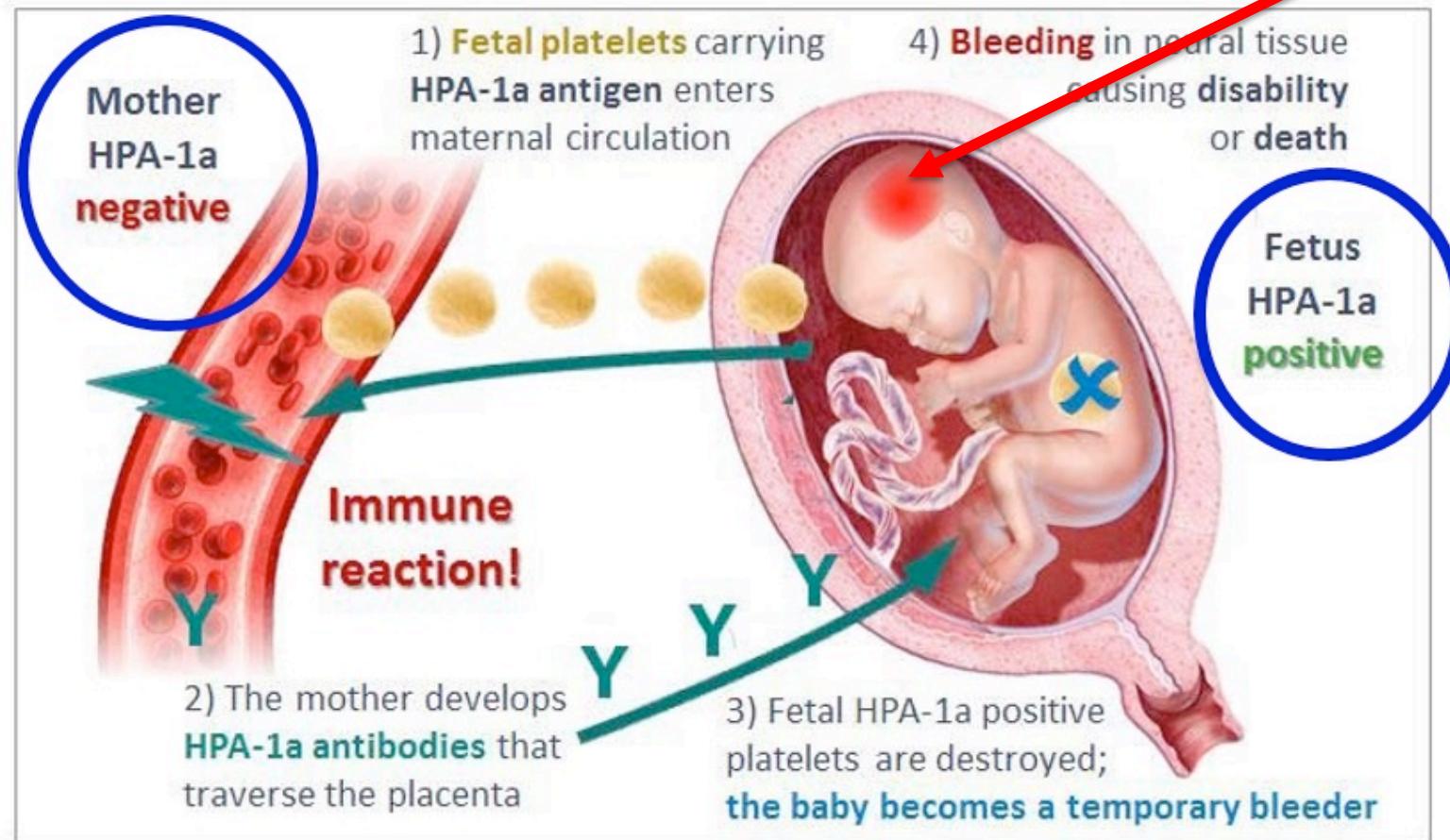




Adaptation from Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. Peterson JA, McFarland JG, Cortis BR, Aster RH. Br J Haematol. Apr 2013; 161(1): 3–14 modified by Platelet Antigen Database - www.versiti.org/medical-professionals/precision-medicine-expertise/platelet-antigen-database#hpa-database)

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%.



