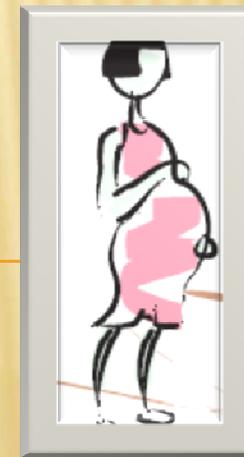


DPN NON-INVASIF SUR SANG MATERNEL

R. Favre
CMCO
Strasbourg



SITUATIONS CLINIQUES POTENTIELLES.

- **Détermination du sexe par détection du chromosome Y dans le cadre des maladies liées à l'X.**
- **Détection de pathologie monogénique.**
- **Diagnostic des principales aneuploïdies, trisomies 21, 18, 13.**
- **Détermination du groupe Rhésus.**

INTRODUCTION

- Long chemin sur la piste des cellules fœtales.
- Puis Découverte DNA libre dans le sang maternel.
- Potentiel ++++
 - Patientes à risque
 - Gestion de routine de la grossesse ?
 - Diminution du nb de prélèvements ovulaires.
 - Réduction des coûts.
 - Amélioration de la gestion des pathologies Rhésus.

CONSIDÉRATIONS ÉTHIQUES

- **Amélioration de la sécurité.**
 - Diminution du Nb de prélèvements (CVS, Amnio)
 - Diminution du Nb de fausse-couche
 - Moins de risque pour la mère.
 - Augmentation du Nb de patientes faisant le test.
 - Augmentation du Nb d'anomalies détectées.
- **Détection plus précoce.**
 - Diagnostic accessible dès 7 sem.
 - IMG plus précoce, voie médicamenteuse.
 - Diminution des risques maternels
 - Augmentation d'IMG même si évolution naturelle vers FCS.
- **Test plus simple.**
 - Une prise de sang versus, écho + prélèvement ovulaire
 - Difficulté potentiel de consentement éclairé
 - Pression pour aller vers une IMG.
 - Shift très clair du dépistage vers le DIAGNOSTIC !!!

CONSIDÉRATIONS ÉTHIQUES

- **Autonomie des patientes.**
 - Le dépistage est associé à un choix éclairé
 - Le diagnostic à un consentement éclairé
 - La simplicité du test modifie complètement la position médicale.
 - Prise de sang comme beaucoup d'autres, Toxo ...
 - Pression sociale pour l'IMG.
 - Diffusion à d'autres pathologies que le caryotype.
 - Pathologie liée à l'X, hémophilie ...
- **Accès libre et équitable de l'ensemble de la population.**
 - Problème du coût actuel.
 - Population socialement en difficulté.
- **Utilisation non-médicale.**
 - Diagnostic de sexe.
 - Malformation mineure, susceptibilité, maladie à révélation tardive ...
 - Test de paternité.

DNA LIBRE DANS LE SANG MATERNEL

- Denis Lo & Coll. Hong Kong 1997. Lancet.
 - DNA du chromosome Y.

Properties	cffNA	Fetal Cells
Earliest detection	4 weeks	~ 7 weeks
Proportion	5-10%	0.0001 - 0.01%
Persistence in maternal blood	< 24 hours	> 27 years
Relevant physical properties	Short fragments	Dense nucleus

DNA LIBRE DANS LE SANG MATERNEL

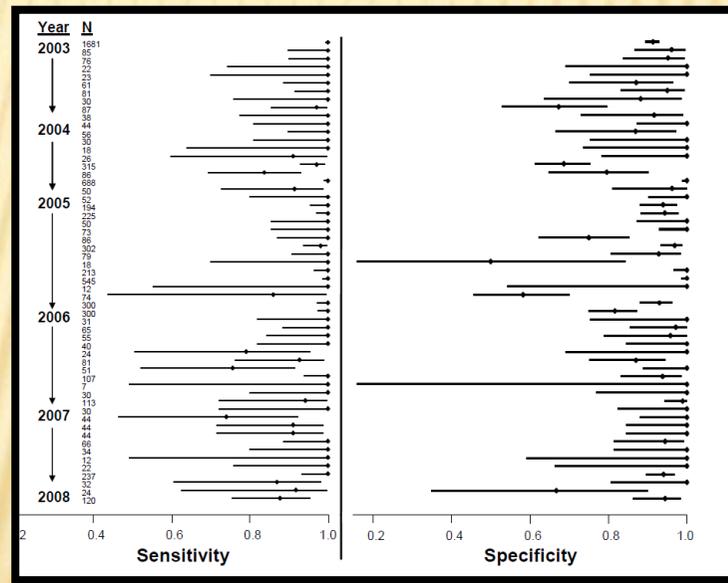
- **Challenges :**
 - **Faible quantité de DNA fœtal ~ 3 – 6 % du DNA circulants. Disparaissant très rapidement après l'accouchement (*Lo 1997*).**
 - **Nécessité de le distinguer du DNA maternel.**
 - **Utiliser PCR pour multiplier les séquences fœtales.**
 - **Diminuer le bruit, fragments de DNA fœtal plus petit, < ~ 300 paires de bases.**
 - **Technique de tri sélectif de ces fragments de DNA plus petit. Permet de d'augmenter > 70 % du DNA circulant d'origine fœtale.**

DNA LIBRE DANS LE SANG MATERNEL

- **Techniques:**
 - **Modification épigénétique spécifique du DNA foetal. (*Maspin, RASSF1A*)**
 - **Détection de mRNA spécifique du placenta (*PLAC4 spécifique du chromosome 21*).**
 - **Détection de protéines d'origine foetale et placentaire.**

INDICATIONS MÉDICALES.

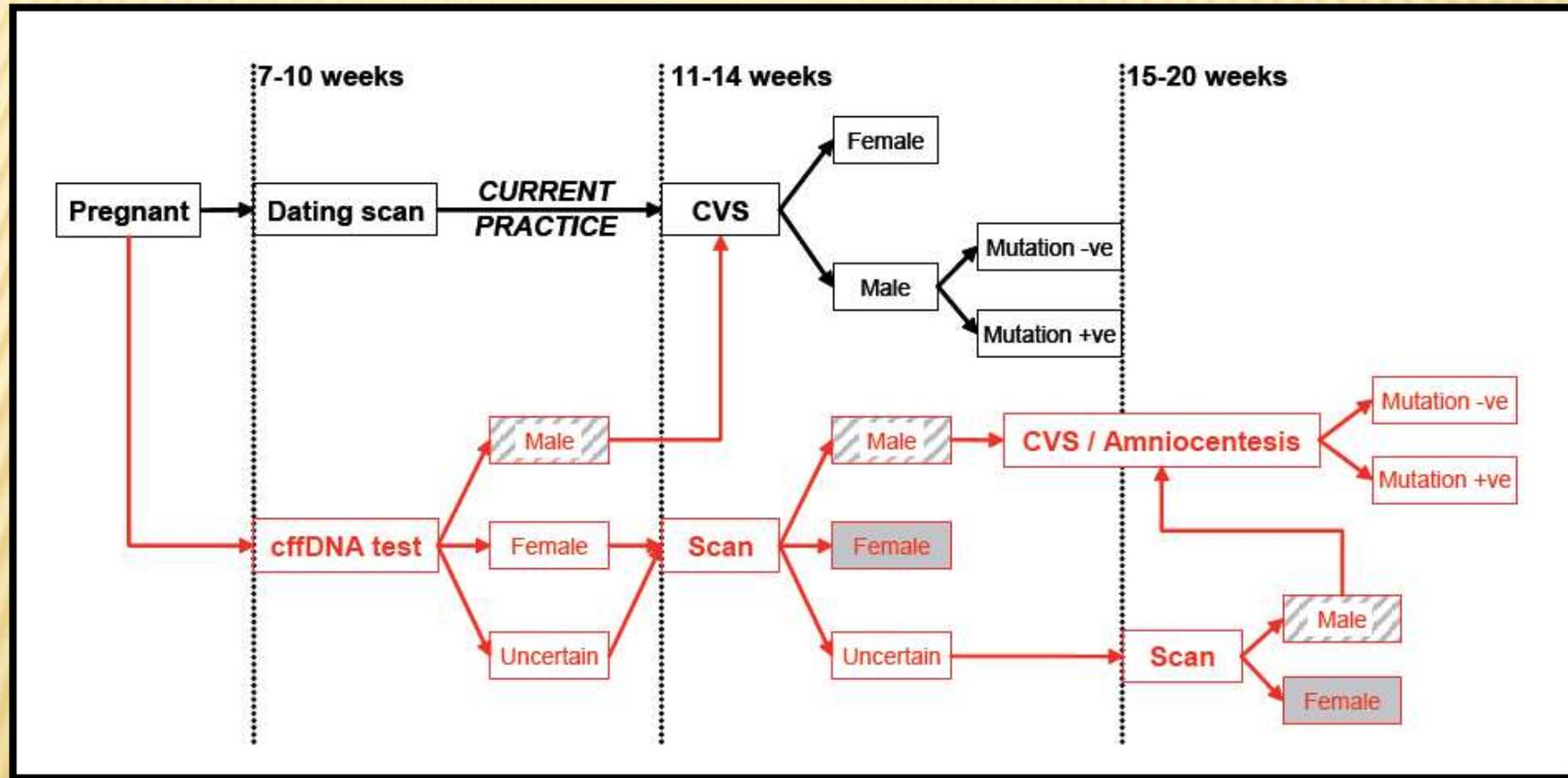
- Haut risque génétique.
 - Maladie liée à l'X. Détection de gène sur l'Y
 - Maladie de Duchenne, Hémophilie, Retard lié à l'X, Adrenoleucodystrophie, Syndrome d'Alport, rétinite pigmentaire ...
 - Hyperplasie congénitale des surrénales.
 - Sensibilité : 99.9 % [99.7 – 100]. Spécificité : 94.9 % [93.5 – 96.4].



