

GENOTYPAGE RHD FŒTAL SUR SANG MATERNEL : UNE AIDE A LA PRISE EN CHARGE DE LA MALADIE HEMOLYTIQUE DU NOUVEAU-NE

FETAL RHD GENOTYPING FROM MATERNAL PLASMA : A HELP IN THE NEONATAL HAEMOLYTIC DISEASE CARE

I. BEN AMOR^{1,2}, J. GARGOURI^{1,2}

1 : Centre Régional de transfusion sanguine de Sfax-Tunisie

2 : Faculté de médecine, Université de Sfax-Tunisie

*e-mail de l'auteur correspondant : ikbeam@yahoo.fr

Résumé

Le génotypage RHD fœtal sur plasma maternel est une méthode novatrice et non invasive dont le principe découle de la présence avérée d'ADN fœtal à l'état libre dans le plasma maternel. Les indications étaient limitées aux patientes alloimmunisées anti-RH1 pour adapter la surveillance et n'appliquer une surveillance spécialisée qu'aux fœtus RH1, pour s'étendre ensuite aux patientes RH:-1 non immunisées afin de limiter l'injection d'immunoglobulines anti-RH1 aux seules patientes porteuses d'un fœtus RH:1 et d'éviter les prophylaxies prénatales inutiles. Plusieurs études dans la littérature ont démontré une excellente concordance entre le génotype RHD fœtal prédit et le phénotype RH1 observé à la naissance.

Mots clé : Rhésus D (RH1) ; Génotype ; Grossesse ; Fœtus

Abstract

The fetal RHD genotyping from maternal plasma is a non-invasive innovative method based on the presence of cell-free fetal DNA in pregnant women plasma, therefore accessible simply through the collection of a maternal peripheral blood sample. It allows the determination of fetal RH1 status in RH1sensitized RH:-1 women in which further surveillance is required. It is also proposed for RH1 negative pregnant women to restrict the use of anti-D immunoglobulins only to those bearing an RH1positive fetus. Several studies have pointed to the accuracy of fetal RHD genotyping with an excellent genotype/phenotype concordance.

Key words: Rhesus D (RH1); Genotype; Pregnancy; Fetus

ملخص

التنميط الجيني RHD للجنين المأخوذ من بلازما الأمهات هو طريقة مبتكرة و غير ضارة و ينبع مبدؤها من وجود ثابت للحمض النووي للجنين في شكل حر في البلازما لدى الأمهات. كانت المؤشرات تقتصر على مكافحة المرضى ذوي مناعة مضادة لـ RH1 قصد تكثيف المراقبة مع الاكتفاء بتطبيق مراقبة مختصة للأجنة حاملي هذا النمط الجيني. ثم شملت هذه الطريقة المرضى غير المطعمين بـ RH1 و ذلك للحد من حقن الجلوبيولين المناعي لاقتصاره على المرضى حاملي النمط الجيني RH1 و من ذلك فإن الوقاية قبل الولادة في هذا الصدد لا لزوم لها. وقد أظهرت عديد الدراسات في الأدبيات الطبية توافق كبير بين النمط الجيني المتوقع RHD للجنين والنمط الظاهري RH1 الملاحظ عند الولادة.

الكلمات المفاتيح: الربص D (RH1) ; النمط الجيني ; الحمل ; الجنين.

1- INTRODUCTION :