Incidence de FNAIT :

1 pour 1000-2000 naissances vivantes →

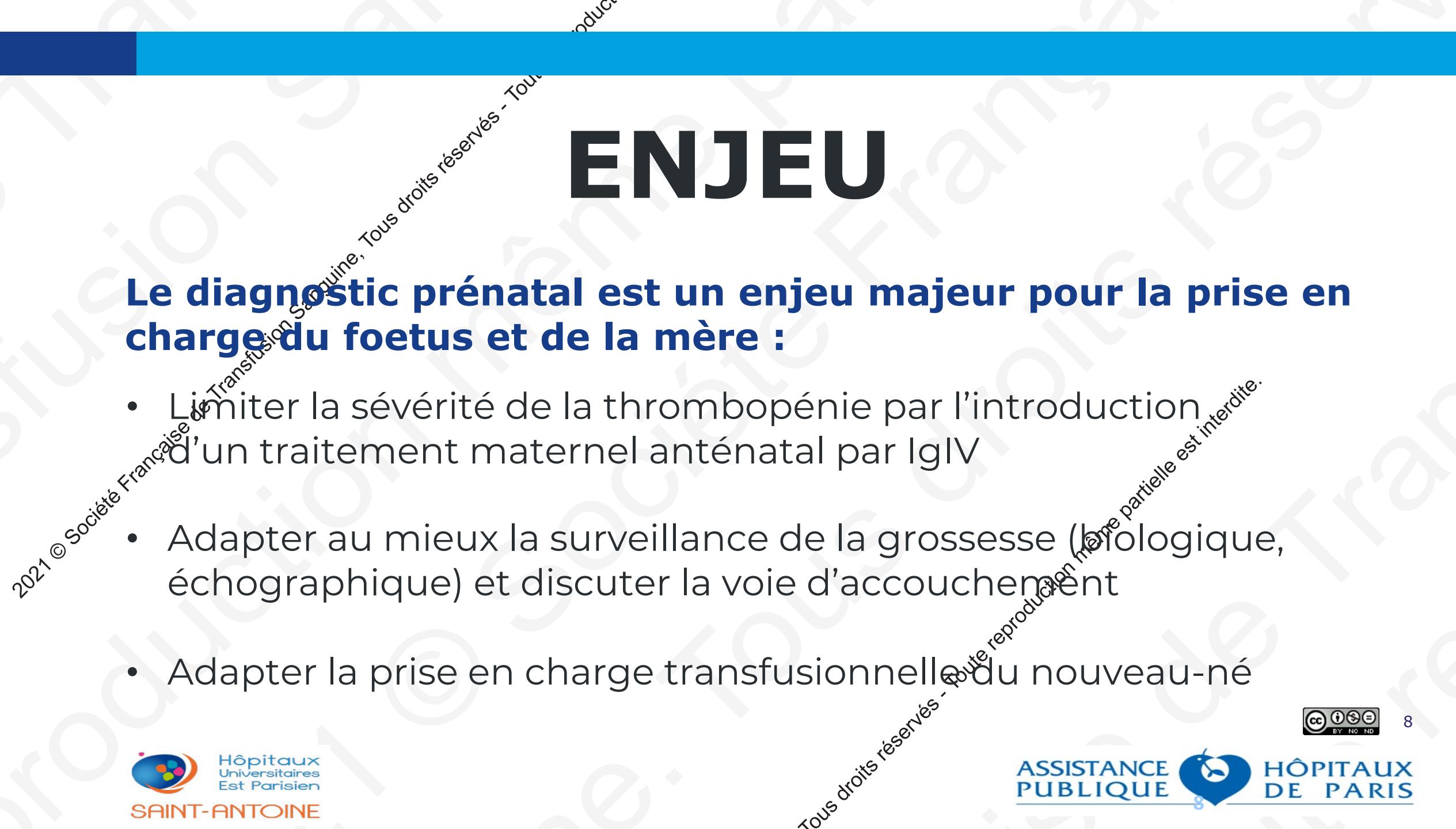
10 % HIC →

Tous droits réservés - Toute Décès et handicaps profonds



GENOTYPAGE PLAQUETTAIRE FŒTAL





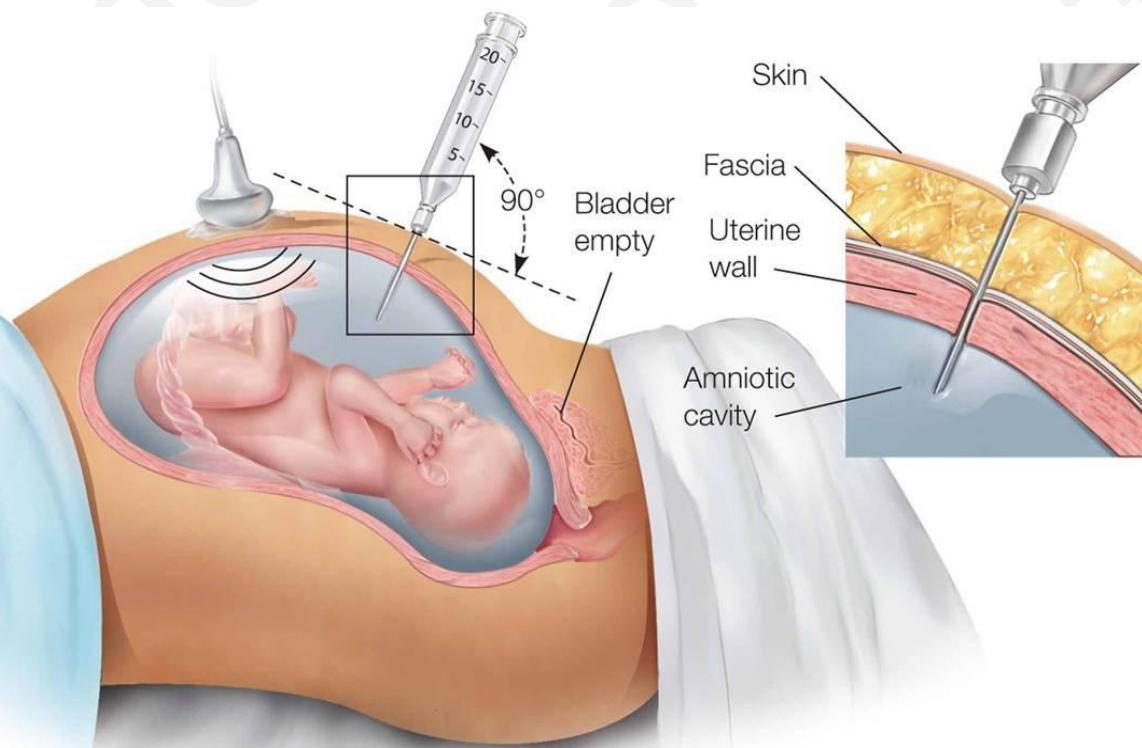
ENJEU

Le diagnostic prénatal est un enjeu majeur pour la prise en charge du foetus 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):