www.phgfoundation.org

- Résultats ambigus.
 - Vanishing twin
 - Risque évalué à 1/200

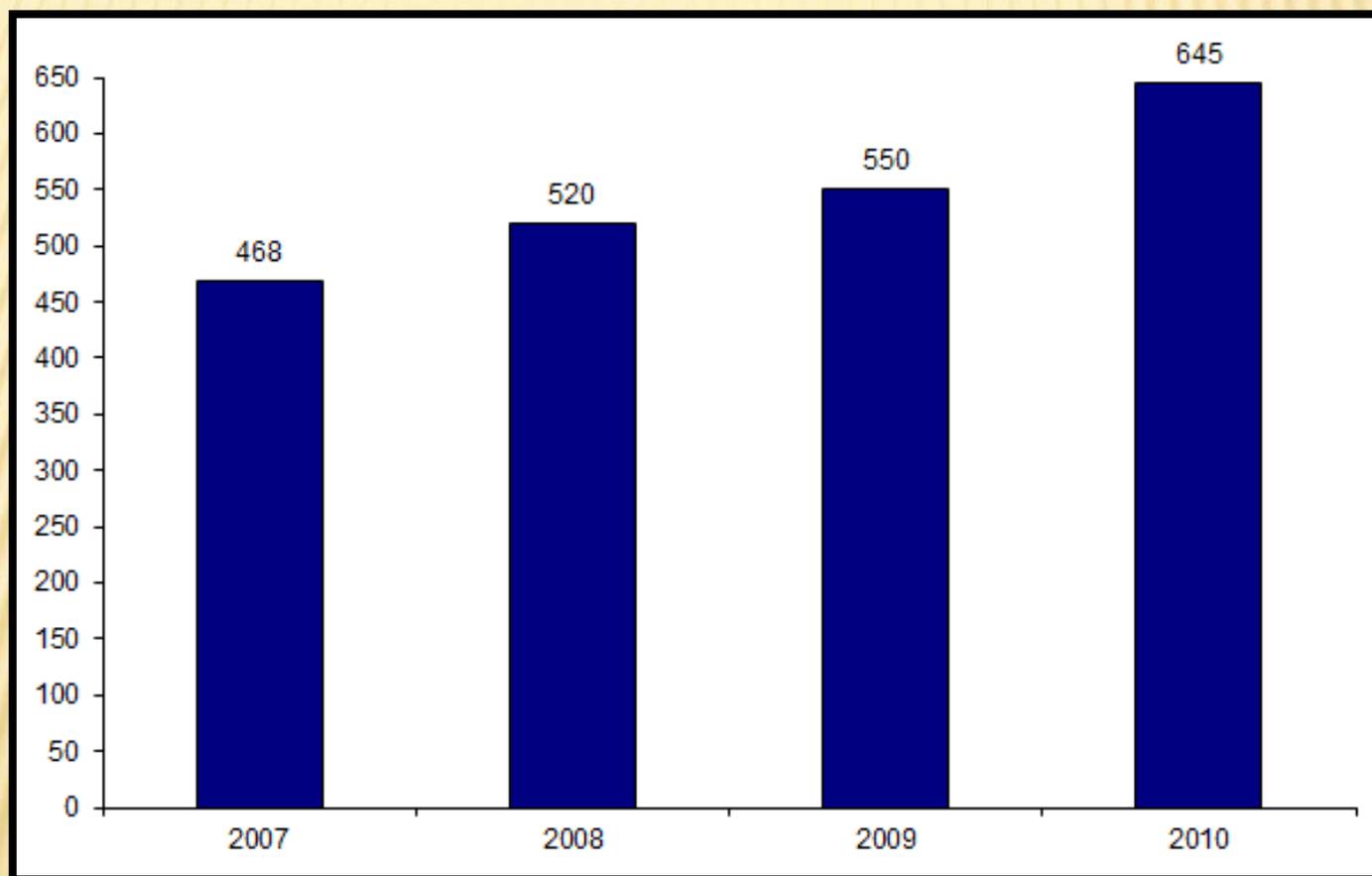
ATTITUDE POUR MALADIE LIÉE À L'X



Problème si le diagnostic de sexe est erroné.

www.phgfoundation.org

EVOLUTION DU NB DE DIAGNOSTIC DE SEXE



INDICATIONS MÉDICALES.

- **Haut risque génétique.**
 - **Maladie monogénique.**
 - **Prévalence estimée ~ 3.6/1.000 naissances [Baird *et al.* 1998].**
 - **Maladie récessive**
 - **Maladie dominante**
 - **Détection de mutations de grande taille difficile, car le DNA foetal est constitué de petits brins de 300 pb.**
 - **Détection des allèles qui ne sont pas présentes chez la mère.**
 - **Plus simple si maladie transmise par le père.**
Achondroplasie, Huntington, Apert, Dystrophie myotonique
...
 - **Diminution des coûts par comparaison avec la situation actuelle.**
 - **Problème éthique par rapport au parent porteur, mais pas différent du DPN classique.**

DIAGNOSTIC NON-INVASIF EN 2010

	Nombre de centres concernés	Nombre de centres pour lesquels ces analyses ont été réalisées dans le cadre d'un protocole de recherche	Nombre de fœtus étudiés
ADN fœtal circulant			
Détermination du rhésus fœtal	7	2	5968
Détermination du sexe fœtal	6	0	645
<i>Ambigüité sexuelle</i>	3	3	27
<i>Hyperplasie congénitale des surrénales</i>	3	3	74
<i>Maladies liées à l'X</i>	5	5	542
<i>Autre</i>	1	1	2
Autres analyses	3	1	80
<i>Achondroplasie</i>	1	1	36
<i>Génotypage Kel</i>	2	2	37
<i>Autre</i>	1	1	7
Cellules fœtales circulantes	0		

INDICATIONS MÉDICALES.

- **Anomalie de la grossesse.**

- **Groupe Rhésus**

- Actuellement environ 40 % des patientes ont une prophylaxie inutile.
 - UK : 700.000 grossesses environ 40.000 Rhésus négative avec anti-D inutile
 - Faux-positif environ 2 % pas dramatique.
 - Sensibilité : 95.4 % . Spécificité : 98.6 %

Study	Location	Number	Accuracy (%) [†]	False negatives [‡]
Finning et al. (2008)	UK	1997	95.7	3 samples
Minon et al. (2008)	Belgium	563	99.8	0 samples
Rouillac-Le Sciellour et al. (2007)	France	300	99.3	0 samples

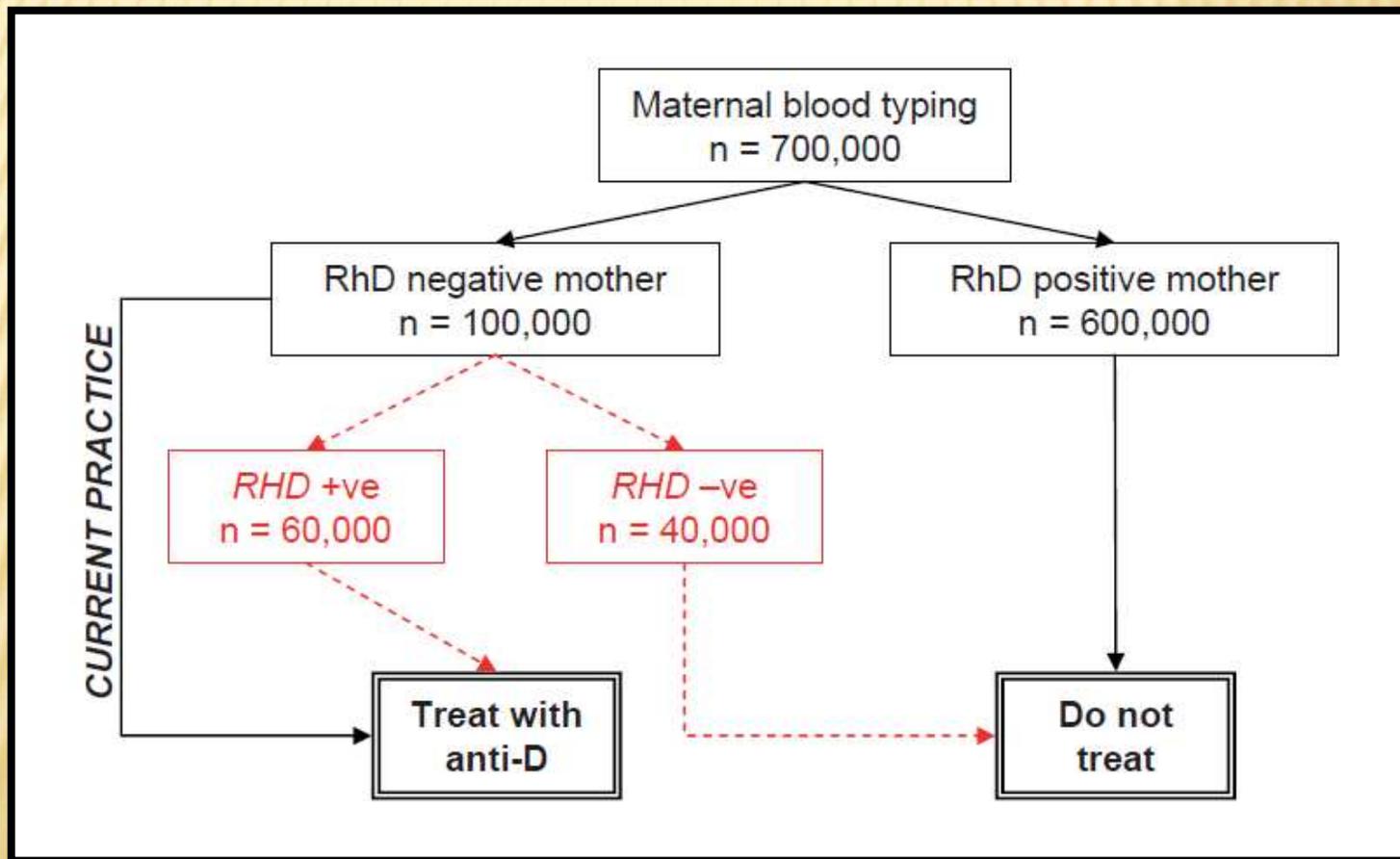
C..F. Wright & H. Burton. Hum. Reprod 2009; 15: 139 - 151