Le génotypage Rhésus D (RHD) fœtal sur sang maternel constitue la dernière avancée dans le diagnostic de la maladie hémolytique du nouveau-né (MHNN). Depuis sa découverte pour la première fois au début du XVII^{ème} siècle, cette dernière a connu de nombreuses évolutions dans sa prise en charge diagnostique et préventive marquées essentiellement par la mise en place d'une prophylaxie via l'injection d'immunoglobulines anti-Rhésus D (RH1) [1]. Cette prophylaxie a pour effet d'éliminer les hématies fœtales RH:1 présentes dans le sang d'une mère RH:-1 et, ainsi, d'éviter le développement d'une allo-immunisation anti-RH1 qui comporte un risque pour le fœtus lors d'une grossesse ultérieure. Malgré ces progrès, l'incompatibilité fœto-maternelle due à l'antigène RH1 reste la principale cause d'anémie hémolytique fœtale avec ictère néonatal grave. D'autres antigènes érythrocytaires peuvent, également, en être la cible, en particulier RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c) et KEL1 (K) [2,3]. La technique du génotypage fœtal sur sang maternel repose sur l'amplification par polymérase-chain-reaction (PCR) du gène RHD contenu dans l'ADN fœtal présent dans la circulation maternelle. Elle a bénéficié des progrès réalisés tant dans le domaine du diagnostic prénatal, par l'essor des méthodes non invasives, que dans le domaine de la biologie moléculaire grâce à une meilleure caractérisation moléculaire des gènes des groupes sanguins et des polymorphismes associés à la plupart des antigènes érythrocytaires et à l'amélioration de la sensibilité des techniques d'amplification génique par PCR en temps réel permettant la détection de très faibles quantités d'ADN cible [4,5].

2- HISTORIQUE :

L'historique du génotypage RHD fœtal sur sang maternel va de pair avec celui du diagnostic prénatal. Il a été clairement démontré, il y a plus d'une cinquantaine d'années, qu'il existe un trafic transplacentaire de globules rouges dans le sens fœtus-mère [6,7]. Quelques années plus tard, des lymphocytes fœtaux ont été identifiés et isolés à partir d'échantillons sanguins d'origine maternelle [8-11]. Ces lymphocytes se trouvent en quantité très faible et persistent dans la circulation maternelle pendant plusieurs années après l'accouchement [12,13]. Cependant, la détection de ces cellules

Fœtales s'avère difficile en raison de leur faible nombre. En 1997, la découverte de la présence de séquences d'ADN du chromosome Y chez une femme enceinte par un fœtus de sexe masculin a permis de conclure à la présence de l'ADN fœtal libre dans le sang maternel en quantité relativement élevée par rapport à celle des cellules fœtales intactes. Cette découverte a inauguré l'ère du diagnostic prénatal non invasif, qui en se faisant à partir d'un simple prélèvement sanguin maternel, est devenu plus sécurisant pour l'évolution de la grossesse [14].

L'ADN fœtal libre dans le plasma maternel provient des cellules du cyto- et syncytiotrophoblastes [15-17]. Il circule sous forme de petits fragments d'ADN instable de longueur inférieure à 200 paires de bases [18]. Il est détecté dans le plasma maternel à partir de la 7^{ème} semaine de gestation puis sa concentration augmente tout au long de la grossesse passant de 3,4 % de l'ADN plasmatique total au début de la grossesse à 6,2 % à la fin de la grossesse [4, 19]. Il existe un turn over rapide de l'ADN fœtal puisqu'il disparaît de la circulation maternelle aussitôt après l'accouchement [20-21].

Cependant, l'ADN fœtal libre ne représentant qu'environ 10 % de l'ADN acellulaire contenu dans le plasma maternel, la présence de taux élevés d'ADN maternel provenant des cellules sanguines peut, conséquemment, rendre difficile la détection des allèles fœtaux d'origine paternelle [22]. Cette difficulté a été contournée grâce aux avancées technologiques dans le domaine de la biologie moléculaire. En effet, les techniques de PCR en temps réel permettent d'atteindre des niveaux de sensibilité élevés pour la détection de quantités infimes d'ADN cible. Plus récemment, la PCR digitale, dérivée de la PCR quantitative en temps réel, représente une technologie novatrice et très sensible permettant la détection des allèles rares et leur quantification absolue en s'affranchissant de l'utilisation de standards et de normalisateurs [23]. Parallèlement, les gènes codant pour les protéines du système Rhésus ont été séquencés en totalité. Ce qui a permis d'analyser les bases moléculaires des phénotypes D positifs et D négatifs et des variants de l'antigène D. Ces résultats sont très utiles pour une prédiction fiable du phénotype RhD à partir du génotypage de l'ADN [24-26].