La même partie est interdite.

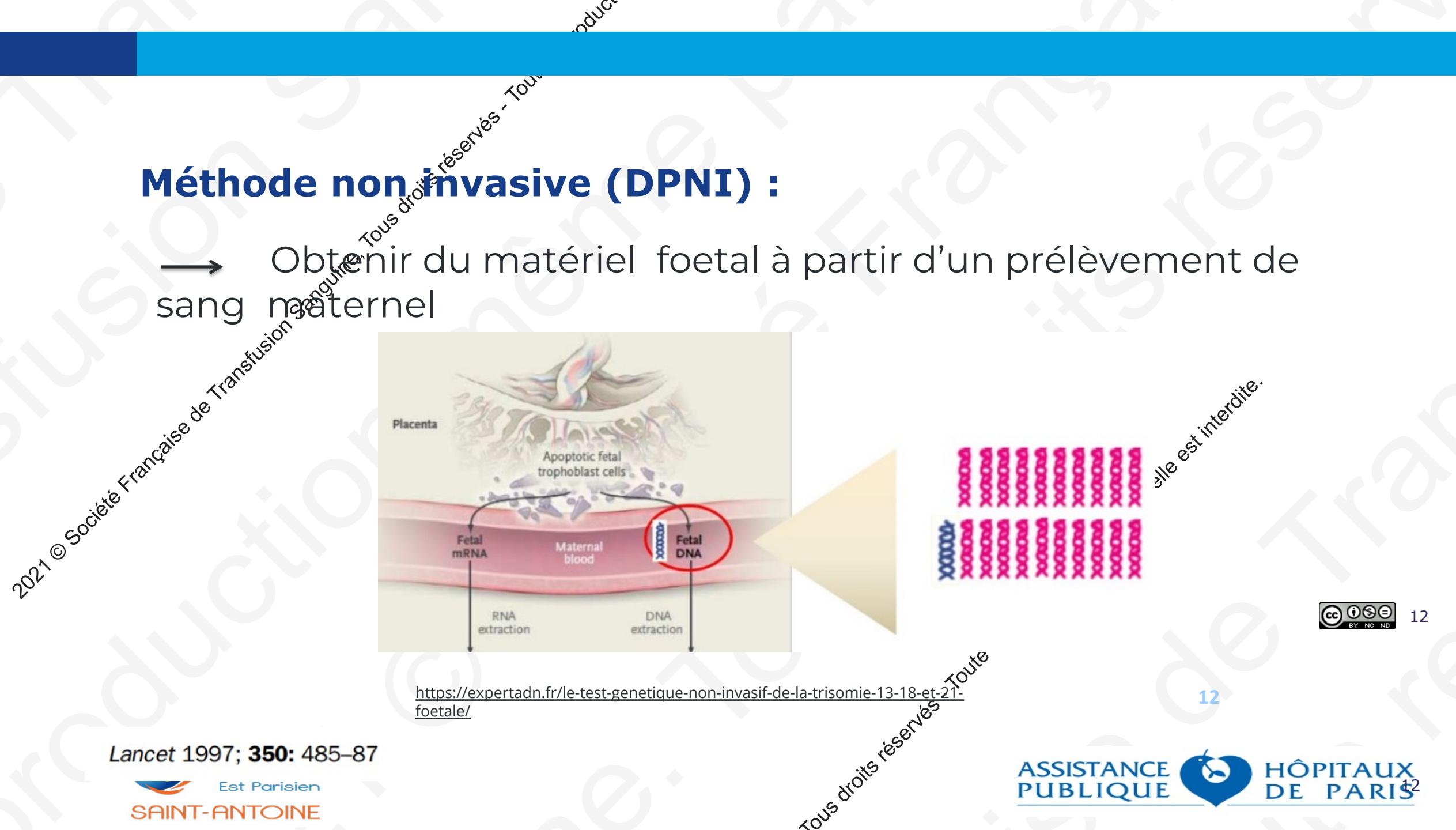
- 2021 © Société Française de Transfusion Sanguine, Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.
- Obtenir du matériel foetal (liquide amniotique ou cellules trophoblastiques ou prélèvement de sang foetal)
 - Risque de saignements et de fausses couches (1%)
Augmentation du titre d'anticorps et sévérité de la thrombopénie