- **Anomalie de la placentation**

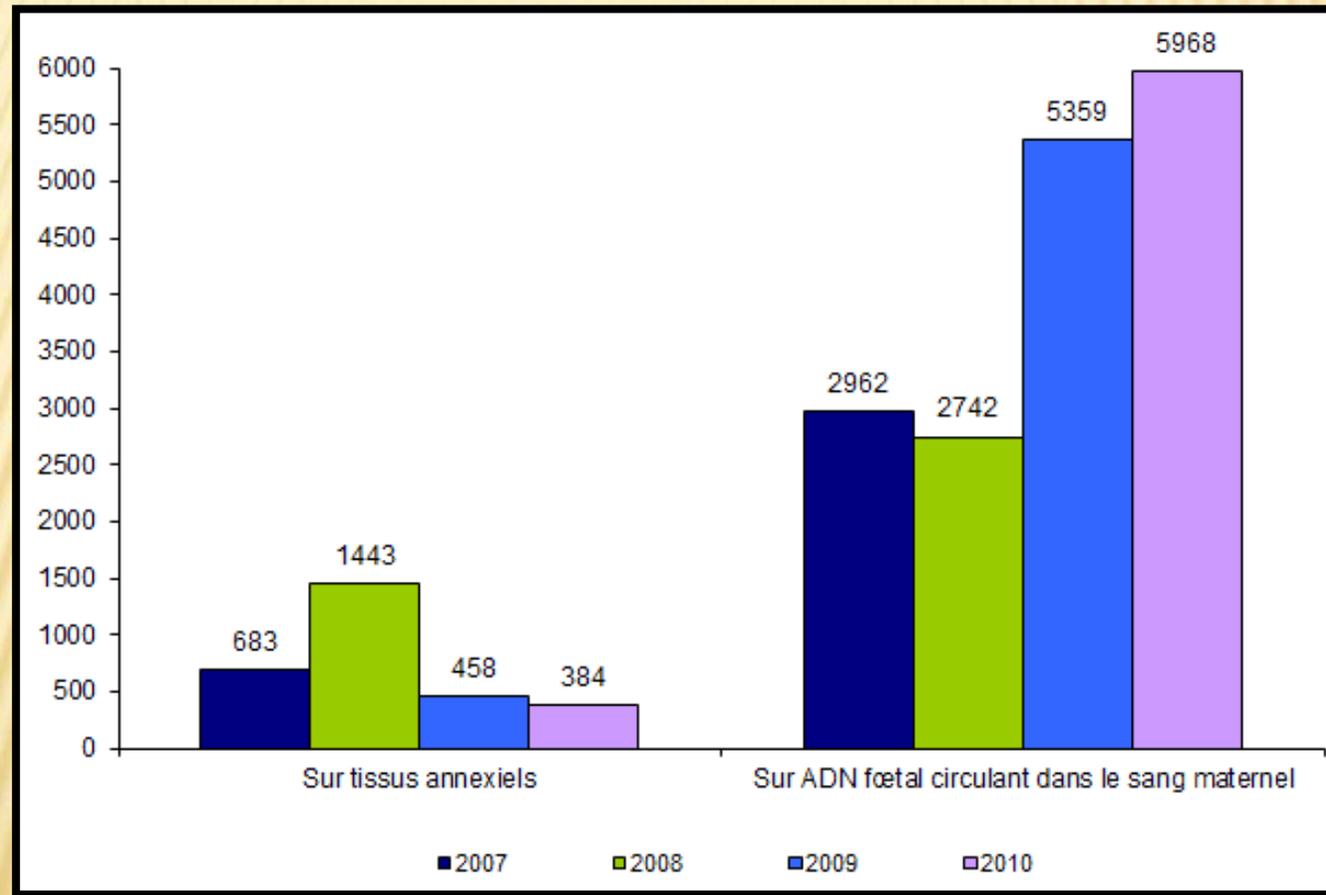
- Prééclampsie (*cffDNA 2 – 14 x la norme*)
 - Accouchement prématuré
 - Retard de croissance

INDICATIONS MÉDICALES.

- Anomalie de la grossesse.
 - Groupe Rhésus – situation anglaise

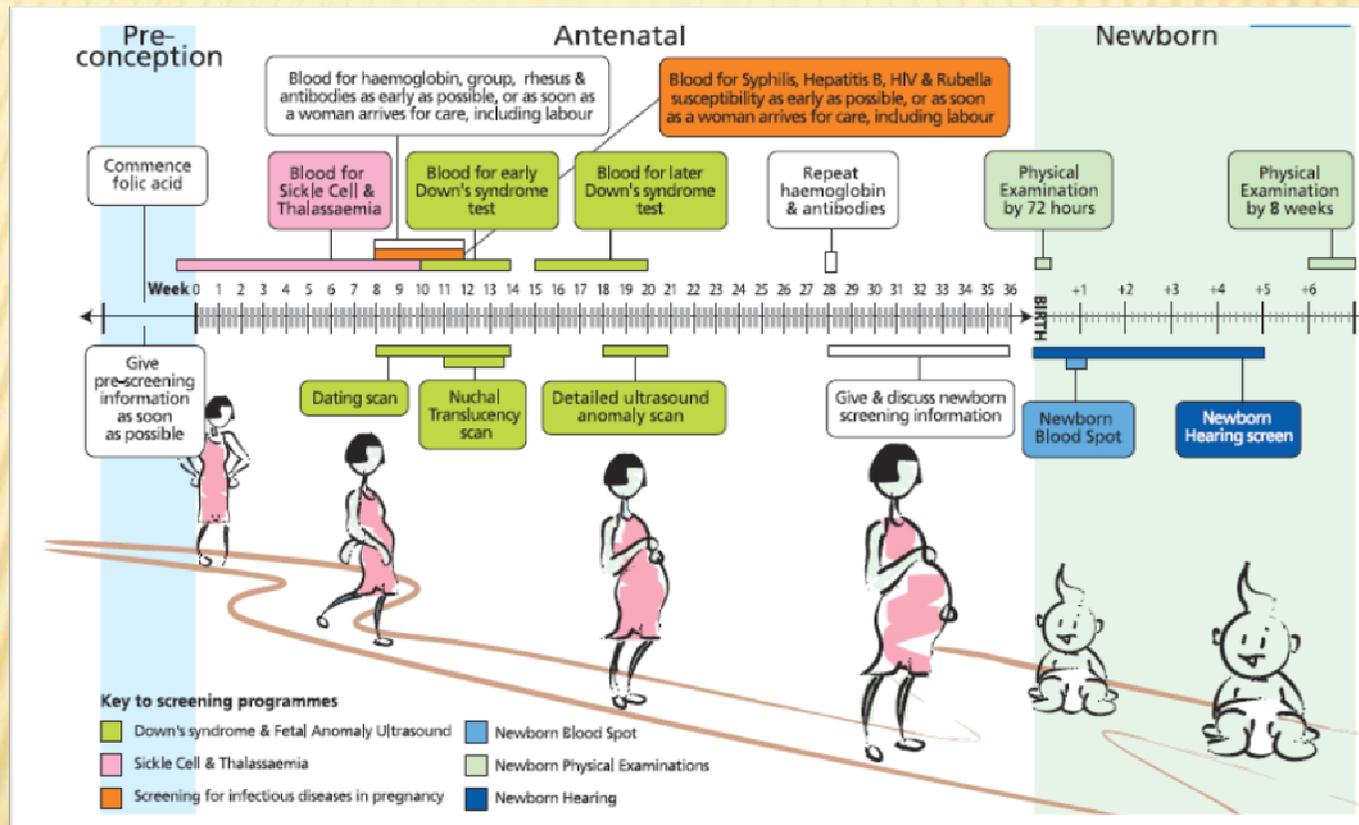


EVOLUTION DU DIAGNOSTIC RHÉSUS



INDICATIONS MÉDICALES.

■ DIAGNOSTIC DES ANEUPLOÏDIES.



LE PASSÉ - MODÈLE ANGLO-SAXON

INDICATIONS MÉDICALES.

- **DIAGNOSTIC DES ANEUPLOÏDIES.**

Maternal age with:	Detection rate for 5% false positive rate (%)*	Biomarker (see glossary for biomarker acronyms)
<i>FIRST TRIMESTER (11-13 weeks)</i>		
Ultrasound scan	60	NT
Serum test	74	β -hCG, PAPP-A
Combined test	83	NT, β -hCG, PAPP-A
<i>SECOND TRIMESTER (14-20 weeks)</i>		
Double test	71	free β -hCG, AFP
Triple test	77	AFP, uE ₃ , β -hCG
Quadruple test	83	AFP, uE ₃ , β -hCG, inhibin-A
<i>BOTH TRIMESTERS</i>		
Serum integrated test	90	PAPP-A, AFP, uE ₃ , β -hCG, inhibin-A
Integrated test	93	NT, PAPP-A, AFP, uE ₃ , β -hCG, inhibin-A

DIAGNOSTICS EFFECTUÉS

Anomalies	2008			2009			2010		
	N	% des caryotypes	% des anomalies déséquilibrées	N	% des caryotypes	% des anomalies déséquilibrées	N	% des caryotypes	% des anomalies déséquilibrées
Trisomie 21	1903	2,3%	48,2%	1918	2,4%	47,8%	1934	3,5%	48,9%
Trisomie 18	610	0,7%	15,5%	657	0,8%	16,4%	622	1,1%	15,7%
Trisomie 13	237	0,3%	6,0%	234	0,3%	5,8%	237	0,4%	6,0%
Syndrome de Turner et syndromes associés	342	0,4%	8,7%	358	0,5%	8,9%	358	0,6%	9,0%
Syndrome de Klinefelter et syndromes associés	109	0,1%	2,8%	103	0,1%	2,6%	79	0,1%	2,0%
Trisomie X	83	0,1%	2,1%	60	0,1%	1,5%	55	0,1%	1,4%
47 XYY et Autres dysgonosomies	88	0,1%	2,2%	68	0,1%	1,7%	58	0,1%	1,5%
Triploïdies*							120	0,2%	3,0%
Autres anomalies déséquilibrées	576	0,7%	14,6%	618	0,8%	15,4%	494	0,9%	12,5%
Total des anomalies déséquilibrées	3948	4,7%	100,0%	4016	5,1%	100,0%	3957	7,1%	100,0%
Anomalies a priori équilibrées	746	0,9%		787	1,0%		627	1,1%	
Total des anomalies	4694	5,6%		4803	6,1%		4584	8,2%	
Caryotypes fœtaux	83596			79105			55568		

*Les triploïdies n'étaient pas différenciées les années antérieures (elles étaient comptabilisées dans les autres anomalies déséquilibrées)

INDICATIONS MÉDICALES.