Le premier test de génotypage fœtal a été développé par Bennet et al et a consisté à la détermination de la présence ou l'absence de l'exon 10 du gène RHD par PCR réalisée sur de l'ADN fœtal isolé à partir de prélèvements invasifs

d'aminocytes ou de villosités choriales. Ce qui n'est pas dénué de risques pour le fœtus et peut provoquer l'aggravation de l'alloimmunisation préexistante [27-31].

3- ALLOIMMUNISATION RH1 ET IMMUNOPROPHYLAXIE ANTI-RH1 :

L'allo-immunisation anti-RH1 est devenue une pathologierare. Néanmoins, elle constitue encore la première cause de maladie hémolytique fœtale et néonatale (MHFN) sévèreet la principale indication de la transfusion sanguine intra-utérine et de l'exsanguino-transfusion [32-35].

Elle est secondaire à la synthèse d'allo-anticorps (Ac) anti-RH1 de type IgG (essentiellement IgG1 et IgG3)chez une femme RH:-1 suite à une transfusion incompatible ou à une grossessepar passage transplacentaire d'hématies fœtales RH1 dans la circulation maternelle [36]. Le passage de ces Acà travers le placenta entraîne chez le fœtus puis le nouveau-né RH1 une hémolyse extra-corporeculaire par destruction exagérée des globules rouges. Les conséquences de l'hémolyse néonatale peuvent être gravissimes du fait des séquelles neurologiques et psychomotrices qu'elle peut engendrer par l'accumulation de bilirubine libre et liposoluble au niveaues noyaux gris de la base du crâne (ictère nucléaire).

La prévalence de l'allo-immunisation anti-RH1 dépend de la répartition des groupes sanguins dans le système Rhésus D. Ainsi, elle est plus fréquente chez les caucasiens qui ont l'incidence la plus élevée du phénotype RH:-1 (15- 17 %) et est rare dans les autres groupes ethniques : 5 % chez les noirs africains et 3 % chez les asiatiques [37]. En Tunisie, le groupe RH:-1 représente en moyenne 10 % de la population [38,39].

Depuis la généralisation de la prévention par injection des gammaglobulines anti-RH1, l'alloimmunisation anti-RH1 a connu une baisse spectaculaire dont l'importance dépend du protocole choisi: ⁽¹⁾ prévention à la naissance pour les femmes RH:-1 de nouveau-né RH1 associée à une prévention ciblée au cours de la grossesse sur facteurs de risque d'alloimmunisation (fausses couches, métrorragies, grossesse extra-utérine, interruption volontaire de la grossesse, traumatisme abdominal, biopsie de villosités choriales, amniocentèse, ponction de sang fœtal, cerclage du col, version par manœuvres externes, mort fœtale in utero, traumatisme abdominal)⁽²⁾ prévention à la naissance et protocole systématique à partir de 28 semaines d'aménorrhée.

Quel que soit le protocole utilisé, il persiste des échecs de la prévention. Ainsi, l'application stricte des protocoles est indispensable pour espérer réduire l'incidence des allo-immunisations.

4- INDICATIONS DU GENOTYPAGE RHD SUR SANG MATERNEL :

L'application la plus importante du génotypage fœtal sur sang maternel est la prédiction du phénotype RH1 du fœtus, chez les femmes enceintes immunisées contre l'antigène RH1, afin d'évaluer le risque de maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né. Il permettrait d'adapter la thérapeutique et de ne s'engager dans des surveillances lourdes et coûteuses qu'en cas de nécessité.

La deuxième application de ce test est la détermination du statut RH:1 fœtal chez les patientes RH:-1 non immunisées afin de limiter l'injection d'immunoglobulines anti-RH1 aux seules patientes porteuses d'un fœtus RH:1 et d'éviter les prophylaxies prénatales inutiles pour les femmes RH:-1 portant des fœtus RH:-1. Cette approche permettrait de diminuer d'un tiers l'utilisation d'immunoglobulines chez les femmes RH :-1. En effet, les immunoglobulines actuellement commercialisées proviennent essentiellement de donneurs sains d'Amérique du Nord, hyperimmunisés et rémunérés. Par ailleurs, en tant que produit biologique d'origine humaine, les femmes peuvent être exposées à des effets indésirables sous forme de très rares réactions allergiques et d'hypersensibilité. Le risque viral est extrêmement faible grâce à des méthodes de préparation et de fabrication très sécurisées. Néanmoins, une possibilité de transmission virale ne peut jamais être totalement exclue, notamment avec des virus non encore répertoriés. C'est également le cas pour le prion. Dans tous les cas, l'exposition inutile à des produits dérivés du sang doit être évitée autant que possible surtout que leur disponibilité est limitée et leur coût est élevé [40-41].

5- PRINCIPES TECHNIQUES :

Le principe du test repose sur la recherche d'un gène RHD actif dans le génome fœtal mais absent du génome maternel. Les techniques utilisées testent plusieurs régions du gène RHD afin de détecter les variants les plus fréquents [42]. Cette obligation technique découle directement de la complexité du gène RHD et de la multitude des formes génotypiques associées au phénotype

RH:-1. Ce dernier, caractérisé par l'absence de l'antigène RH1 à la surface de l'érythrocyte, peut être le fait de trois mécanismes moléculaires principaux dont la prévalence est variable en fonction des populations: la délétion totale du gène RHD dans les populations européennes et chinoises, le pseudogène RHD ψ et le gène hybride RHD-CE-D dans les populations africaines [25,42]. Ainsi, au vu d'une littérature riche et croissante, plusieurs approches ont été développées utilisant différentes combinaisons parmi les exons 4, 5, 6, 7 et 10. Les amplicons des exons 4, 5 et 6 sont strictement spécifiques d'un gène RHD actif. L'amplicon de l'exon 7 est spécifique du gène RHD actif et du pseudogène RHD ψ inactif. L'amplicon de l'exon 10 est commun des 3 formes RHD actif et du pseudogène RHD ψ inactif et RHD-CE-D^S. De plus, des contrôles d'échantillons (CCR5 témoignant de la présence d'ADN d'origine maternelle et fœtale dans l'échantillon testé et de l'absence d'inhibiteurs, SRY : spécifique d'ADN fœtal et présent seulement chez les fœtus de sexe masculin) et des contrôles positifs et négatifs (positif, négatif et blanc) sont testés à chaque série. Ces différents amplicons sont révélés grâce à des sondes d'hydrolyse spécifiques de chaque exon amplifié. Pour attribuer ces amplifications au génome fœtal, les cinétiques de fluorescence des exons amplifiés doivent montrer des valeurs de cycles seuil (Ct) hautes (>38) compatibles avec les faibles quantités d'ADN fœtal circulant[43-47].

Cette technique est actuellement mise au point et validée dans de nombreux pays occidentaux avec une excellente corrélation entre le génotype RHD fœtal prédit et le phénotype RH1 observé à la naissance. Ces résultats ont ainsi favorisé le développement d'autres tests pour cibler les Ag C, E, c et K également impliqués dans l'incompatibilité foetomaternelle sanguine [48]. Aujourd'hui des trousse commerciales marquées CE sont disponibles (Free DNA fetal kit RHD, institut de biotechnologie J.Boy, Reims, France) pour réaliser le test sur des échantillons de sang à partir de la 12^{ème} semaine d'aménorrhée [46].