Early report

Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum

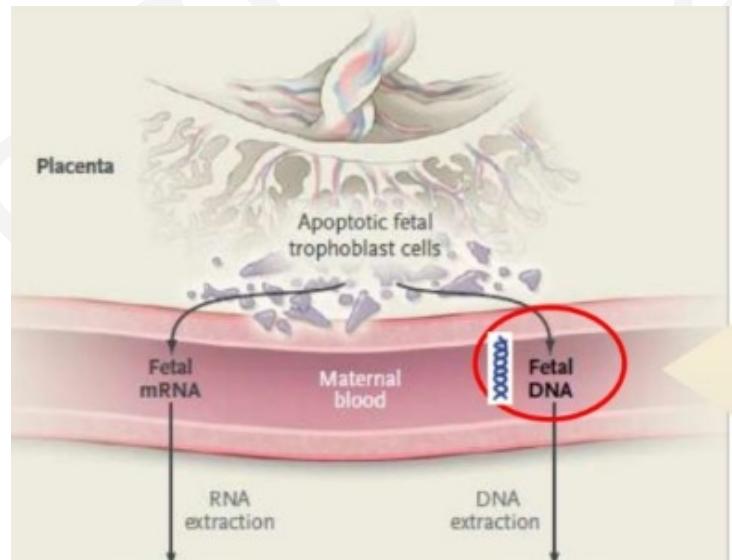
Y M Dennis Lo, Noemi Corbetta, Paul F Chamberlain, Vik Rai, Ian L Sargent, Christopher W G Redman, James S Wainscoat

*Lancet 1997; **350:** 485–87*



Méthode non invasive (DPNI) :

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



elle est interdite.

Lancet 1997; 350: 485–87

→ Mais difficultés de cette méthode

1. Faible proportion de DNA fœtal circulant (3.4 à 6.2%) (Lo et al, Lancet, 1997)
2. Fraction fœtale (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

- prélevement 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 fetal.
(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



Noninvasive fetal genotyping of HPA-1a platelet antigen-1a

PG Scheffer,^{a,b} A Ait Soussan,^a OJHM Verhagen,^a GCML Page-Christiaens,^a M van Espeks,^a M de Haas,^a CE van der Schoot^a

IMMUNOHEMATOLOGY

Safe fetal platelet genotyping:

Emilie Le Toriellec, Christophe Chenet, and Cécile Kaplan

Volume 53, August 2013

Adv Exp Med Biol. 2016;924:67-70.

Non-invasive Prenatal Diagnosis of Feto-Maternal Platelet Incompatibility by Melting Analysis.

Ferro M¹, Macher HC², Noquerol P³, Jimenez-Arriscado P¹, Molinero P¹, Guerrero JM¹, Rubio A⁴.