- **DIAGNOSTIC DES ANEUPLOÏDIES.**
 - 2010. Mise en place du risque combiné en France

Au niveau National	2010 (N=249 334)			2011 (N=406 728)		
	Moyenne	Médiane	Ecart type	Moyenne	Médiane	Ecart type
Longueur cranio-caudale	61,92	62	7,69	62,09	62	7,74
Clarté nucale	1,33	1,3	0,47	1,34	1,3	0,47
MoM de CN	0,87	0,83	0,29	0,86	0,82	0,29
MoM PAPP A	1,13	0,99	0,67	1,16	1,01	0,67
MoM hCGb	1,16	0,94	0,85	1,17	0,94	0,85
Risque	3,37%			2,98%		

- **DIAGNOSTIC Post-natal.**

Année diagnostic	2009	2010	2011
diagnostic T21 prénatal	1918	1934	1943
diagnostic T21 postnatal		453	535
% diagnostic prénatal		81,0%	78,4%
Total diagnostic T21		2387	2478

INDICATIONS MÉDICALES.

- **DIAGNOSTIC DES ANEUPLOÏDIES.**
 - **2010. Mise en place du risque combiné en France**

	2007	2008	2009	2010	2011*
Caryotype fœtaux	89 739	83 596	79 105	55 568	45 018
Trisomies 21	1 908	1 903	1 918	1 934	1 943
%	2,1%	2,3%	2,4%	3,5%	4,3%
Evaluation pertes fœtales (simulation)	448	418	395	268	225
Nb naissances**	818 705	828 404	824 641	841 563	835 703

* chiffres provisoires, source Rapport ABM annuel agrégé des activités de diagnostic prénatal (Cytogénétique)

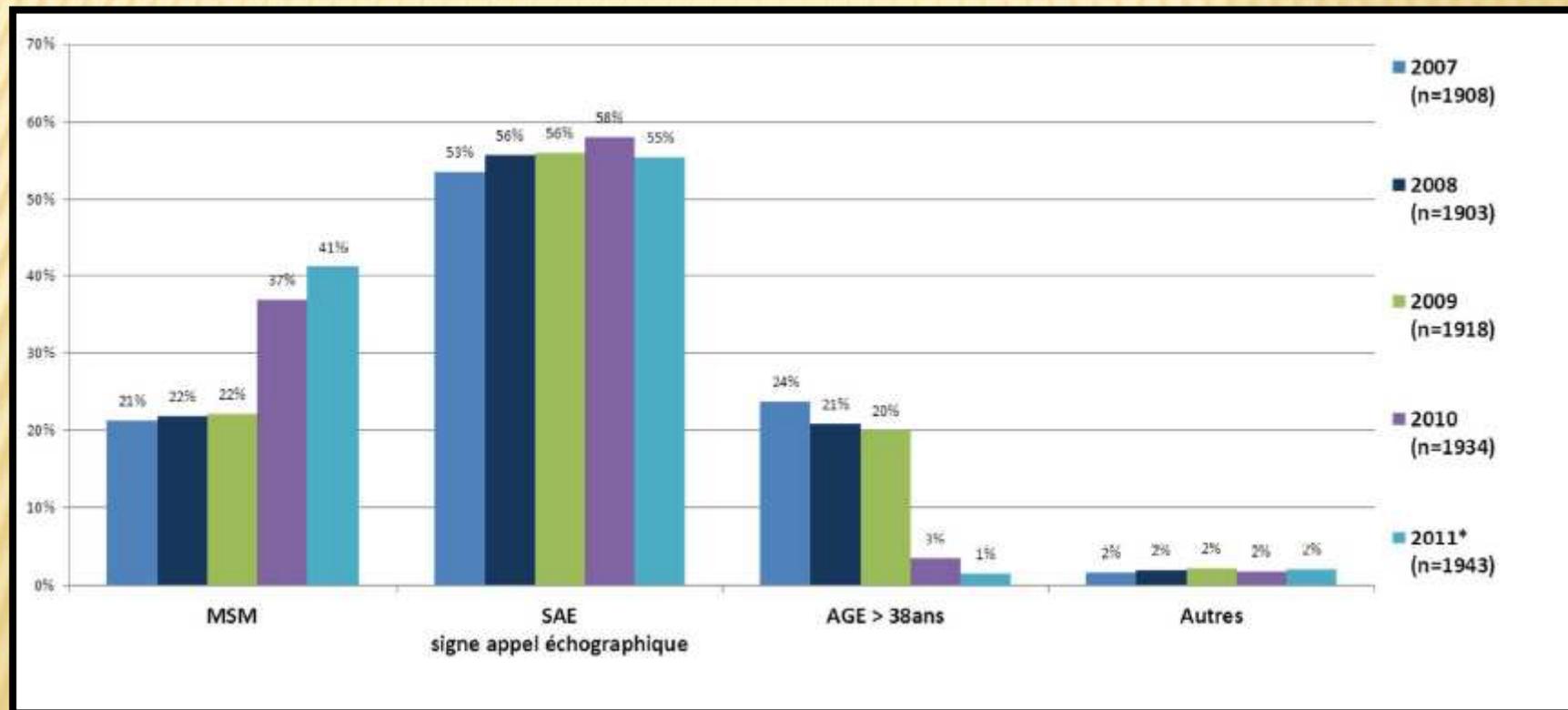
** Source : Chiffres INSEE (2007 à 2010 chiffres définitifs, 2011 chiffres provisoires estimés)

	2007	2008	2009	2010	2011*
Indication sur MSM	36 212	34 513	33 135	28 199	22 175
Trisomies 21	405	415	423	711	800
VPP	1,1%	1,2%	1,3%	2,5%	3,6%

* chiffres provisoires, source Rapport ABM annuel agrégé des activités de diagnostic prénatal (Cytogénétique)

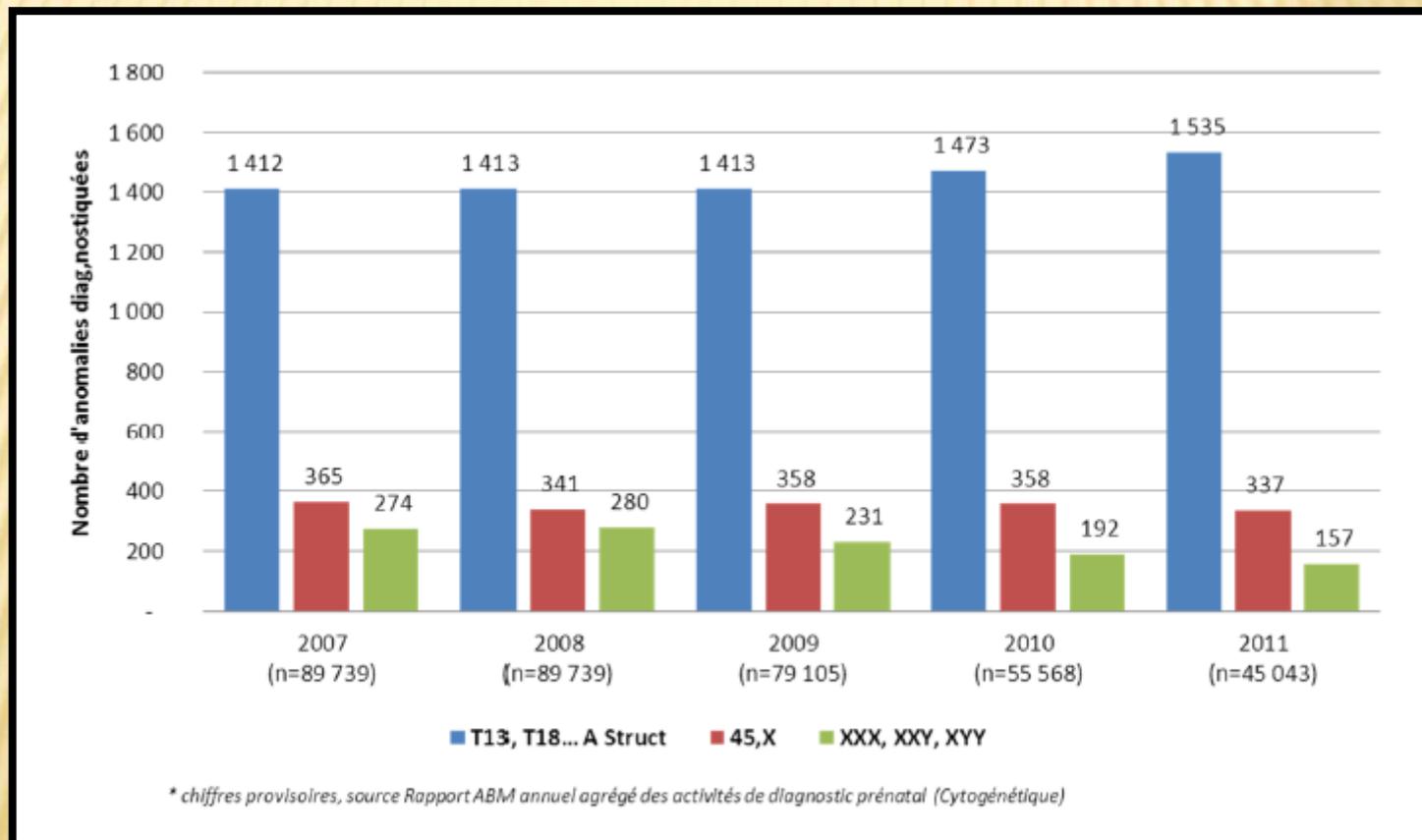
INDICATIONS MÉDICALES.

