



Dépistage ~~non invasif~~ de la trisomie 21 par analyse de l'ADN foetal circulant

Contacts:

Jean-Marc Costa, jmcosta@lab-cerba.com

Pascale Kleinfinger, pkleinfinger@lab-cerba.com

Laurence Lohmann, llohmann@lab-cerba.com



DÉPISTAGE DE LA TRISOMIE 21 EN FRANCE: QUELQUES REPÈRES

	2007	2008	2009	2010	2011	2012*
Caryotype fœtaux	89 739	83 596	79 105	55 568	45 043	40 901*
Trisomies 21	1 908	1 903	1 918	1 934	1 944	1 970*
%	2,1%	2,3%	2,4%	3,5%	4,3%	4,7%
Evaluation pertes fœtales (simulation)	448	418	395	268	225	205
Nb naissances vivantes**	818 705	828 404	824 641	832 799	823 394	822 000

* Source: chiffres provisoires 2012, source Rapport ABM annuel agrégé des activités de diagnostic prénatal

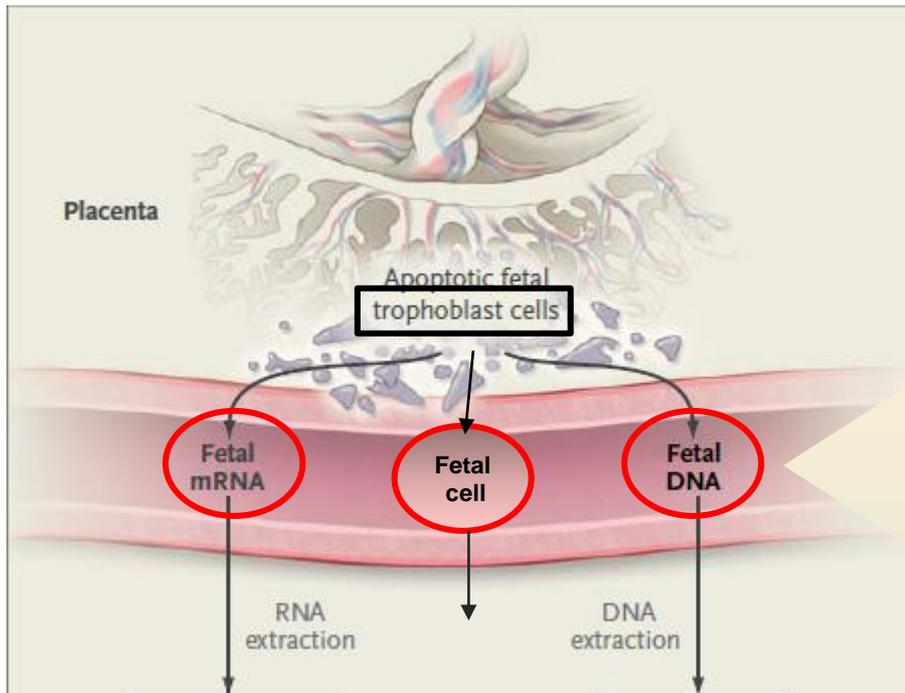
** Source : Chiffres INSEE (2007 à 2011 chiffres définitifs, 2012 chiffres provisoires estimés)

- La moitié des prélèvements invasifs sont faits sur indication MSM + antécédents d'aneuploïdie + âge maternel isolé
- Seulement 4,7% de positifs
- 0,5 à 1% des amniocentèses et des biopsies du trophoblaste conduisent à une fausse couche

(Tabor et al, 2009)

TEST NON INVASIF POUR LES TRISOMIES 13, 18 ET 21 FŒTALES

L'ADN FŒTAL CIRCULANT

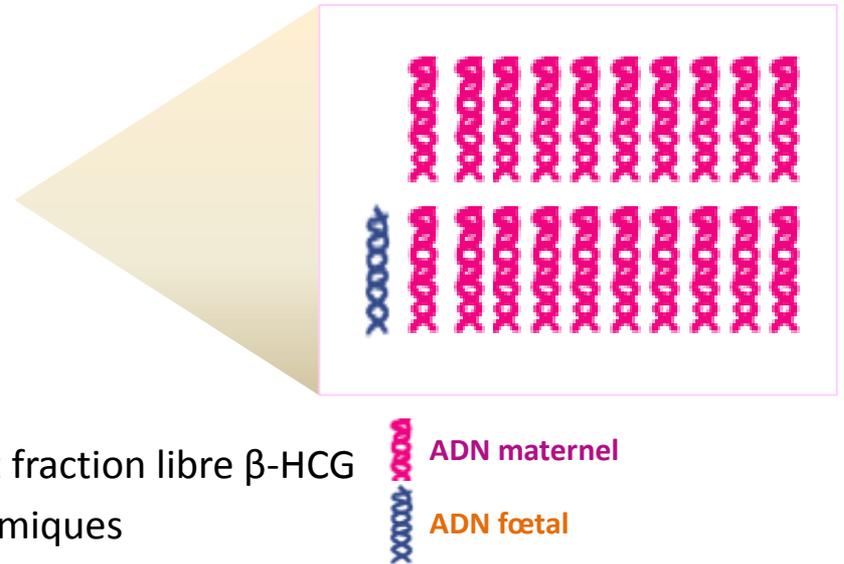


- Origine cellulaire: les cellules **cyto/syncytiotrophoblastiques**
- Apparition (détection) **précoce** dans la circulation maternelle \approx 5-6SA
- Quantité augmente avec le terme de la grossesse
- Disparition rapide ($<$ 48 h) après accouchement (1/2 vie 16 min)
- **Pas de persistance** après grossesse

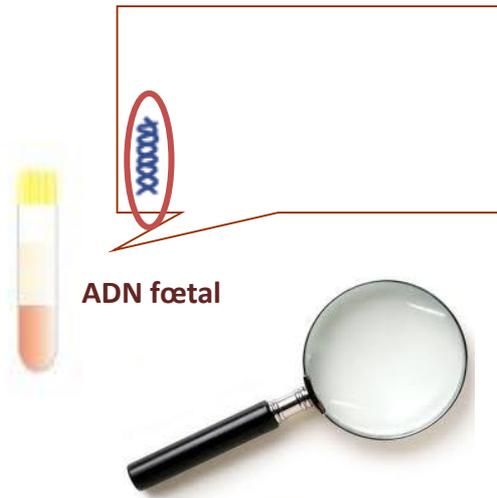
ADN FŒTAL CIRCULANT

► Les difficultés

- Quantité faible
 - ✓ 1^{er} trimestre: 20-30 Geq/ml
- Fraction fœtale: 5-10%
 - ✓ Age gestationnel
 - ✓ Indice de masse corporelle
 - ✓ Corrélation avec le taux de PAPP-A et fraction libre β -HCG
 - ✓ Pas de corrélation avec an. chromosomiques et autres facteurs maternels (tabac, ethnologie...)
- Ne peut pas être isolé



ANALYSE DE L'ADN FOËTAL CIRCULANT : PASSAGE DU QUALITATIF AU QUANTITATIF



Analyse qualitative

(Recherche de marqueurs foetaux absents du génome maternel)

Détermination du sexe foetal

Génotypage RHD, Ce et Kell

Achondroplasie, hypochondroplasie et nanisme thanatophore (*de novo*)

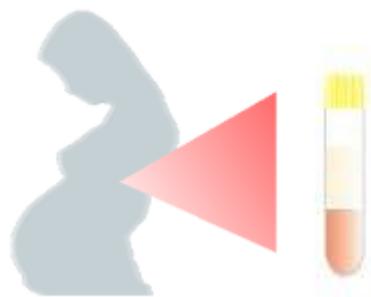
Analyse quantitative

(Marqueurs foetaux spécifiques ou non)

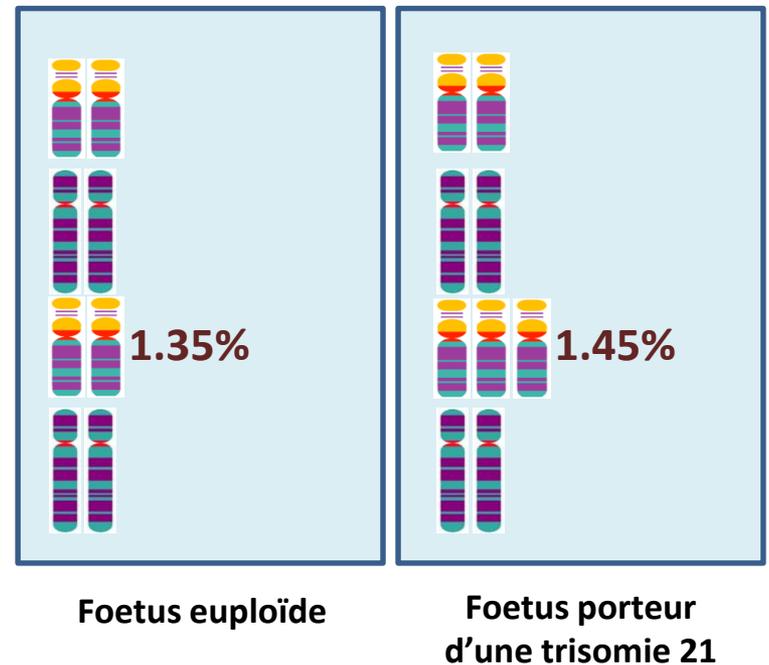
Aneuploïdies

ANALYSE QUANTITATIVE NON SPÉCIFIQUE

- Challenge: mise en évidence d'une sur-représentation d'ADN circulant lorsque le fœtus est porteur d'une aneuploïdie



90% Maternel 21
Maternel autres
10% Foetal 21
Foetal autres



ANALYSE QUANTITATIVE NON SPÉCIFIQUE

- Quantification par « massively parallel sequencing (MPS) »

Genetic Analyzer
Solexa (Illumina)



[Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood.](#)

Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Oct 21;105(42):16266-71. Epub 2008 Oct 6.

18 patientes

(terme médian: 18 semaines)

Tous les cas (9) correctement identifiés

SOLID sequencing
(Applied Biosystems)



[Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 23;105\(51\):20458-63. Epub 2008 Dec 10.](#)

Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma.

[Chiu RW](#), [Chan KC](#), [Gao Y](#), [Lau VY](#), [Zheng W](#), [Leung TY](#), [Foo CH](#), [Xie B](#), [Tsui NB](#), [Lun FM](#), [Zee BC](#), [Lau TK](#), [Cantor CR](#), [Lo YM](#).

14 patientes

(terme médian: 14 semaines)

Tous les cas (9) correctement identifiés

ANALYSE QUANTITATIVE NON SPÉCIFIQUE



Calcul de la fraction du chromosome 21

=% seq of 21 par rapport au total des seq de tout le génome

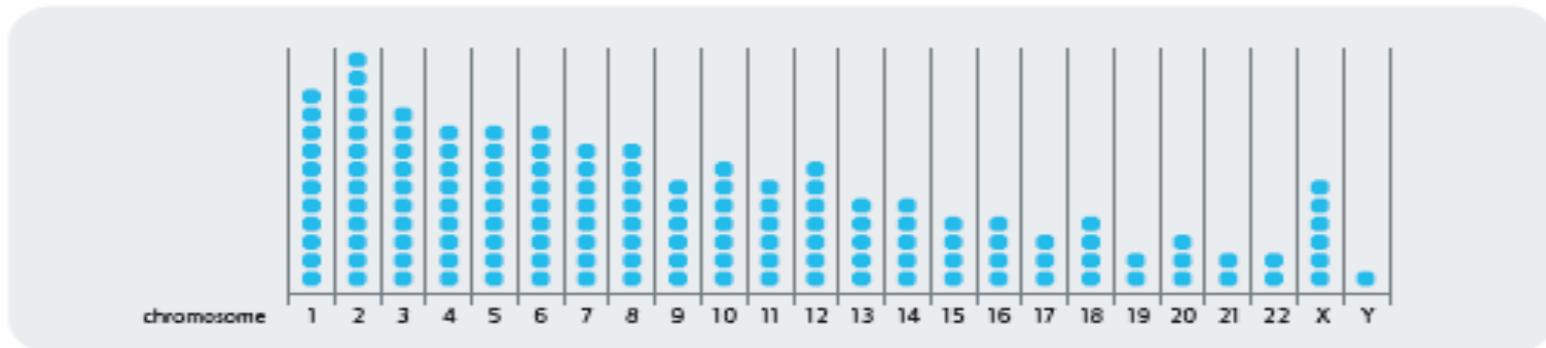
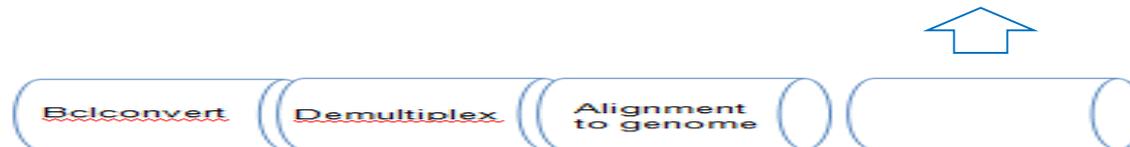
Calcul d'un Z-score