TRANSFUSION MEDICINE

Noninvasive prenatal diagnosis by cell-free DNA analysis of fetomaternal HPA-1a platelet incompatibility

Marta Ferro,¹ Hada C. Macher,¹ Gema Fornés,² Jesús Martín-Sánchez,³ Pilar Jiménez,⁴ Patrocinio Molinero,¹ José A. Pérez-Simón,³ Juan M. Guerrero,⁴ and Amalia

PCR en temps réel
Mais uniquement pour femmes HPA-1bb (n=34) et absence de marqueur d'ADN foetal (faux neg potentiels)

PCR en temps réel (HRM)
Mais uniquement dans le système HPA-1 et absence de marqueur d'ADN foetal (faux neg potentiels)

PCR en temps réel (HRM)
Mais uniquement dans le système HPA-1 (n=12)

PCR en temps réel (COLD-PCR et HRM)
Mais uniquement dans le système HPA-1 (n=142) et absence de marqueur de DNA foetal

Noninvasive fetal genotyping of human platelets using targeted massively parallel sequencing

Sandra Wienzek-Lischka,¹ Annika Krautwurst,¹ Vanessa Froehner,¹ Stefan Gattenlöhner,² Andreas Bräuninger,² Roland Axt-Fett,² Christina Deisting,³ Sentot Santoso,¹ Ulrich J. Sachs,¹ and Gregor Bein¹

IMMUNOHEMATOLOGY

Prediction of fetal blood group and platelet antigenicity from plasma using next-generation sequencing

Agnieszka Orzirińska,¹ Katarzyna Guz,¹ Michał Mikula,² Anna Kluska,² Aneta Balabas,² Małgorzata Uhyrnowska,¹ Izabella Kopęć,¹ Małgorzata Dębska,⁴ Katarzyna Luterek,⁵ and Ewa Brojer¹

TRANSFUSION Volume 59, March 2019

Transfusion Medicine and Hemotherapy

Review Article

Transfus Med Hemother 2020;47:14–21
DOI: 10.1159/000505161

NGS
Mais femmes HPA-1bb (n=4) et technique longue et coûteuse.
Avantage : 8 SNP utilisés comme marqueurs d'ADN foetal

NGS
5 systèmes HPA-1,-2,-3,-5 et 15 (n=13)
Avantage : 4 SNP sur chr. X comme marqueurs d'ADN foetal

NGS
4 systèmes HPA-1,-3,-5 et 15 (n=200 unpublished)
Avantage : 14 SNP comme marqueurs d'ADN foetal

Potential of Next-Generation Sequencing in Noninvasive Fetal Molecular Blood Group Genotyping

Sandra Wienzek-Lischka Sandy Bachmann Vanessa Froehner Gregor Bein
Institute for Clinical Immunology and Transfusion Medicine, Justus-Liebig University, Giessen, Germany

Tous droits réservés

A new efficient tool for non-invasive diagnostic platelet antigen incompatibility

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

ddPCR
4 systèmes HPA-1,-3,-5 et -15
(n=47)

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

Transfusion
and Haemotherapy



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

Marion

Núria Nogués ^{a, b}

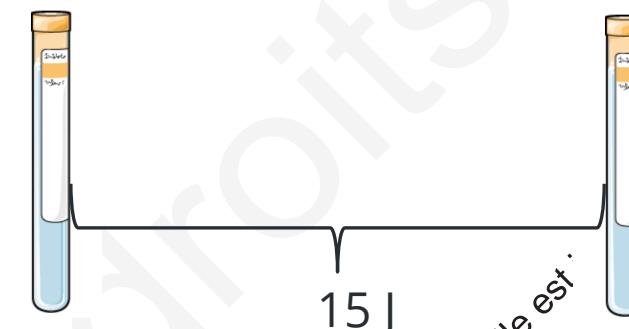
Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Heidelberg University, Medical Faculty Mannheim,
German Red Cross Blood Service Baden-Württemberg – Hessen, Mannheim, Germany

ddPCR
2 systèmes HPA-1 et 5
(n=13)
Avantage : 3 SNP bialléliques 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)**