- **DIAGNOSTIC DES ANEUPLOÏDIES.**
 - Indication au prélèvement dans les diagnostic de T21 en France



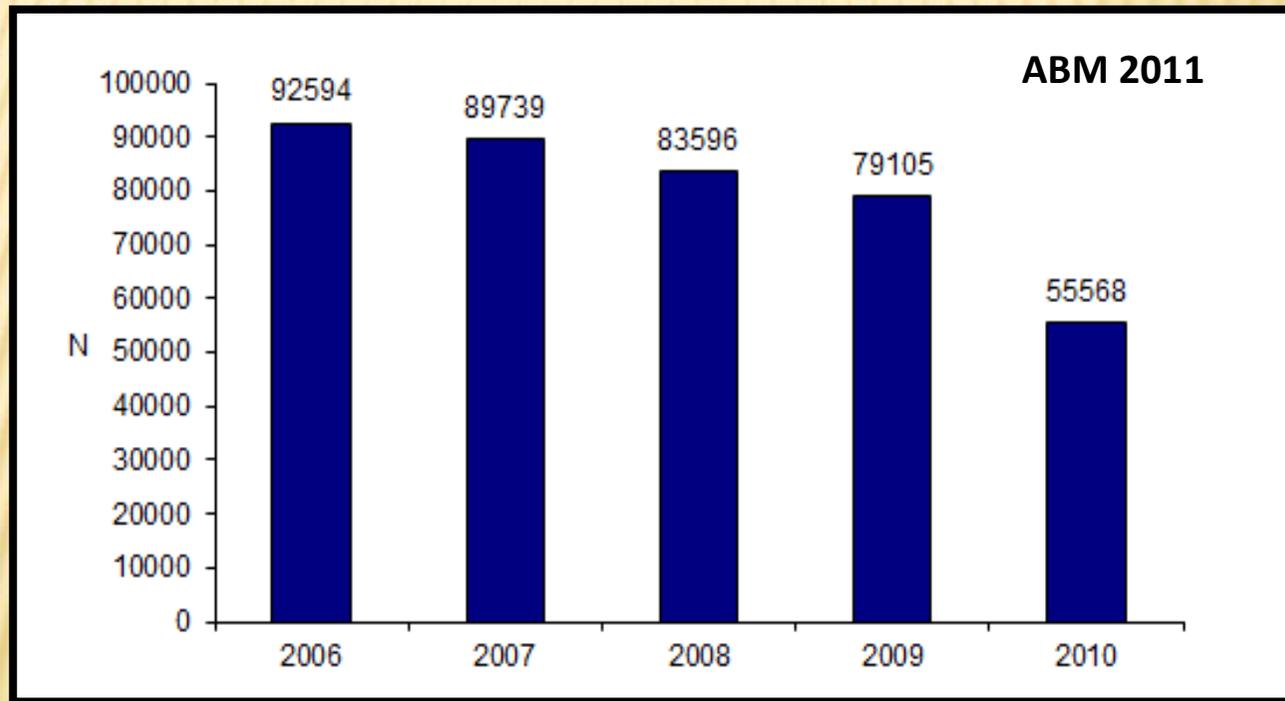
INDICATIONS MÉDICALES.

- DIAGNOSTIC DES ANEUPLOÏDIES.
 - Evolution des autres diagnostics d'aneuploïdies. en France

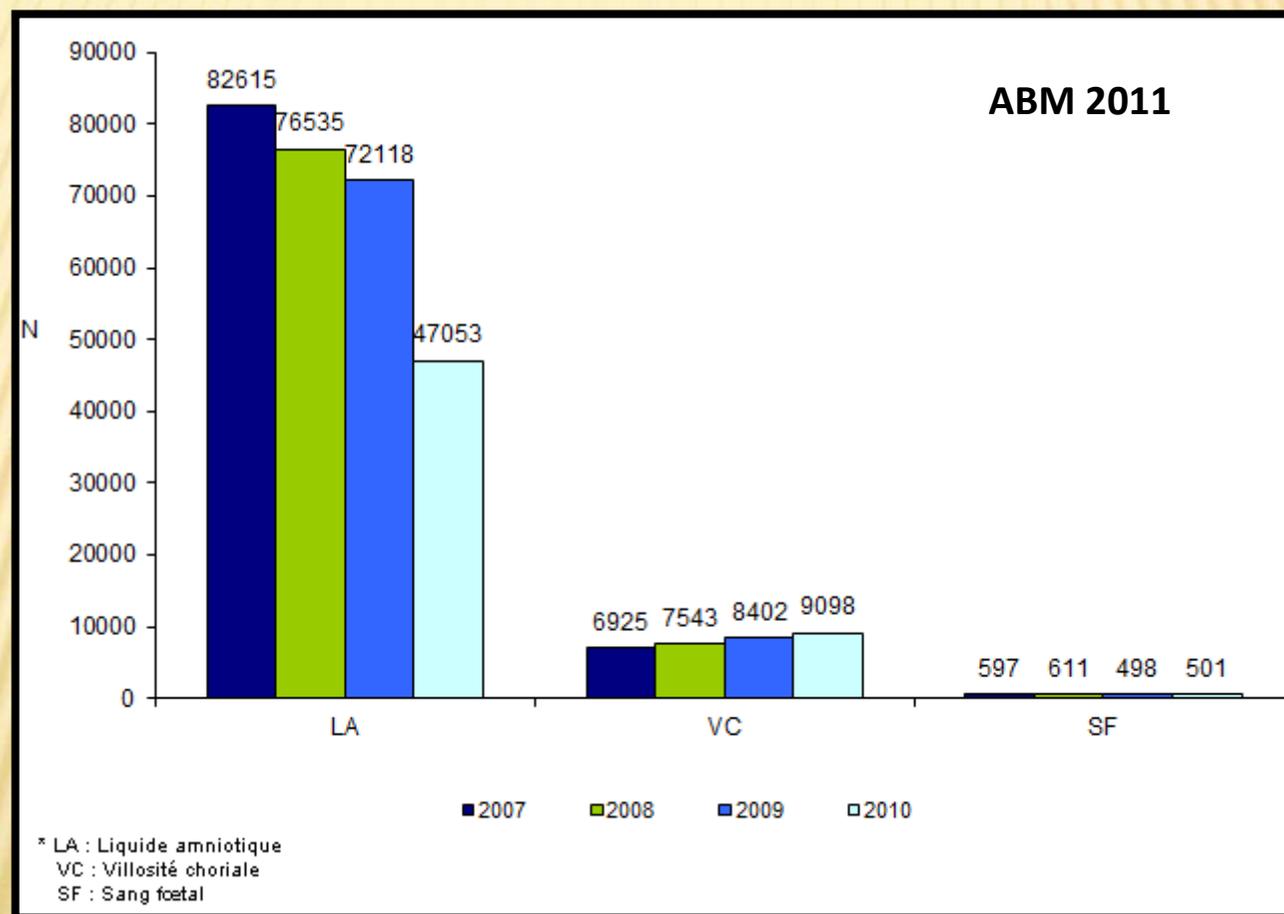


EN FRANCE

- Diminution du Nb de prélèvements depuis 2006.



TYPE DE PRÉLÈVEMENTS



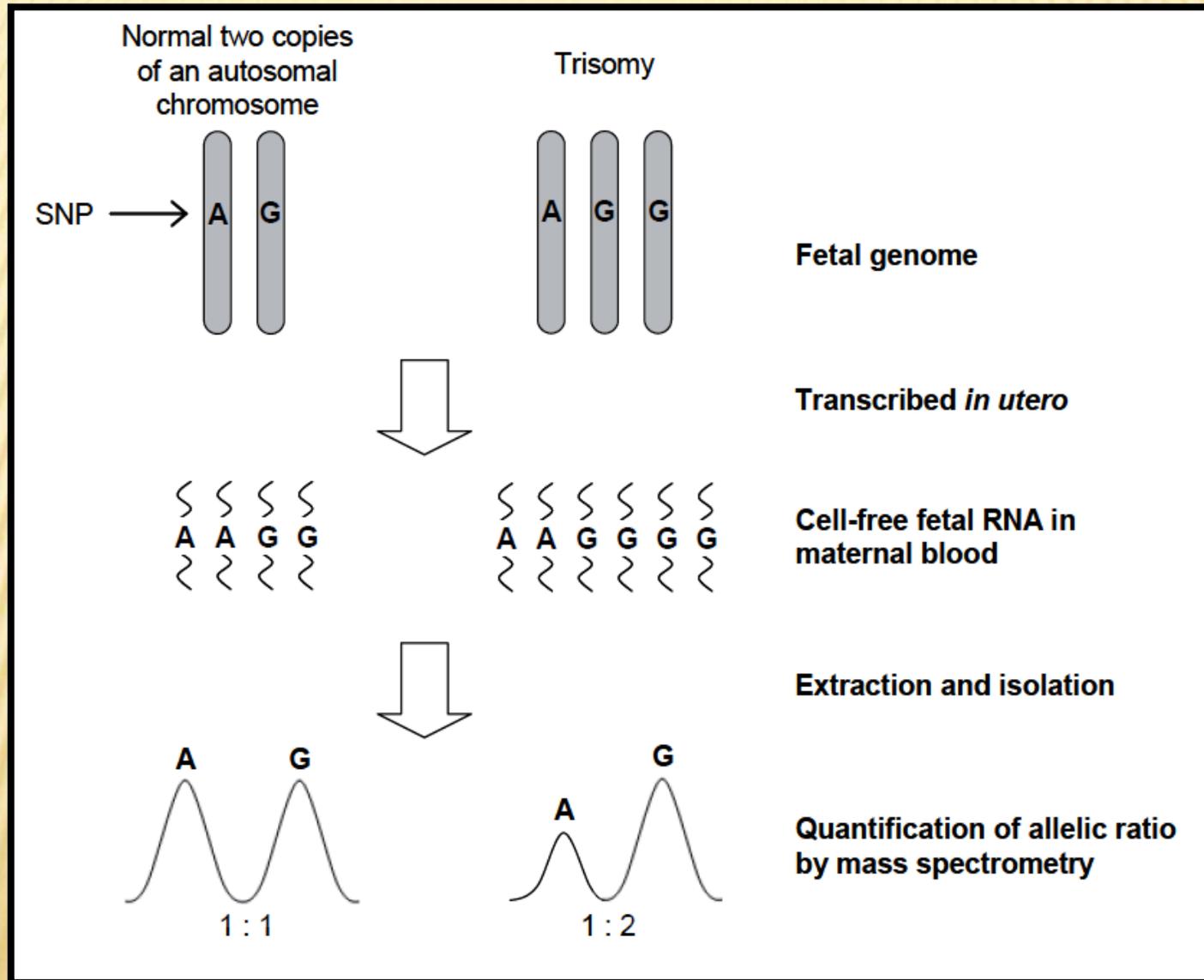
INDICATIONS MÉDICALES.