=%21sample-mean%21reference/SD median%21reference

Interprétation

TCCGCCAGGCCATGAGGACCTGGAAATGGCTGAT

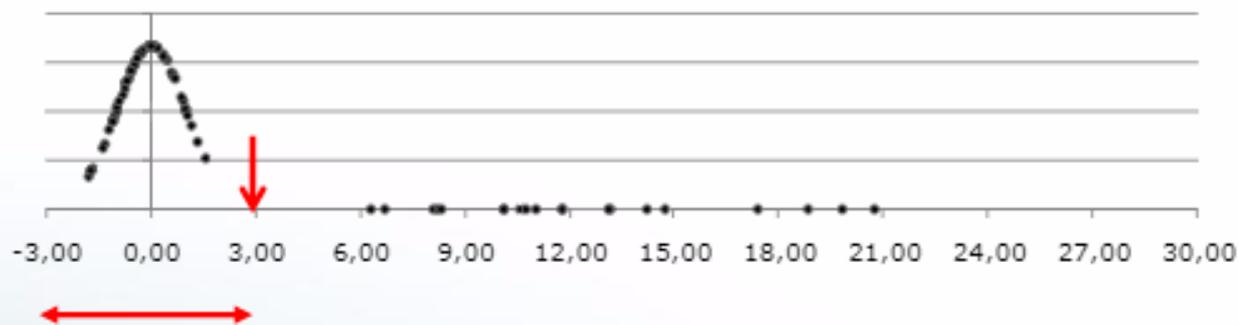
x9 10+6/échantillon



DOSAGE CHROMOSOMIQUE FŒTAL PAR MPS

Calcul du Z-score

$$= \frac{\text{sample-mean} - \text{référence}}{\text{SD médiane} - \text{référence}}$$



Distribution « normale » des séquences pour la population de référence
99,8%



Un Z-score de 3 signifie que la valeur mesurée est distante de 3 écarts-types de la valeur cible. La probabilité de trouver une valeur à l'extérieur est de 0,17% pour une distribution normale. Si une valeur est à l'extérieur, cela ne peut s'expliquer par les simples fluctuations statistiques.

Z-score > 3 signe la sur-représentation chromosomique

ANOMALIES CHROMOSOMIQUES RECHERCHÉES

- ✓ **TRISOMIE 21** (sens 99,64%- spéc 99,96%)

- ✓ **TRISOMIE 18** (sens 98,1%- spéc 99,44%)

- ✓ **ET TRISOMIE 13** (sens 93,33%- spéc 99,54 %) :
 - De moindre intérêt car
 - SETG,
 - prévalence moindre,
 - sensibilité du test moindre pour la trisomie 13
 - Avantage :
 - diagnostic plus précoce
 - Pas de difficulté éthique dans la prise en charge

ANOMALIES CHROMOSOMIQUES NON RECHERCHÉES

✓ CHROMOSOMES SEXUELS

- Non recommandée
- Argumentation :
 - Sensibilité moindre
 - Moins bonnes pour anomalies homogènes
 - Anomalies souvent en mosaïque ou anomalies de structure
 - Spécificité moindre
 - Mosaïques confinées au placenta
 - Perte physiologique du chromosome X avec l'âge
 - Intérêt médical discutable
 - Pas de modification de la prise en charge de la grossesse hors SETG

ANOMALIES CHROMOSOMIQUES NON RECHERCHÉES

✓ SYNDROMES MICRODELETIONNELS ET AUTRES ANOMALIES DE STRUCTURE

- Non recommandée
- Argumentation :
 - Bibliographie insuffisante

INDICATIONS

Les **objectifs** du dépistage non invasif sont, tout en respectant l'autonomie des patientes :

- ✓ D'améliorer **la spécificité** afin de diminuer le recours aux gestes invasifs.
- ✓ D'améliorer la **sensibilité** du dépistage des aneuploïdies.
- ✓ De **simplifier le parcours de soin**.
- ✓ De ne **pas détériorer** la qualité du diagnostic des **autres anomalies chromosomiques déséquilibrées**.