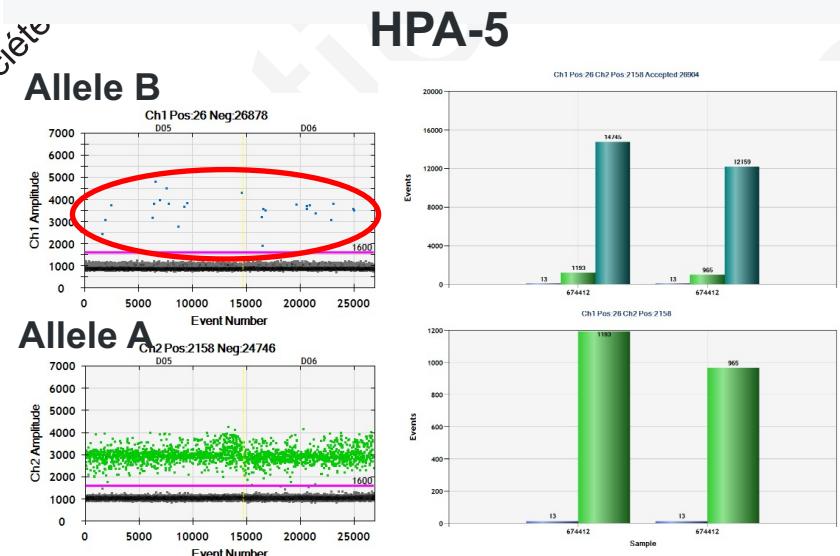
- 1. Extraction of cffDNA from maternal plasma (QIAamp Circulating Nucleic Acid, Qiagen, Germany)**
- 2. Platelet genotyping by ddPCR (QX200 Droplet Digital PCR System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)**



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**



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 sujets 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



Hôpitaux
Universitaires
Est Parisien

SAINT-ANTOINE



22

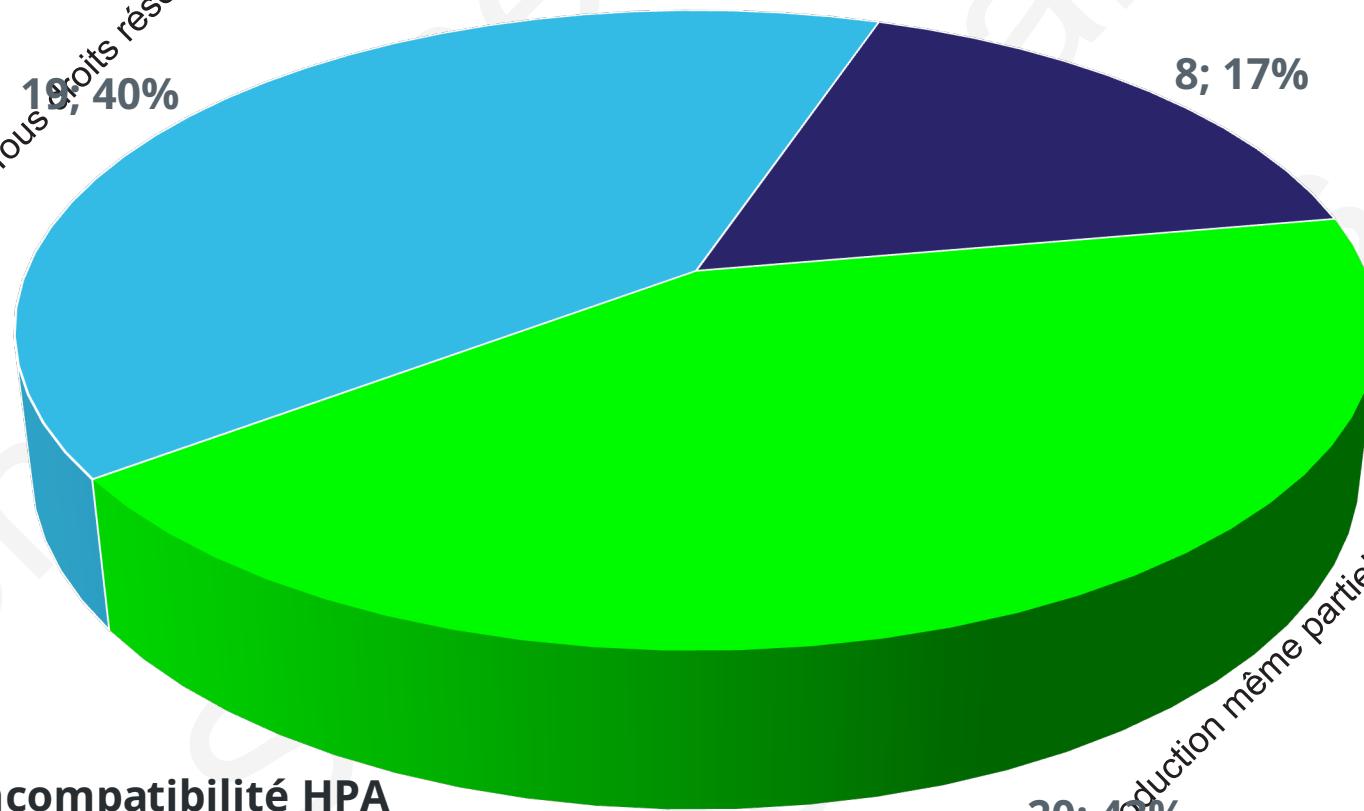
Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle et interdite.