- **DIAGNOSTIC DES ANEUPLOÏDIES.**
 - Prévalence estimée ~ 1.8/1.000 naissances [Baird *et al.* 1998].
 - Mosaïcisme ~ 1 % des cas
 - Trisomie 21 – Dépistage actuel : environ 82 % de sensibilité
 - Trisomie 18 – 13 – environ 90 % de sensibilité.

- Deux méthodes.
 - 1. Quantification du polymorphisme de nucléotides provenant d'un chromosome (21, 13, 18, X, Y) d'origine placentaire.

 - 2. Mesure du ratio de chromosomes lui-même par rapport à un témoin.
 - Ratio de 1 : 1 dans la norme
 - Ration de 2 : 3 chez aneuploïdies. Applicables à d'autres aneuploïdies. Nécessite l'utilisation d'une PCR quantitative en temps réel.

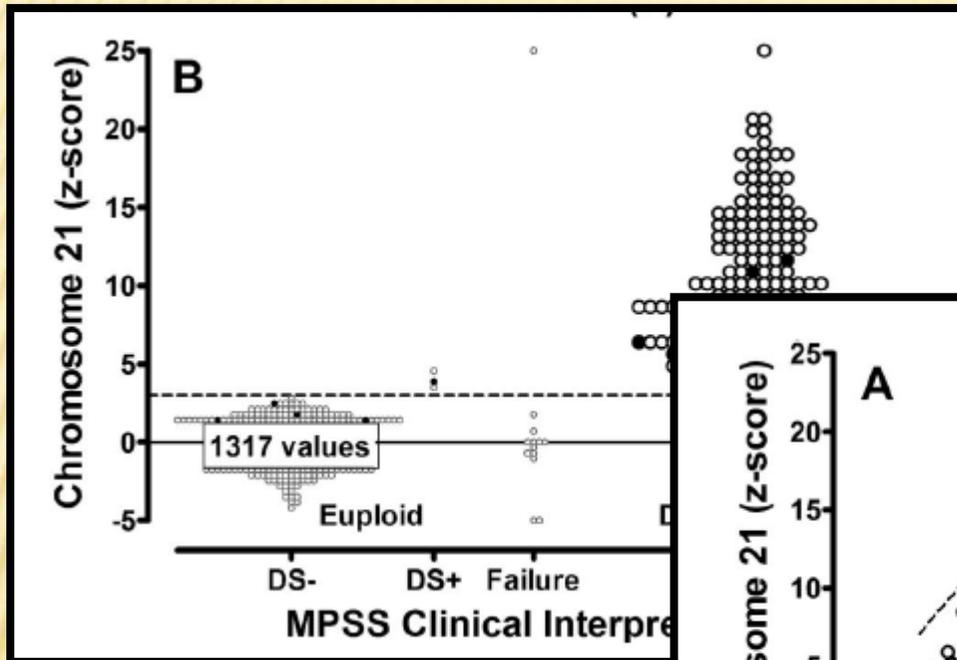
QUANTIFICATION DES ALLÈLES.



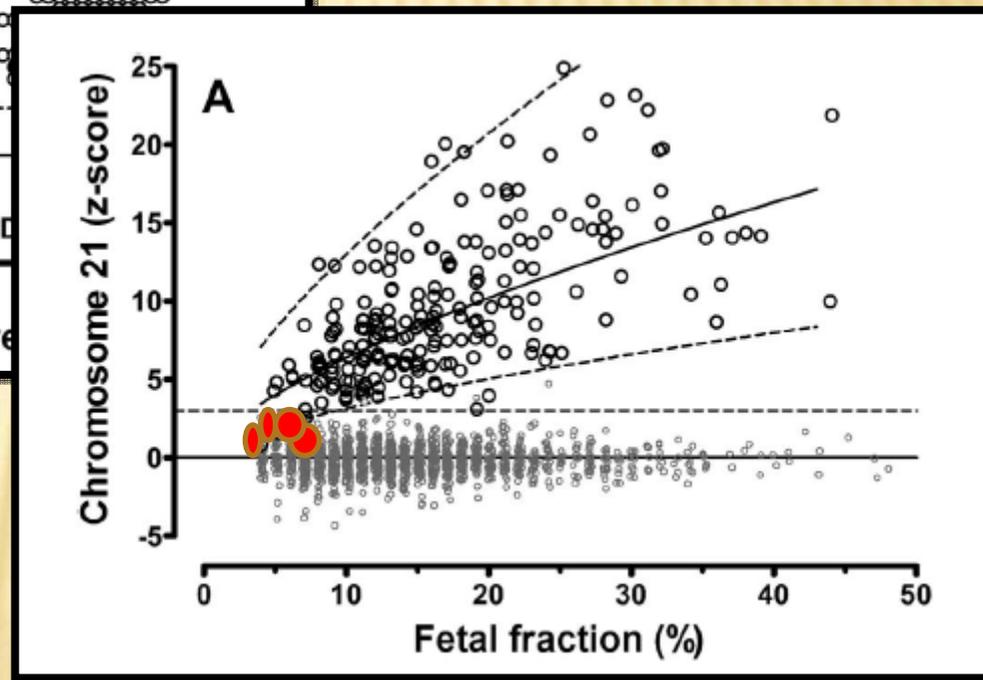
DIAGNOSTIC DES ANEUPLOÏDIES.

- **MPSS** (*Massive Parallel Shotgun Sequencing.*)
 - Définir le % de contribution du Chr 21 au DNA fœtal .
 - Expression de ce pourcentage en Z scores.
 - Soit différence en pourcentage par rapport à un contrôle.
 - Les mères porteuses d'un fœtus trisomique ont une quantité de DNA du Chr 21 $\sim > + 3 Z \text{ scores}$ (*fetal fraction*)
 - Sensibilité de 98.6 %, FP 0.2 % (*R.W.K Chiu 2012*)
 - Etude combinée :
 - 2061 euploïdes versus 350 T21
 - Sensibilité 99 %, Spécificité 99 % (*G.E Palomaki 2011*).
 - Résultat positif : *Augmentation du risque par 490*
 - Résultat négatif : *Diminue le risque par 72*

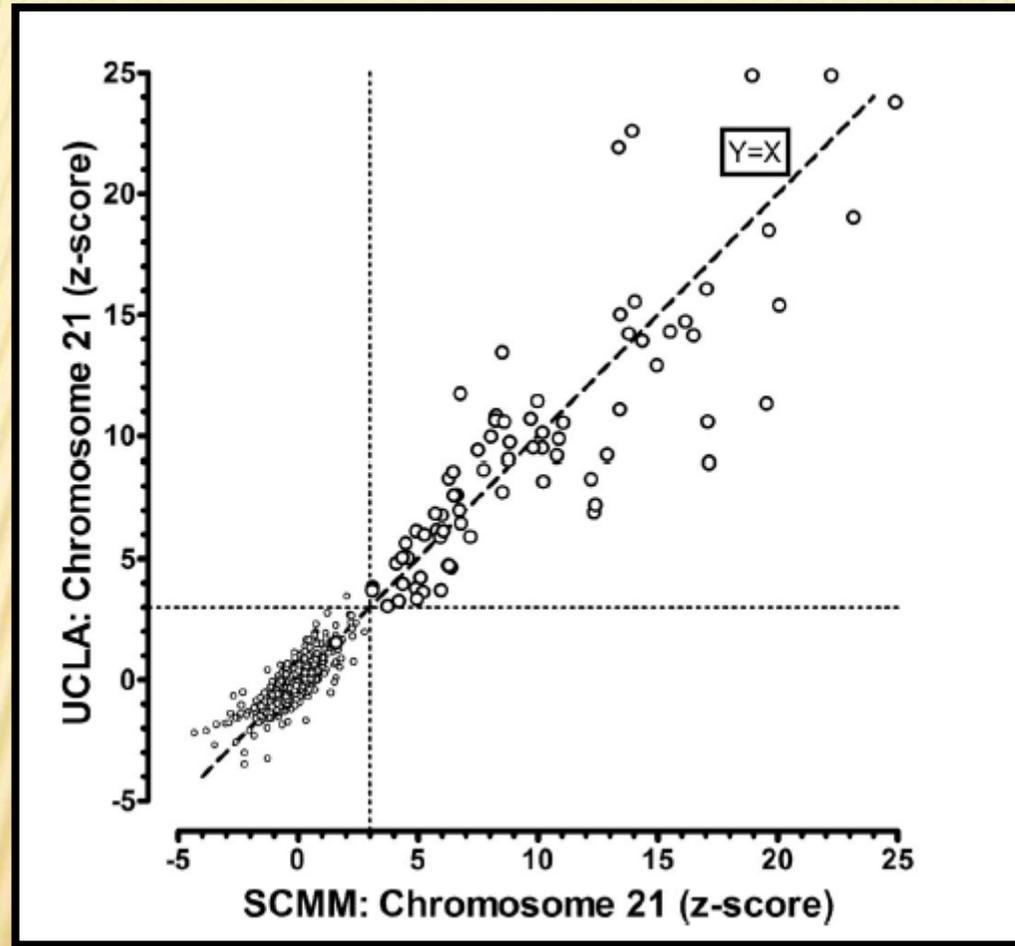
MPSS.



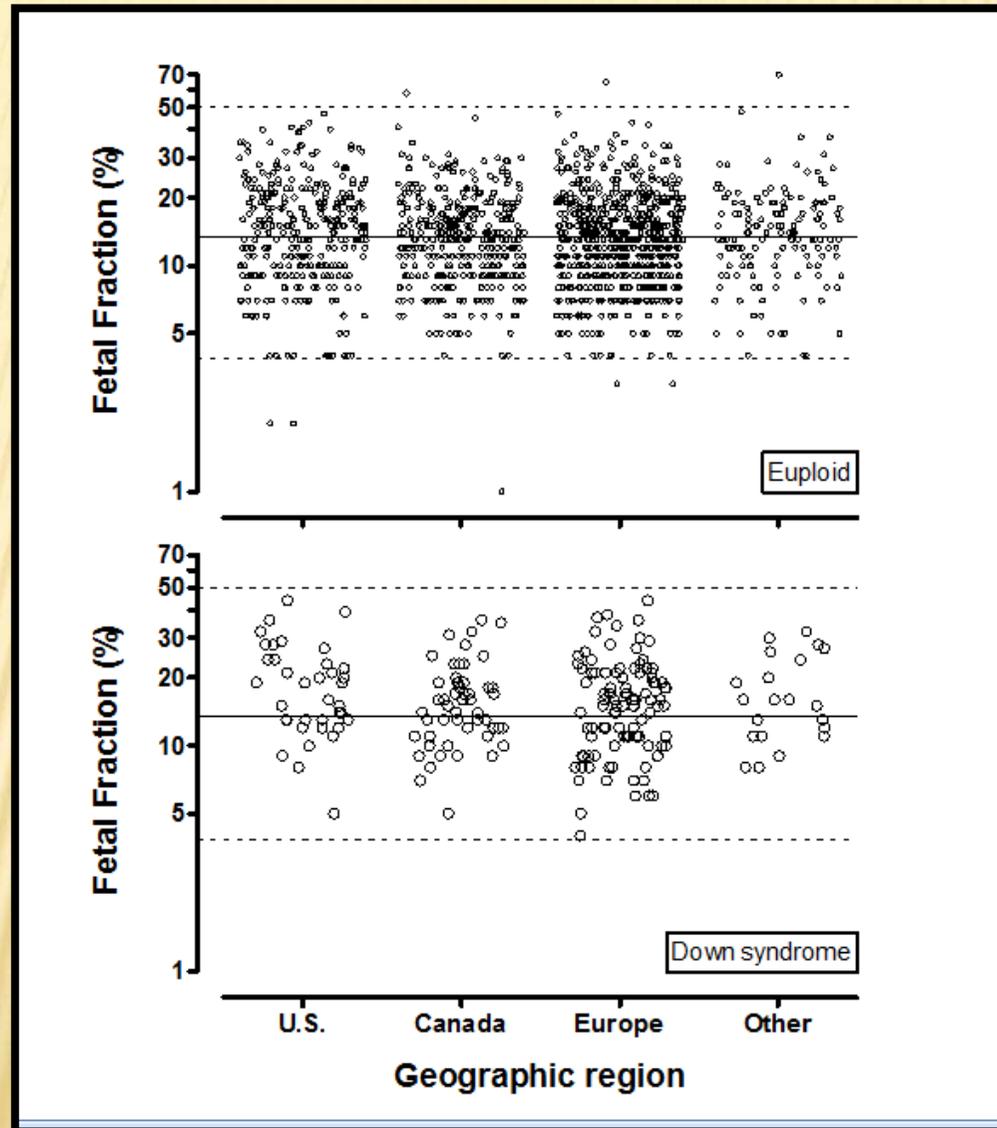
($p < 0.001$, slope = 0.676).



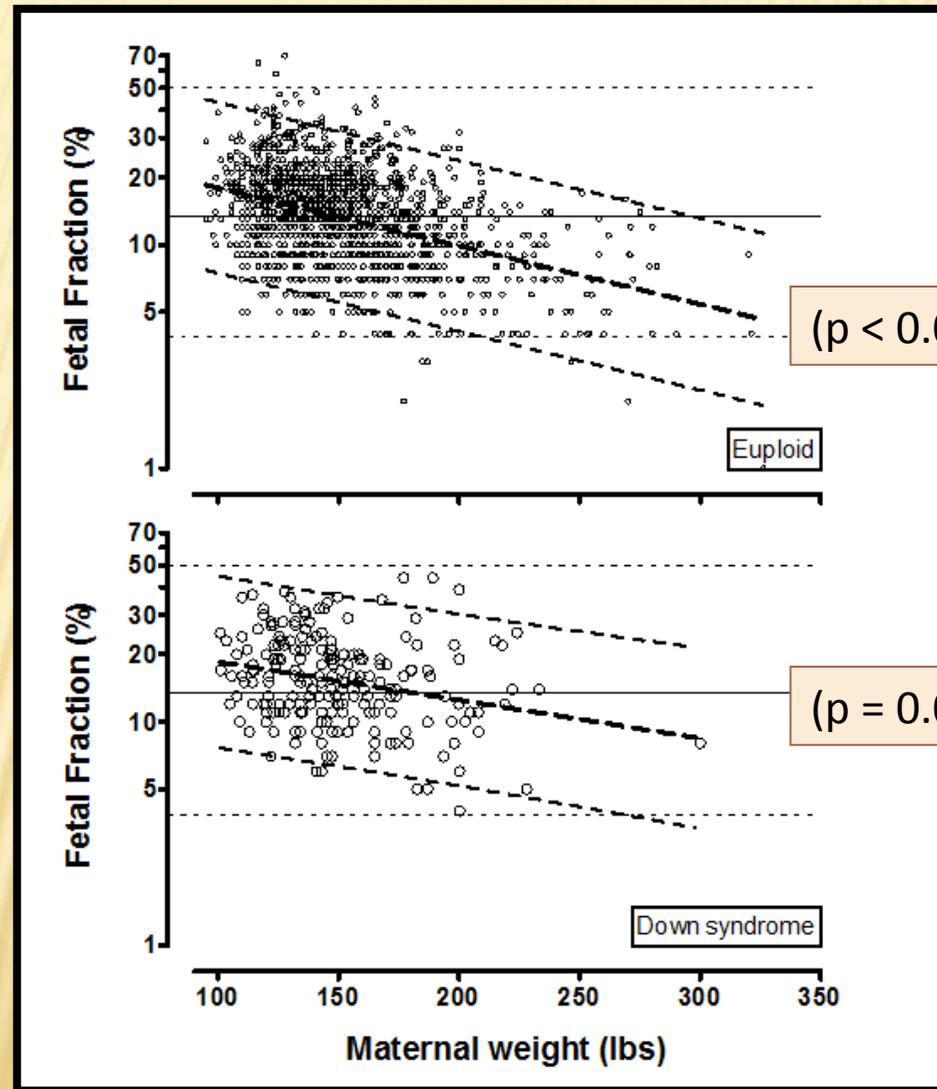
MPSS. REPRODUCTIBILITÉ



MPSS. VARIABILITÉ



MPSS. VARIABILITÉ – POIDS MATERNEL

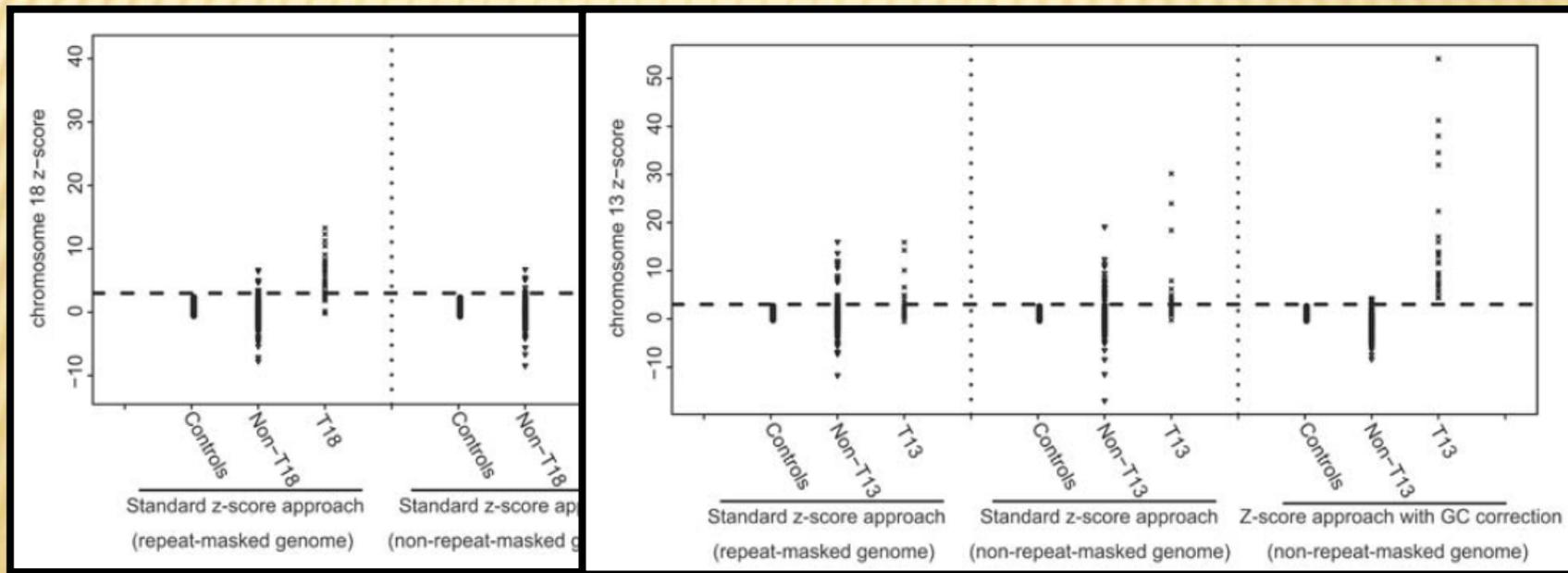


($p < 0.0001$, slope = -0.0026).

($p = 0.0002$, slope = -0.0017)

MPSS. CHROMOSOMES 18, 13

- Trisomie 18.
 - Incidence estimée ~ 1/6.000 naissances [Driscoll *et al.* 2009].
- Trisomie 13.
 - Incidence estimée ~ 1/10.000 naissances [Driscoll *et al.* 2009].
 - Screening 1^{er} trimestre : Sensibilité 77 – 86 %, FP 3.2 – 5.6 %
 - Chromosome 18, 13 ont une faible quantité de Guanine et Cytosine



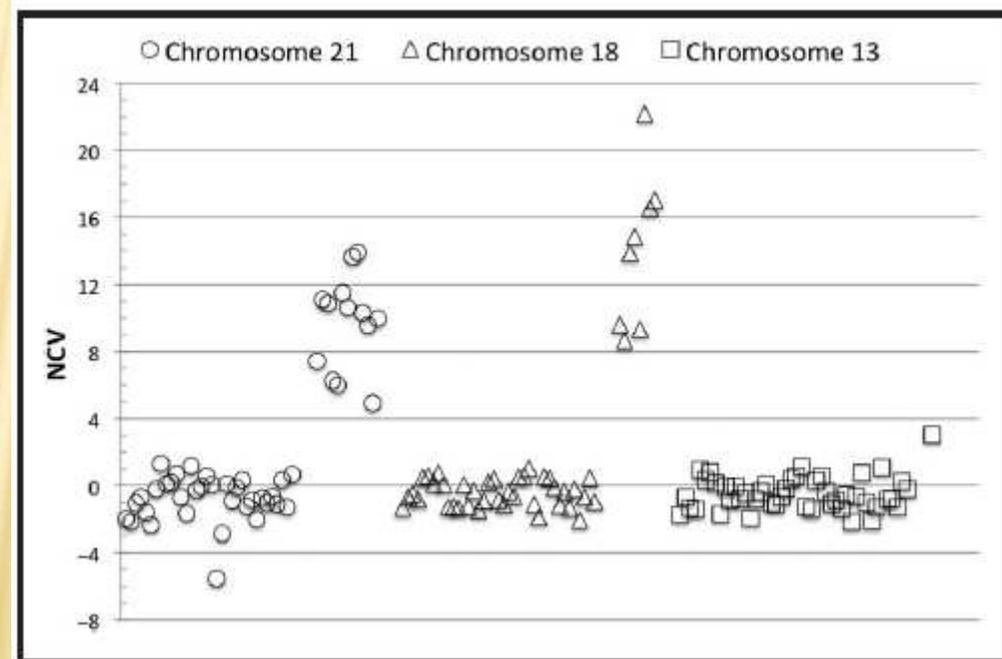
MPSS. CHROMOSOMES 18, 13

Utilisation de NCV : Normalized chromosome Value A.J. Sehnert 2011

Table 1. Chromosome ratio calculation rules.

Chromosome of interest	Numerator (chromosome mapped sites)	Denominator (chromosome mapped sites)
21	21	9
18	18	8
13	13	Sum (2-6)
X	X	6
Y	Y	Sum (2-6)

Trisomie 13 :
Fréquent mosaïcisme placentaire
Forte proportion de cellules
disomiques



DIAGNOSTIC DES ANEUPLOÏDIES

- **5 situations potentielles.**
 - 1. Test de dépistage supplémentaire avec CN et MS.**
 - 2. Test suivant le dépistage avant un geste invasif.**
 - 3. Test remplaçant les marqueurs sériques.**
 - 4. Test remplaçant le diagnostic invasif.**
 - 5. Test remplaçant le dépistage et le diagnostic.**

CONSIDÉRATIONS ÉTHIQUES

1. Multiple step versus single test.

- Par comparaison avec le dépistage actuel, moins de temps, moins de support, contrainte plus grande.

2. Stratification versus diagnostic.

- Le dépistage actuel définit des groupes à risque, alors que le DNA fœtal pourrait être considéré comme un diagnostic définitif.

3. To test versus to terminate.

- Le dépistage met la patiente face à la décision d'aller ou non vers un test diagnostic, alors que le DNA la confronte au choix d'IMG ou non.

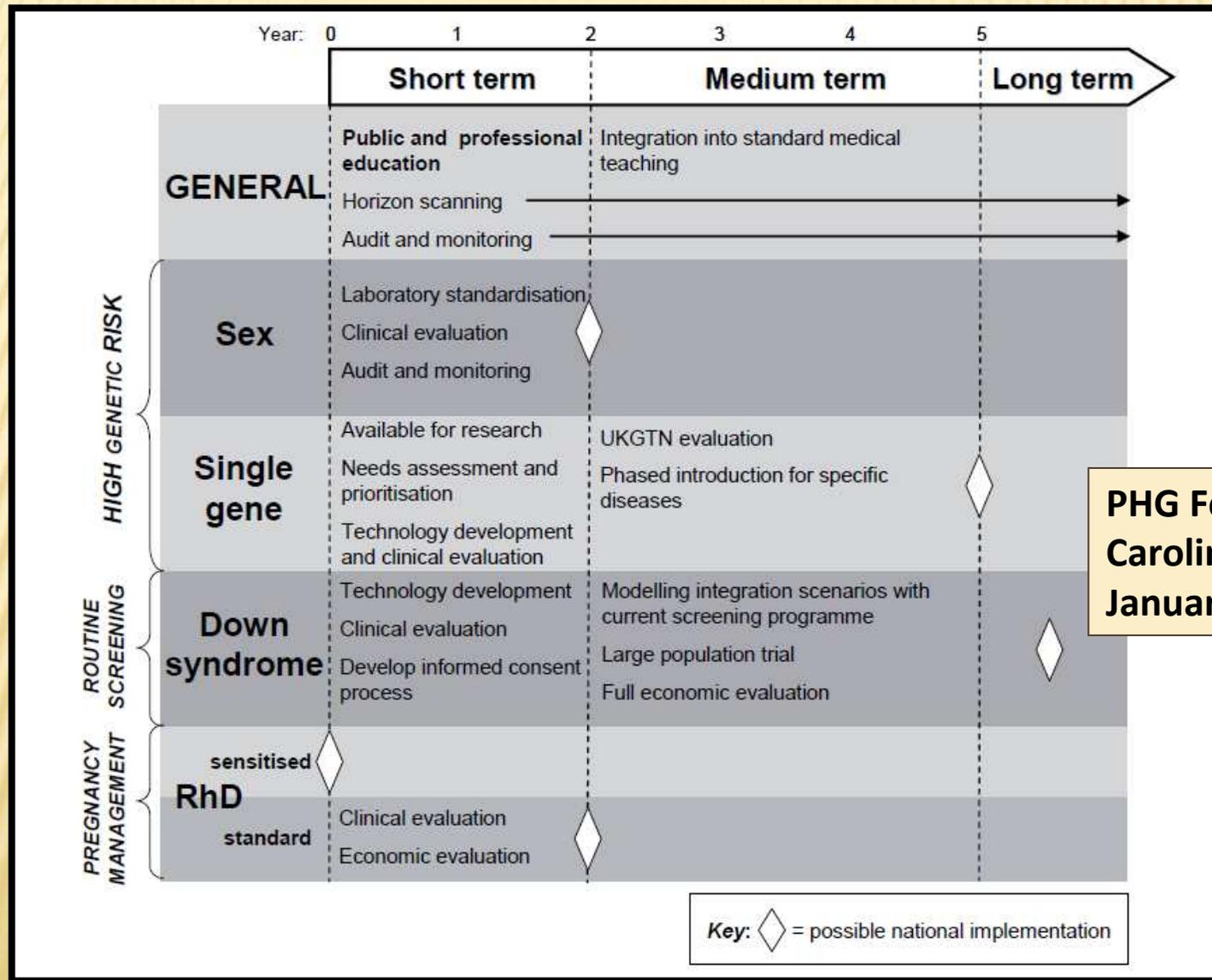
4. Diagnostic plus précoce.

- Un nb considérable de trisomie seront diagnostiquées avant une FCS. Un plus grand nb de femmes seront confrontées au choix d'IMG ou non.

CONSÉQUENCES

- 1. Elaborer un consentement face à une décision de diagnostic.**
 - *'all women should have a broad understanding of the purpose, risks, benefits, limitations and consequences of fetal anomaly screening' NICE 2008*
- 2. Glissement possible vers le diagnostic d'affection plus mineure.**
 - Exemple du diagnostic définitif de Klinefelter.
- 3. Nécessité de former les médecins, sages-femmes et le public.**
 - Expliquer les limites du test, le choix d'adhérer ou non.
- 4. Ressources de laboratoires.**
 - Probablement le plus gros frein au déploiement de la technique.
 - Nécessité d'une centrifugation immédiate pour le RNA.
- 5. Coût du test.**
 - Diminution des tests invasifs, mais ...

RECOMMENDATIONS DU GROUPE ANGLAIS



PHG Foundation
Caroline Wright
January 2009

RECOMMANDATIONS. *PRENAT DIAGN. 2012; 32 : 1 - 2*

1. Dépistage en population.

- Montrer l'efficacité en population à bas risque
- Test adapté à des sous-populations, jumeaux, PMA ...
- Cost-effective
- Risque composite avec d'autres méthodes de dépistage, comme l'écho.

2. Counseling prénatal.

- Aux USA, test ciblé sur la trisomie 21, ~ 50 % des anomalies diagnostiquées par le caryotype. En Chine détection également de trisomie 18.
- Toutes les trisomies ne sont pas diagnostiquées (*faible quantité de DNA*)
- Occasionnel Faux-positif. Confirmation par CVS ou amniocentèse
- MPS positif très haut risque de T 21, le temps du résultat de CVS très angoissant.
- Pour maladie mendélienne, nécessité de CVS ou amniocentèse.

CONCLUSION