- ✓ Risque accru de trisomie 21 foetale
 - Risque MSM $\geq 1/1000$

POURQUOI UNE ÉTUDE EN POPULATION GÉNÉRALE ?

ULTRASOUND in Obstetrics & Gynecology

Ultrasound Obstet Gynecol 2013; 42: 34-40
Published online 7 June 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/ug.12504



Implementation of maternal blood cell-free DNA testing in early screening for aneuploidies

M. M. GIL*, M. S. QUEZADA*, B. BREGANT*, M. FERRARO* and K. H. NICOLAIDES*†

*Morbidity Surveillance Research Centre for Fetal Medicine, King's College Hospital, London, UK; †Department of Fetal Medicine, University College Hospital, London, UK



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening

Diana W. Bianchi, M.D., R. Lamar Parker, M.D., Jeffrey Wentworth, M.D., Rajeevi Madankumar, M.D., Craig Saffer, M.D., Anita F. Das, Ph.D., Joseph A. Craig, M.D., Darya I. Chudova, Ph.D., Patricia L. Devers, M.S., C.G.C., Keith W. Jones, Ph.D., Kelly Oliver, B.S., Richard P. Rava, Ph.D., and Amy J. Sehner, M.D. for the CARE Study Group
N Engl J Med 2014; 370:799-808 | February 27, 2014 | DOI: 10.1056/NEJMoa1311037



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Cell-free DNA Analysis for Noninvasive Examination of Trisomy

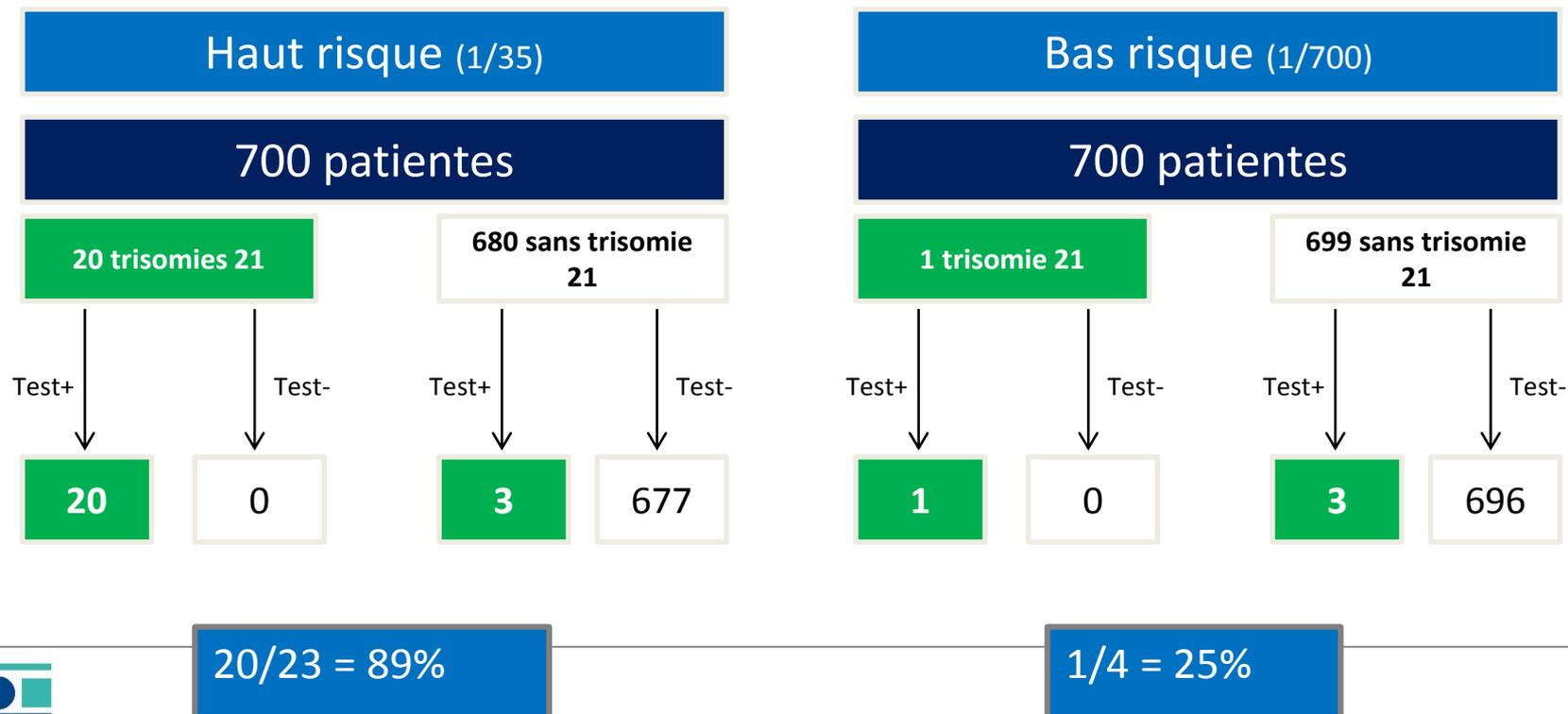
Mary E. Norton, M.D., Bo Jacobsson, M.D., Ph.D., Geeta K. Swamy, M.D., Louise C. Laurent, M.D., Ph.D., Angela C. Ranzini, M.D., Herb Brar, M.D., Mark W. Tomlinson, M.D., Leonardo Pereira, M.D., M.C.R., Jean L. Spitz, M.P.H., Desiree Hollemon, M.S.N., M.P.H., Howard Cuckle, D.Phil., M.B.A., Thomas J. Musci, M.D., and Ronald J. Wapner, M.D.

Valeur prédictive positive
Marqueurs sériques: 4,2-5,4%
NIPT: 45,5-80,9%

POURQUOI UNE ÉTUDE EN POPULATION GÉNÉRALE ?

La prévalence d'une pathologie modifie la VPP d'un test

Sensibilité	99,02%	Faux négatifs	0,98%
Spécificité	99,60%	Faux positifs	0,40%



✓ **Risque accru de trisomie 21 foetale**

- **Risque MSM $\geq 1/1000$**

- AM ≥ 38 ans pour les patientes sans MSM
- ATCD de grossesse avec aneuploïdie foetale
- Translocation robertsonnienne impliquant un chromosome 21

✓ **Risque accru de trisomies 13 ou 18**

- Translocation robertsonnienne impliquant un chromosome 13
- Trisomie 18 sur les MSM

✓ **Risque difficile à évaluer :**

- Grossesses multiples (sens 94,4% pour les jumeaux)
- MSM hors bornes

✓ CONTRE-INDICATIONS

Anomalies échographiques

- Risques d'anomalies chromosomiques autres compris entre 2 et 8%
- Et les « soft signs » ?? : Projet de travail en cours
- Dont la CN \geq 3,5 mm

✓ CN comprise entre le 95^{ème} percentile et 3,5 mm

- Risque autres anomalies chromosomiques = 1/116 (*Snidjer et al, 1998*)
- Impossible de faire un prélèvement invasif pour 5% de la population
- Donc ???

Compromis : avis CPNPN

LIMITES DU TEST

- VANISHING TWIN
- MOSAIQUE FŒTALE
- TRIPLOIDIES
- DISCORDANCES FOETOPLACENTAIRES
- ANOMALIES MATERNELLES EN MOSAIQUE :
 - - constitutionnelles
 - - acquises : cancer

DPNI AU SEIN D'UN PARCOURS DE SOIN

- ✓ Possible ≥ 10 SA, préconisé après mesure de la CN
- ✓ Consultation avant le prélèvement :
 - Médecin, SF, conseillé en génétique
 - Test de dépistage
 - FN, autres anomalies chromosomiques méconnues
 - Echec possible
 - résultat positif = prélèvement invasif de confirmation

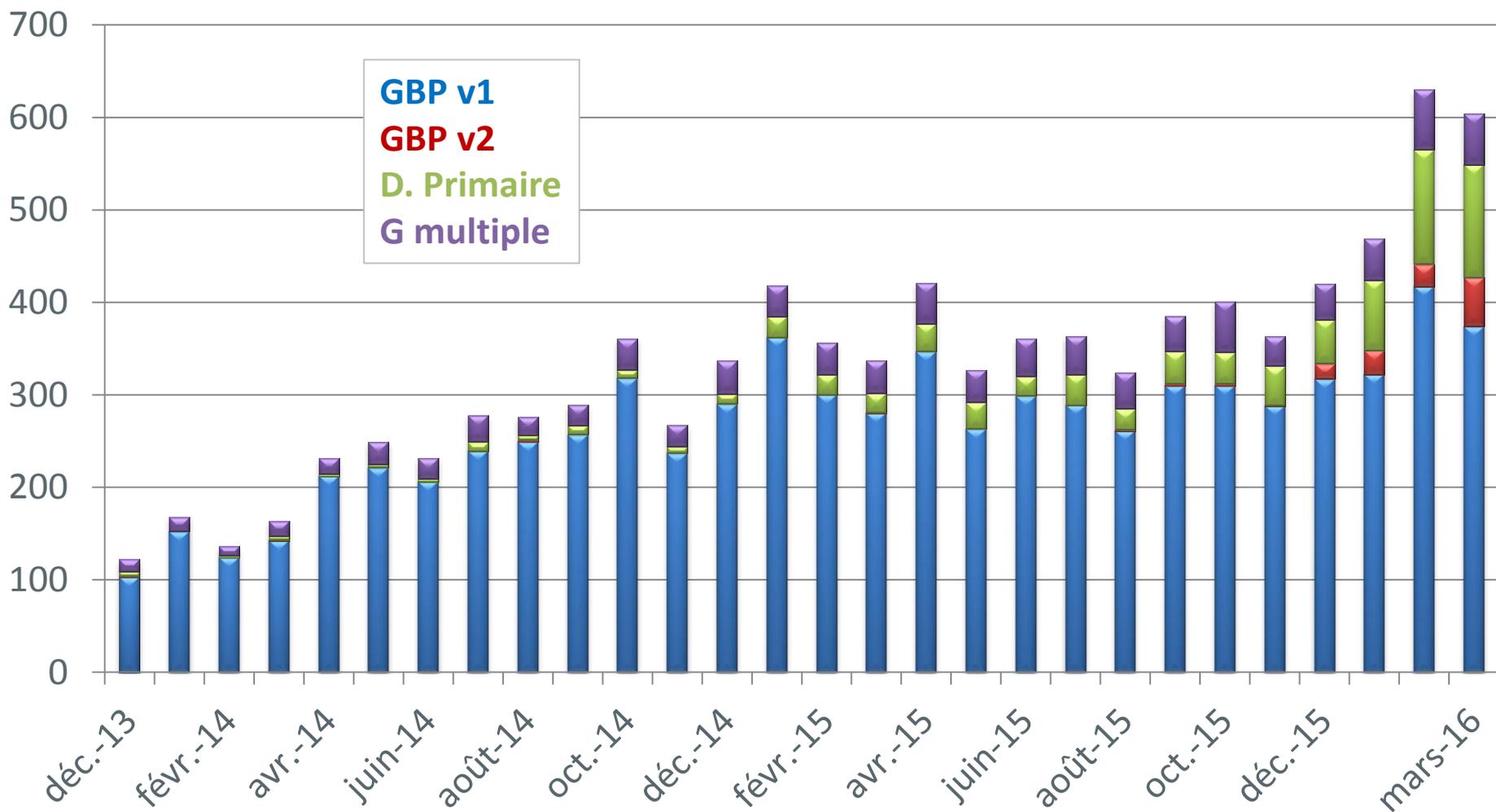
DPNI AU SEIN D'UN PARCOURS DE SOIN

✓ Consultation pour le rendu du résultat :

- Médecin, SF, conseillé en génétique
- Rendu sous forme **orale et écrite**
- Si résultat négatif, la patiente peut demander un prélèvement invasif
- Si résultat positif = prélèvement invasif pour **confirmation + mécanisme**
 - Aucune décision d'IMG ne pourra être prise sans cette confirmation.
 - PLA ou BT : **prudence sur le rendu de l'examen direct du trophoblaste**

NOMBRE D'ANALYSE / MOIS : ÉVOLUTION DES INDICATIONS

oct 2013 -> mars 2016, 9802 patientes



RÉSULTATS NON EXPLOITABLES

9802 patientes



86 non exploitables

- 1/3 sur grossesses multiples (58 singletons, 26 gémellaires, 2 triples)
- 57 FF basses, 25 Zs non interprétables, 4 autres

Au total : 0,3%

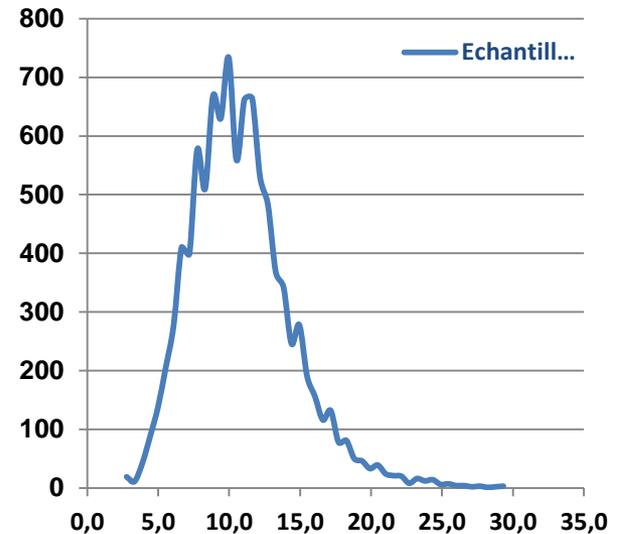
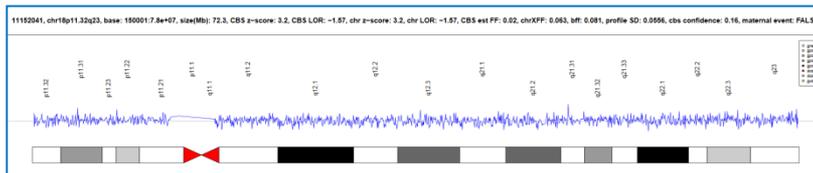
0,2% pour les grossesses singletons

1% pour les grossesses gémellaires

2,8% pour les grossesses triples

RÉSULTATS RENDUS

- Délai moyen : **11 jours**
- Fraction fœtale médiane **10,5%**
- 9741 patientes avec résultats :
 - Résultat **négatifs 97%** patientes
 - Un T18 faussement négatif (FF 8%, TC 18 M, Zs 2,8)



Fraction fœtale : médiane 10,5%

- Résultats positifs :
 - 272 trisomies 21
 - 30 trisomies 18
 - 20 trisomies 13

RÉSULTATS RENDUS

- Trisomie 21

- 272 résultats positifs dont 10 grossesses gémellaires
- Le diagnostic final de trisomie 21 est confirmé sur caryotype fœtal pour 174 (dont 4 mosaïques et deux translocations). Il est infirmé dans 9 cas (dont 3 en raison d'un vanishing twin, un prévisible sur les Zs) soit une **VPP de 95,1%** (174/183) (36 dossiers en cours).

- Trisomie 18

- 30 résultats positifs dont 1 grossesses gémellaires
- Le diagnostic final de trisomie 18 est confirmé sur caryotype fœtal pour 14 et possible pour 1 (mort fœtale) ; il est infirmé dans 7 cas soit une **VPP de 68,2%** (15/22) (5 dossiers en cours).

- Trisomie 13

- 20 dont 1 prévisible après réduction d'un embryon atteint de trisomie 13.
- Pour les 19 autres, le diagnostic final de trisomie 13 est confirmé sur caryotype fœtal pour 6 et possible pour 1 (mort fœtale) ; il est infirmé dans 7 cas soit une **VPP de 50%** (7/14) (5 dossiers en cours).

CONCLUSION

- **Intérêts**

- L'ADN fœtal circulant est un biomarqueur « universel »
 - Une molécule à doser
 - Quel que soit le terme de la grossesse
- Performances du test (vs dépistage par les marqueurs sériques)
 - Sensibilité:
 - Dépistage « conventionnel » : 80-85%
 - Dépistage ADN fœtal : >99%
 - Valeur prédictive positive (VPP)
 - Dépistage « conventionnel » combiné 1^{er} trimestre : 6,1% (1/17)
 - Dépistage ADN fœtal : 95%
 - Diminution du nombre de gestes invasifs
 - Dépistage « conventionnel » : 4% soit 19.000 femmes/an en France
 - Dépistage ADN fœtal : 0,4% soit 1.9000 femmes/an en France

- **Limites**

- Test coûteux et non remboursé
- Durée d'analyse longue (1-3semaines)
- Parfois résultat non exploitable
- Perte d'information (ce n'est pas un caryotype)