ASSISTANCE
PUBLIQUE



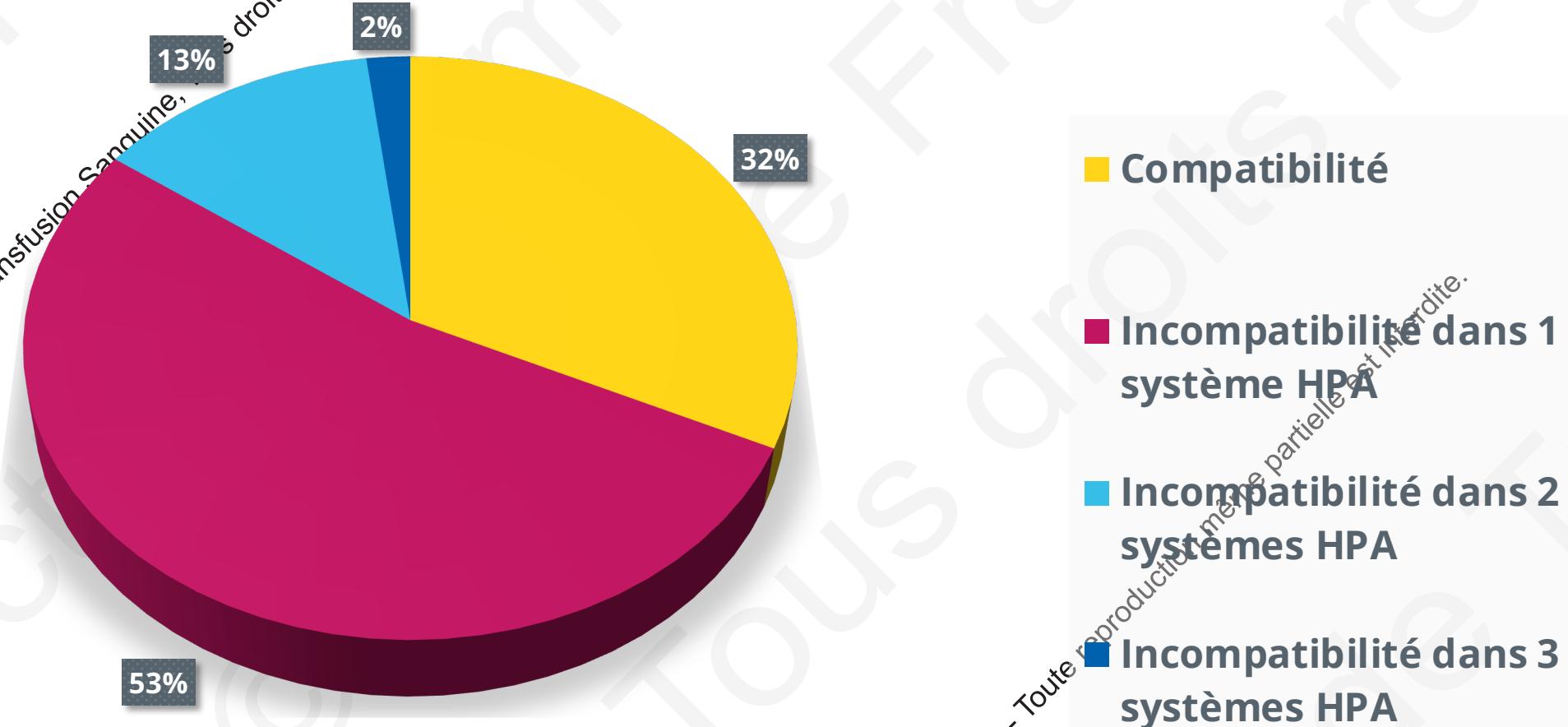
HÔPITAUX
DE PARIS

Incompatibilité potentielle entre les 2 conjoints



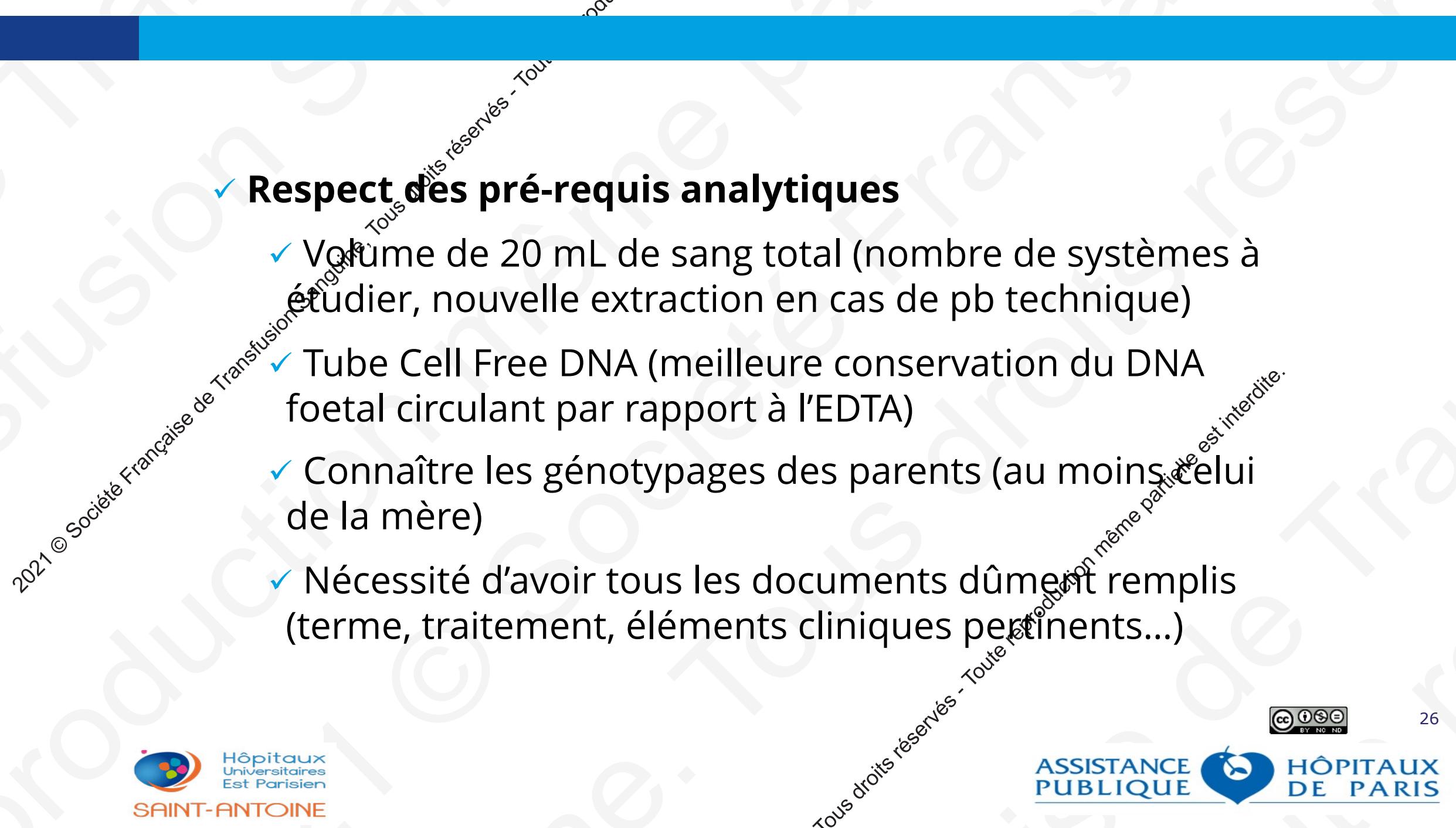
- 1 incompatibilité HPA
- 2 incompatibilités HPA
- 3 incompatibilités HPA

Statut fœtal après génotypage plaquettaire foetal



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 maîtrise 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 + 3J] , impact résultat/ prise en charge)
- ✓ Elaboration de recommandations

✓ Développement technique en cours (HPA-2 dans un proche avenir)



Hôpitaux
Universitaires
Est Parisien

SAINT-ANTOINE



**MERCI
POUR VOTRE
ATTENTION**



ASSISTANCE
PUBLIQUE



HÔPITAUX
DE PARIS



Tous droits réservés - Tous droits réservés

BioRad

BIO-RAD

Association Recherche et Transfusion



Hôpitaux
Universitaires
Est Parisien
SAINT-ANTOINE



Centre National de Référence
en Hémobiologie Périnatale

Centre de Recherche des Cordeliers
Plateforme de PCR digitale



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



Tous droits réservés

ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS