

Utilisation en routine clinique du génotypage fœtal *RHD* sur plasma maternel : bilan de deux ans d'activité

J.-M. Minon*, J.-P. Schaaps**, M.-C. Retz**, J.-F. Dricot**, J.-M. Foidart**, J.-M. Senterre*

* Service de Biologie Clinique, CHR de la Citadelle, boulevard du 12^e-de-Ligne-1, 4000 Liège, Belgique.

** Service de Gynécologie-Obstétrique, CHU de Liège, Hôpital de la Citadelle, boulevard du 12^e-de-Ligne-1, 4000 Liège, Belgique.

RÉSUMÉ

Objectifs. Évaluer la valeur prédictive du génotype fœtal *RHD* sur plasma maternel de mères Rh D négatif dès 10 semaines de grossesse en pratique clinique.

Matériel et méthode. Étude comparative, prospective entre le génotypage fœtal *RHD* sur plasma maternel par amplification des exons 4,5,10 du gène *RHD* en PCR multiplex temps réel réalisé lors de 218 grossesses et le phénotype Rh D obtenu chez les 223 nouveau-nés, entre novembre 2002 et 2004.

Résultats. La concordance entre le génotypage fœtal *RHD* sur plasma maternel et le phénotypage Rh D à la naissance est de 100 % en combinant l'amplification des trois exons. Une réaction positive isolée en PCR pour l'exon 10 était observée dans 4 grossesses dont les nouveau-nés étaient Rh D négatif. Cette positivité était liée dans trois cas à la présence du pseudogène *RHD* ψ et dans un cas, à un haplotype *Cde*^s (r's). Le génotypage *RHD* dans cinq grossesses gemellaires est rapporté.

Conclusion. La valeur prédictive du génotypage *RHD* fœtal sur plasma maternel est parfaite. Cette technique est la méthode de choix pour évaluer le statut Rh D fœtal chez les mères Rh D négatif. Depuis 2 ans, elle a modifié notre prise en charge des patientes allo-immunisées anti-D.

Mots-clés : Génotypage *RHD* fœtal • Plasma maternel • Pratique clinique.

SUMMARY

Prenatal determination of fetal *RHD* in maternal plasma: two-years experience of routine clinical use.

Objectives. To evaluate the predictive value of *RHD* fetal genotype in maternal plasma of Rh D negative mothers after 10 weeks of gestation in a clinical use.

Material and method. Prospective, comparative study between fetal *RHD* genotyping in maternal plasma, with amplification of exons 4,5,10 of the *RHD* gene, by real-time multiplex PCR, and Rh D serology at birth, in 218 pregnancy and their 223 babies, between November 2002 and 2004.

Results. Combining the amplification of three exons, the concordance rate of fetal Rh D genotyping in maternal plasma and baby phenotyping at delivery was 100%. Four women whose the babies were Rh D negative were positive for *RHD* exon 10 during pregnancy. This positivity was, in three cases, correlated with the presence of *RHD* ψ pseudogene and in last case, with a haplotype *Cde*^s (r's). *RHD* genotyping was performed for five twin pregnancies.

Conclusion. Multiplex PCR using maternal plasma provides perfect prenatal prediction of fetal *RHD* gene. These results confirm that this non invasive procedure is the preferred method for assessing Rh D fetal status in Rh negative mothers. Using this method for two years in routine practice has led us to modify our management scheme for sensitized Rh D-negative pregnant women.

Key words: Fetal *RHD* genotype · Maternal plasma · Routine clinical use.

L'allo-immunisation anti-Rh D (RH 1) reste la principale cause d'anémie hémolytique fœtale [1]. Depuis une dizaine d'années, la détermination du statut Rh D fœtal par génotypage sur cellules amniotiques est une technique validée et utilisée dans le suivi obstétrical des patientes Rh D négatif (RH:-1) allo-immunisées anti-D [2, 3]. La ponction de liquide amniotique n'est cependant pas dénuée de risques soit de perte fœtale, soit d'aggravation d'une allo-immunisation anti-D préexistante.

L'avènement récent du génotypage *RHD* fœtal sur plasma maternel permet de rechercher la présence du gène *RHD* du fœtus chez les mères Rh négatif sans nécessiter de prélèvement invasif [4, 5].

Cette nouvelle approche du génotype fœtal sur plasma maternel repose sur trois éléments majeurs. Elle se fonde d'abord sur la présence d'ADN fœtal libre dans le plasma maternel, mis en évidence par Lo *et al.* [6]. La quantité d'ADN fœtal augmente en cours de grossesse. Elle est estimée à 3,4 % (25 équivalents génome fœtal/ml de plasma maternel) et à 6,2% (100 équivalents génome fœtal/ml de plasma maternel) de l'ADN plasmatique total maternel aux 1^{er} et 3^e trimestres de grossesse respectivement [7]. Cet ADN circulant disparaît rapidement après l'accouchement [8].

Ensuite, les techniques de *Polymerase Chain Reaction* en temps réel ou PCR cinétique atteignent des niveaux de sensibilité et spécificité supérieurs aux techniques d'amplification conventionnelles accompagnées d'électrophorèse [9]. Elles permettent l'étude de l'ADN fœtal trouvé en très faible quantité dans le plasma maternel.

Enfin, le gène recherché doit être présent dans le génome fœtal mais absent du génome maternel. Dans la population caucasienne, une délétion complète du gène *RHD* est la cause la plus commune du manque d'expression de l'antigène Rh D [10]. Ainsi, la détection de séquences du gène *RHD* dans le plasma d'une patiente enceinte Rh D négatif (qui ne possède pas le gène *RHD*) indique la présence d'un fœtus Rh D positif. Cependant, l'existence de variants du gène *RHD* [11] principalement dans d'autres populations, peut conduire à des erreurs par défaut ou par excès dans le diagnostic prénatal selon que l'antigène Rh D est exprimé ou non [12-15].

Après une période de mise au point et d'évaluation [16, 17], cette technique est utilisée en routine clinique dans la prise en charge de nos patientes Rh D négatif depuis novembre 2002. Cette étude prospective évalue la concordance entre les résultats des génotypes *RHD* fœtal obtenus sur sang maternel par PCR cinétique et les résultats des phénotypes sérologiques Rh D des nouveau-nés.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Patientes et échantillons

Deux cent dix-huit femmes enceintes Rh D négatif ont été prélevées en cours de grossesse. Les principales indications étaient le suivi de patientes allo-immunisées anti-D, le suivi de patientes à risque d'allo-immunisation, avant la réalisation d'actes invasifs, dans un contexte ou dans des circonstances obstétricales potentiellement immunisants. Cinq patientes avaient une grossesse gémellaire. Deux cent dix-huit résultats de génotype *RHD* fœtal ont été comparés au phénotype Rh D déterminé par sérologie chez les 223 nouveau-nés. La moyenne d'âge gestationnel à laquelle a été réalisé le génotypage était de 19,6 semaines, la médiane de 18,0 semaines. Les limites allaient de 10 à 36,1 semaines. Le nombre de femmes testées au 1^{er} trimestre de grossesse (< 14 SA) était de 12, au 2^e trimestre de 179 (< 27 SA) et au 3^e trimestre de 27. Il y avait treize couples d'origine africaine dont trois d'Afrique du Nord, une mère d'origine caucasienne avec un partenaire africain et un couple asiatique.

Deux tubes EDTA sous vide de 3 ml ont été prélevés chez chaque patiente. Dans les 12 heures du prélèvement, les plasmas ont été séparés après une double centrifugation, l'une à 3000 g pendant 10 minutes, la seconde à 10.000 g pendant 10 min. Les couches leuco-plaquettaires ont été conservées. Le tout a été congelé à -20 °C en tube stérile. Les différentes étapes de séparation ont été réalisées sous hotte à flux laminaire.

Dans un but de standardisation et afin d'éviter toute contamination, l'extraction de l'ADN à partir de 850 µl de plasma a été automatisée et réalisée en système clos avec le COBAS AmpliPrep[®]. Le volume de l'éluat était de 70 µl. La prise d'essais était de 10 µl d'extrait par PCR. Pour chaque patiente, les amplifications ont été faites en doubles à partir de deux extractions différentes (2 × 850 µl).

Amorces et sondes

Plusieurs couples d'amorces ont été utilisés pour amplifier des fragments des exons 4, 5 et 10 du gène *RHD* (tableau I). Les sondes et amorces (Eurogentec[®]) pour l'exon 4 et 5 décrites par Finning *et al.* [18] ont été modifiées et adaptées, celles pour l'exon 10 étaient celles utilisées par Lo *et al.* [19]. Les parties amplifiées de l'exon 4 et 5 étaient spécifiques du gène *RHD* mais pas du pseudogène *RHDψ* ni du gène *RHCE*. Comme contrôle interne, nous avons utilisé en PCR duplex l'amplification simultanée du gène *SRY* (chromosome Y) avec celle de l'exon 5 qui, pour les fœtus mâles, confirmait, en cas de positivité, la présence d'ADN fœtal.

L'amplification du gène *CCR5* (gène ubiquitaire d'un récepteur aux chémokines) en duplex avec l'exon 10 indiquait la présence d'ADN, indistinctement maternel et fœtal, dans l'éluat. Des contrôles positifs (RH:1) et négatifs (RH:-1) ont été introduits dans chaque série. L'ADN était amplifié ainsi dans quatre puits selon l'ordre suivant : exon 4, exon 5 et *SRY*, exon 10 et *CCR5*, *SRY* seul.

La PCR cinétique par la méthode TaqMan® a été automatisée sur l'instrument ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). À des fins d'uniformisation, toutes les amplifications ont été réalisées dans les mêmes conditions techniques (volume, température, incubation).

Tableau I Amorces et sondes utilisées. Primers and probes used.

Exon 10 (<i>RHD 10</i>) ^a	F ^d	5 'CCTCTCACTGTTGCCTGCATT3 '
	R ^e	5 'AGTGCCTGCGCGAACATT3 '
	P ^f	5 '(FAM)TACGTGAGAAACGCTCATGACAGCAAAGTCT(TAMRA)3 '
Exon 4 (<i>RHD 4</i>) ^b	F ^d	5 'CTGCCAAAGCCTCTACACG3 '
	R ^e	5 'ATGGCAGACAAACTGGGTGTC3 '
	P ^f	5 '(FAM)TTGCTGTCTGATCTTTATCCTCCGTTCCC(TAMRA)3 '
Exon 5 (<i>RHD 5</i>) ^b	F ^d	5 'CGCCCTCTTCTTGIGGATG3 '
	R ^e	5 'GAACACGGCATTCTTCTTTC3 '
	P ^f	5 '(FAM)TCTGGCCAAGTTTCAACTCTGCTCTGCT(TAMRA)3'
<i>SRY</i> ^c gène (X53772)	F ^d	5'TGGCGATTAAGTCAAATTCGC3'
	R ^e	5'AACGTTGACTACTTGCCCTGC3'
	P ^f	5'(YY)ACAGCAGTAGAGCAGTCAGGGAGGCAGATC(Darquencher)3'
<i>CCR5</i> Gène	F ^d	5'TACCTGCTCAACCTGGCCAT3'
	R ^e	5'TTCCAAAGTCCCCTGGGC3'
	P ^f	5'(YY)TTTCCTTCTACTGTCCCCTTCTGGGCTC(Darquencher)3'

^a Décrit par Lo *et al.* [19], ^b modifiés à partir de Finning *et al.* [18], ^c modifiés à partir de Lo *et al.* (6), ^d F : amorce sens, ^e R : amorce anti-sens, ^f P : sonde.

RÉSULTATS

Un fœtus était considéré comme porteur du gène *RHD* lorsqu'une amplification concomitante des trois exons était observée. Lorsque le sexe du fœtus était connu par échographie, la validation des résultats pour un fœtus de sexe masculin nécessitait une amplification du gène *SRY*. Dans toutes les situations, le gène *CCR5* devait toujours être amplifié.

Pour les 213 grossesses unifœtales, le génotypage prédisait la présence de 137 fœtus Rh D positif (64,3%) et 76 fœtus Rh D négatif (35,7%). Ces patientes ont accouché respectivement de 137 nouveau-nés antigène Rh D positif et 76 antigène Rh D négatif. Cent quatre nouveau-nés étaient de sexe féminin et cent neuf de sexe masculin (*tableau II*).

À partir des résultats en doublon obtenus sur l'ensemble des amplifications, la sensibilité pour l'exon 4, 5 et 10 était respectivement de 93,9%, 97,8% et 98,7%. Cependant aucun faux négatif, défini par l'absence d'amplification des trois exons, n'a été trouvé chez les enfants Rh D positif. Toutes les mères dont les enfants étaient Rh D positif (n = 137) avaient eu un génotypage sur leur plasma révélant la présence du gène *RHD*.

La spécificité de l'amplification des exons 4, 5 était de 100%. Aucune amplification n'était observée chez les 76 mères dont l'enfant était Rh D négatif. En revanche, la spécificité pour l'exon 10 était de 93% et liée à quatre faux positifs (*tableau III*). Ces observations concernaient trois mères non caucasiennes.

Chez les patientes 1 et 3 africaines, l'analyse du DNA extrait de la couche leuco-plaquettaire maternelle par PCR conventionnelle confirmait la présence du pseudogène *RHDψ* [20]. Ce pseudogène n'est pas traduit en protéine Rh D et est donc non fonctionnel. Chez la patiente 2, ce pseudogène était retrouvé non chez la mère caucasienne mais chez le père d'origine africaine.

Une positivité isolée sur l'exon 10 était également observée sur le plasma de la patiente 4. Cette amplification était négative sur la couche leuco-plaquettaire maternelle ainsi que la recherche du pseudogène *RHDψ*. Chez le père, de phénotype CcDee, les exons 4,5 et 10 étaient tous amplifiés mais l'amplification de la séquence de l'intron 2 du gène *RHCE*, spécifique du phénotype C, était négative. L'hypothèse retenue est que l'enfant a hérité de l'haplotype Cde^s (r's) de son père d'origine africaine codé par un gène hybride *RHD-RHCE* [21, 22]. Ce gène hybride, avec perte d'expression de l'antigène Rh D, est susceptible de donner des réactions faussement positives avec l'exon 10 spécifique du gène *RHD* [5].

Des génotypages sur plasma ont été réalisés chez cinq patientes avec grossesses gémellaires (*tableau IV*). Ces génotypages ont 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.

Tableau II Résultats des grossesses uni-fœtales. Results of the singleton pregnancies.

	Nombre de patientes	Génotypage fœtal sur plasma maternel		Pourcentage de concordance avec le phénotypage Rh D (et sexe) des nouveau-nés
		<i>RHD</i> +/ <i>RHD</i> -	SRY +/ <i>SRY</i> -	
1 ^{er} trimestre	12	8/4	5/7	100
2 ^e trimestre	175	109/66	96/79	100
3 ^e trimestre	26	20/6	8/18	100
Total	213	137/76	109/104	100

Tableau III Exploration des patientes avec une amplification isolée de l'exon 10. Exploration of patients with an isolated amplification of exon 10.

	PCR sur plasma maternel exons 4, 5,10		PCR sur couche leuco-plaquettaire maternelle exons 4, 5, 10		Phénotype Rh mère	PCR conventionnelle sur couche leuco-plaquettaire maternelle/paternelle	Phénotype Rh nouveau-né
	Ex 10	Ex 4/5	Ex 10	Ex 4/5			
	Patiente EN 1 africaine	+	-	+			
Patiente JM 2 caucasienne	+	-	-	-	cde/cde	<i>RHDψ</i> paternel	cde/cde
Patiente BA 3 africaine	+	-	+	-	cde/cde	<i>RHDψ</i> maternel	cde/cde
Patiente KY 4 africaine	+	-	-	-	cde/cde	absence de <i>RHDψ</i>	Cde/cde

Tableau IV Résultats des grossesses gémellaires. Results of the twin pregnancies.

Patientes	Génotypage		Phénotype foetal			
	Plasma maternel		Nouveau-né		Nouveau-né	
	RHD	SRY	RHD	1 Sexe	RHD	2 Sexe
FI	-	+	-	-	-	+
NR	+	+	-	-	+	+
PL	+	+	+	-	-	+
MF	+	+	+	+	+	+
UM	+	+	+	+	+	+

DISCUSSION

Notre étude confirme la haute concordance entre les résultats obtenus sur plasma maternel par PCR en temps réel et ceux obtenus par sérologie chez le nouveau-né.

Le pourcentage de 64,3 % de génotype foetal *RHD* positif obtenu est proche de la probabilité de 61% de porter un enfant Rh D positif pour une mère Rh D négatif, caucasienne, dont le groupe du géniteur est inconnu [23]. La légère surévaluation est expliquée par l'exclusion d'un certain nombre de génotypes chez des mères dont le père était connu Rh D négatif.

Le principal danger du génotypage *RHD* prénatal est de prédire un fœtus D négatif alors qu'il est D positif [24] et ainsi de ne pas surveiller la grossesse comme il se doit. Par ailleurs, l'absence d'amplification de certains exons, non récurrente, chez certaines patientes porteuses d'un fœtus Rh D évoque la possibilité d'une sensibilité limitée avec certains échantillons. Elle est liée très probablement à une quantité trop faible ou une absence d'ADN foetal dans certaines prises d'essais. Dans notre étude, l'absence d'amplification n'est pas liée à l'âge précoce de la grossesse dont la moyenne est de 18,2 semaines *versus* 19,7 semaines en présence d'amplification. La différence entre les moyennes d'âge n'est pas statistiquement significative avec un *t* de Student à 1,065. L'absence d'amplification dépend aussi des amorces utilisées au vu des sensibilités variables selon les exons amplifiés. Pour ces raisons, nous maintenons l'amplification concomitante de plusieurs régions du gène *RHD*, les exons 4, 5, 10 et ce, en double.

Le manque d'expression de l'antigène Rh D est, en dehors d'une délétion complète du gène *RHD*, le résultat d'anomalies structurelles du gène dont certaines séquences restent amplifiables. La fréquence du pseudogène *RHDψ*, non fonctionnel, dans la population Rh D négatif est estimée à 66% en Afrique du Sud, 19% chez les noirs africains [20]. Chez les donneurs de sang d'Afrique du Sud de phénotype Rh C positif, approximativement 40% portent le gène variant *RHD* avec expression de l'antigène C (r's) [21]. Il est ainsi essentiel d'être informé de l'origine ethnique des patientes et d'utiliser plusieurs couples d'amorces et sondes afin d'éviter des discordances entre le phénotype et le génotype du fœtus. La couche leuco-plaquettaire de la maman (et du partenaire) est systématiquement conservée afin d'être testée en PCR cinétique, comme l'ADN plasmatique, ou en PCR conventionnelle, lorsque les résultats des amplifications sur les trois exons sont discordants. Dans notre étude, seule une positivité isolée sur l'exon 10 a été notée.

La valeur prédictive du génotypage *RHD* dans les grossesses gémellaires nous oriente dans le suivi à accorder aux mères Rh D négatif. En cas de présence du gène *RHD* dans le sang maternel, il ne nous permet cependant pas de préciser si les deux fœtus sont Rh D positif ou un seul positif en cas de grossesse dizygote.

Cette nouvelle technique non invasive de diagnostic prénatal en combinaison avec l'échographie doppler de l'artère cérébrale moyenne fœtale, a modifié radicalement notre prise en charge des patientes allo-immunisées anti-D. L'algorithme de Moïse [25], référence en la matière, a été simplifié. Toute patiente enceinte immunisée anti-D est prélevée sans attendre un titre significatif d'anti-D et sans nécessité de phénotyper le père pour déterminer son génotype probable. En cas de génotype foetal *RHD* négatif, le suivi de grossesse est allégé et identique aux patientes non immunisées. En cas de fœtus *RHD* positif, l'échographie doppler fœtal de l'artère cérébrale moyenne [26, 27] combinée à l'évolution du titre est la base de la surveillance ultérieure de la grossesse. Par son innocuité, elle a également élargi, dans notre pratique, les indications du génotypage *RHD* aux

patientes RhD négatif non allo-immunisées anti-D lors de circonstances obstétricales justifiant l'utilisation de gamma globulines anti-D. Celles-ci sont aujourd'hui réservées aux seules patientes Rh D négatif dont le fœtus est Rh D positif.

CONCLUSION

La corrélation entre le génotype fœtal *RHD* prédit sur plasma maternel et le phénotype Rh D observé à la naissance est excellente. Elle présuppose une bonne connaissance du système Rh, phénotypique et génotypique, et une maîtrise de la PCR multiplex en temps réel tant dans les conditions de sa réalisation que dans le choix des amorces et sondes pour le système étudié. L'interprétation des résultats et leur intégration dans le suivi de la patiente Rh D négatif nécessite une étroite collaboration clinico-biologique. Au sein de notre centre hospitalier, cette technique non invasive est devenue la méthode de choix pour évaluer le statut Rh D fœtal chez les mères Rh négatif. Elle est incontournable dans la prise en charge des grossesses de patientes immunisées anti-D. Elle simplifie la prise en charge des patientes dont le fœtus est Rh D négatif.

Remerciements

À Madame Gabrielle Pirlot, infirmière du service de Gynécologie Obstétrique pour son aide logistique et à Madame Rose-Marie Renonnet, technicienne du service de Biologie Clinique, pour son aide technique.

RÉFÉRENCES

1. Daniels G. Blood group antibodies in haemolytic disease of the fetus and newborn. *In*: Hadley A, Soothill P, eds. Allo-immune disorders of pregnancy. *Cambridge University Press* 2002: 21-40.
2. Bennett PR, Le Van Kim C, Colin Y, Warwick RM, Cherif-Zahar B, Fisk NM, Cartron JP. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *N Engl J Med* 1993; 329:607-10.
3. Lighten AD, Overton TG, Sepulveda W, Warwick RM, Fisk NM, Bennett PR. Accuracy of the prenatal determination of RHD type status by polymerase chain reaction with amniotic cells. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1183-5.
4. Lo YMD. Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications. *Clin Chem* 2000; 46: 1903-5.
5. Avent ND, Finning KM, Martin PG, Soothill P. Prenatal determination of fetal blood groupe status. *Vox Sang* 2000; 78 (suppl 2): 155-62.
6. Lo YMD, CorbettaN, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350 485-7.
7. 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.
8. Ariga H, Ohto H, Busch MP, Imamura S, Watson R, Reed W, Lee TH. 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: 1524-30.
9. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real Time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986-4.
10. Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD positive and RhD negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 1991; 78: 2747-52.
11. Westhoff CM. The Rh blood group system in review: a new face for the next decade. *Transfusion* 2004; 44: 1663-73.
12. Aubin JT, Le Van Kim C, Mouro I, Colin Y, Bignozzi C, Brossard Y *et al*. Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. *Br J Hematol* 1997; 98: 356-64.
13. Ekman GC, Billingsly R, Hessner MJ. Rh genotyping: avoiding false-negative and false-positive results among individuals of African ancestry. *Am J Hematol* 2002; 69: 34-40.
14. Okuda H, Kawano M, Iwamoto S, Tanaka M, Seno T, Okubo Y, Kajii E. The *RHD* gene is highly detectable in RhD-negative japanese

donors. *J Clin Invest* 1997; 100: 373-79.

15. Avent ND. Antenatal genotyping of the blood groups of the fetus. *Vox Sang* 1998; 74 (suppl 2): 365-74.
16. Minon JM, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM. Prenatal prediction of fetal Rhesus D status by a multiplex Real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma (abstract). *Hematologie* 2003; 9 (suppl): 128.
17. Minon JM, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM. Génotypage foetal RHD sur plasma maternel par PCR multiplex en temps réel (abstract). *Transfus Clin Biol* 2003; 10 (suppl 1): 108s.
18. 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: 1079-85.
19. Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PMK. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998; 339: 1734-8.
20. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A *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: 12-8.
21. Tax M, van Der Schoot E, van Doom R, Douglas-Berger L, van Rhenen DJ, Maaskant-van Wijk PA. RHC and RHc genotyping in different ethnic groups. *Transfusion* 2002; 42: 634-44.
22. Avent ND. Molecular biology of the Rh blood group system. *J Ped Hematol Oncol* 2001 ; 23: 394-402.
23. Wirthner D, Hohlfeld P, Tissot JD. Maladie hémolytique périnatale 1^{re} partie : physiopathologie. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1998 ; 27: 135-43.
24. Van der Schoot E, Tax M, Rijnders R, de Haas M, Christiaens G. Prenatal typing of the Rh and Kell blood group system Antigens: the edge of a watershed. *Transf Med Rev* 2003; 17: 31-44.
25. Moïse KJ. Management of Rhesus alloimmunisation in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2002; 100: 600-611.
26. Mari G. Noninvasive diagnosis by doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *N Engl J Med* 2000; 342: 9-14.
27. Mari G, Detti L, Oz U, Zimmerman R, Duerig P, Stefos T. Accurate prediction of fetal hemoglobin by doppler ultrasonography. *Obstet Gynecol* 2002; 99: 589-93.