6- CONCLUSION :

Aujourd'hui, la connaissance des gènes et des bases moléculaires des groupes sanguins érythrocytaires fournit la possibilité de prévoir la présence ou l'absence d'un antigène via la détermination de son génotype et ainsi pallier les

risques du prélèvement invasif fœtal. Avec cette approche, il est possible de formuler, avec certaines limites, un phénotype déduit du génotype érythrocytaire. D'un point de vue économique, il serait judicieux d'étudier l'impact économique de la prise en charge des patientes RH :-1 dans notre population face à une prophylaxie moins onéreuse dont l'efficacité clinique est démontrée.

RÉFÉRENCES:

- [1] Mannessier L. follow-up of the fetomaternal alloimmunization. *TransfusClin Biol.* 2003;10 :258-62.
- [2] Daniels G. Blood group antibodies in haemolytic disease of the fetus and newborn. In :HadleyA, Soothill P, eds. *Allo-immune disorders of pregnancy.* Cambridge : Cambridge University Press; 2002. P.21-40.
- [3] Lee S. The value of DNA analysis for antigen of the Kell and Kx blood group system. *Transfusion.* 2007;47:32S-9S.
- [4] Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am JHum Genet.* 1998;62:768 – 75.
- [5] Lo YMD, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM et al. quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum : implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998 ;62 :768-75.
- [6] Zipursky A, Hull A, White FD, Israels LG. foetal erythrocytes in the maternal circulation. *Lancet* 1959; i:451-2.
- [7] Clarke CA. Prophylaxis of rhesus iso-immunization. *Br Med Bull.* 1968; 24:3-9.
- [8] Schroder J. Transplacental passage of blood cells. *J Med Genet.* 1975; 12:230-242.
- [9] Zilliacus R, De la Chapelle A, Schroder J, Tilikainen A, KohneE, Kleihauer E. Transplacental passage of foetal blood cells. *Scand J Haematol.* 1975; 15:333-338.
- [10] Herzenberg LA, Bianchi DW, Schroder J, Cann HM, Iverson GM. Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *ProcNatlAcadSci USA.* 1979; 76:1453-14556
- [11] Lewis DE, Schober W, Murrell S, Nguyen D, Scott J, BoinoffJ, Simpson JL et al. Rare event selection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood by flow cytometry. *Cytometry* 1996; 23:218-227.
- [12] Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA: Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *ProcNatlAcadSci USA* 1996; 93:705-708
- [13] Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA: Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338:1186-1191.
- [14] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485 – 7.
- [15] Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc NatlAcadSci USA* 2005;102:14753 – 8.
- [16] Flori E, Doray B, Gautier E, Kohler M, Ernault P, Flori J, et al. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. *Case report.HumReprod.* 2004;19:723 – 4.

- [17] Bianchi DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential – a review. *Placenta*. 2004; 25(Suppl A):S93 – 101.
- [18] Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2004;50:88 – 92.
- [19] Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2011;306:627 – 36.
- [20] Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218 – 24.
- [21] Nelson M, Eagle C, Langshaw M, Popp H, Kronenberg H. Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma. *VoxSanguinis*. 2001;80: 112 –116.
- [22] Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem*.2002;48:421 – 7.
- [23] Orhant L, Rondeau S, Vasson A, Anselem O, Goffinet E, Allach El Khattabi L, et al. Droplet digital PCR, a new approach to analyze fetal DNA from maternal blood: application to the determination of fetal RHD genotype. *Ann BiolClin*. 2016; 74(3):269-77.
- [24] Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*.2000 ;95 :3662-8.
- [25] Connies M, Westhoff. S. Rh :complexities: serology and DNA genotyping. *Transfusion*.2007 ;47 :17S-22S.
- [26] Connie M westhoff. The structure and Function of the Rh antigen complex. *SeminHematol*. 2007; 44(1): 42-50).
- [27] Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-negative blood group polymorphism as determined by southern analysis. *Blood*. 1991 ;78 :2747-52.
- [28] Bennet PR, Le Van Kim C, Colin Y et al. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *N Engl J Med*. 1993; 329:607-10.
- [29] Adinolfi M, Sherlock J, Kemp T, Carritt B, Soothill P, Kingdom J, et al. Prenatal detection of fetal RhD sequences in transcervical samples. *Lancet*.1995 ;345 :318-9.
- [30] Kingdom J, Sherlock J, Rodeck C, Adinolfi M. Detection of trophoblast cells in transcervical samples collected by lavage or cytobrush. *ObstetGynecol*. 1995;86:283-8.
- [31] Chiu R, Lo Y. Clinical applications of maternal plasma fetal DNA analysis: translating the fruits of 15 years of research. *ClinChem. Lab Med*. 2013; 51(1): 197–204
- [32] Gottvall T, Filbey D. Alloimmunization in pregnancy during the years 1992–2005 in the central west region of Sweden. *ActaObstetGynecol Scand*. 2008; 87: 843–848.
- [33] Howard H, Martlew V, McFadyen I, Clarke C, Duguid J, et al. Consequences for fetus and neonate of maternal red cell allo-immunisation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 1998;78: F62–66.
- [34] Tiblad E, Kublickas M, Ajne G, Bui TH, Ek S, et al. Procedure-related complications and perinatal outcome after intrauterine transfusions in red cell alloimmunization in Stockholm. *Fetal DiagnTher*.2011; 30: 266–273.
- [35] Van Kamp IL, Klumper FJ, Oepkes D, Meerman RH, Scherjon SA, et al. Complications of intrauterine intravascular transfusion for fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol*.2005; 192: 171–177.
- [36] Daniels G, Kinning k, Martin P, Summers J. Fetal RhDgenotyping : A more efficient use of anti-D immunoglobulin. *Transfusion clinique et biologique*. 2007; 14:568-571.
- [37] Race RR, Sanger R. Blood groups in man. Ed Sixth. Blackwell; Oxford, England: 1975.
- [38] Gargouri J, Khmiri H, Feki H, Rekik H, Rekik S. Recherche d'alloimmunisation anti-érythrocytaire en milieu obstétrical. *Tunisie médicale*. 2002 ;80 :255-259.
- [39] Hamida S, Kharrat F, Mojoat N, Dahri R, Boukef K. Polymorphisme du système Rhésus dans la population tunisienne. *Rev Fr Transf Hémobiologie*. 1993 ;36 :191-6.
- [40] Guinchard E, Bricca P, Monnier S, Rigal D. RHD foetal sur plasma maternel : validation de méthode sur 200 patientes. *Transfusion cliniqueetbiologique*. 2014 ;21 :1-14.
- [41] Daniels G, Kinning K, Martin P, Soothill P. fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma : an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *VoxSanguinis*. 2004;87:225-232.
- [42] Westhoff CM. Rh complexities: serology and DNA genotyping. *Transfusion*. 2007;47(1 Suppl):17S-22S.
- [43] Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion*. 2002 Aug;42(8):1079-85
- [44] Minon JM, Schaaps JP, Retz MC, Dricot JF, Foidart JM, Senterre JM. Prenatal determination of fetal RHD in maternal plasma: two-years experience of routine clinical use. *J GynecolObstetBiolReprod (Paris)*. 2005;34(5):448-53.
- [45] Rouillac-Le Sciellour C, Puillandre P, Gillot R, Baulard C, Métral S, Le Van Kim C 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(1):23-31.
- [46] Rouillac-Le Sciellour C, Sérazin V, Brossard Y, Oudin O, Le Van Kim C, Colin Y et al. Non invasive fetal RHD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD. *TransfusClin Biol*. 2007;14(6):572-7.
- [47] Avent ND. RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges. *Methods MolBiol*. 2008;444:185 – 201.
- [48] Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens GC, de HaasM. Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c,E and of K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience. *Br J ObstetGynecol*. 2011;118:1340 – 8.