



*Diagnostic prénatal
et
biologie moléculaire*

> **JM COSTA**
Laboratoire Pasteur Cerba

Annaba 4 Juin 2009





Diagnostic prénatal *in utero* en France

Principales indications

- | | |
|---|--------|
| • Anomalies chromosomiques | 92.594 |
| • Maladies et caractéristiques génétiques | 2.591 |
| - Mucoviscidose | |
| - Hémoglobinopathies | |
| - Amyotrophie spinale | |
| - Achondroplasie... | |
| • Foetopathies infectieuses | 5.697 |
| - Toxoplasmose | |
| - Cytomégalovirus, parvovirus B19, varicelle... | |

Données Agence de la Biomédecine 2006





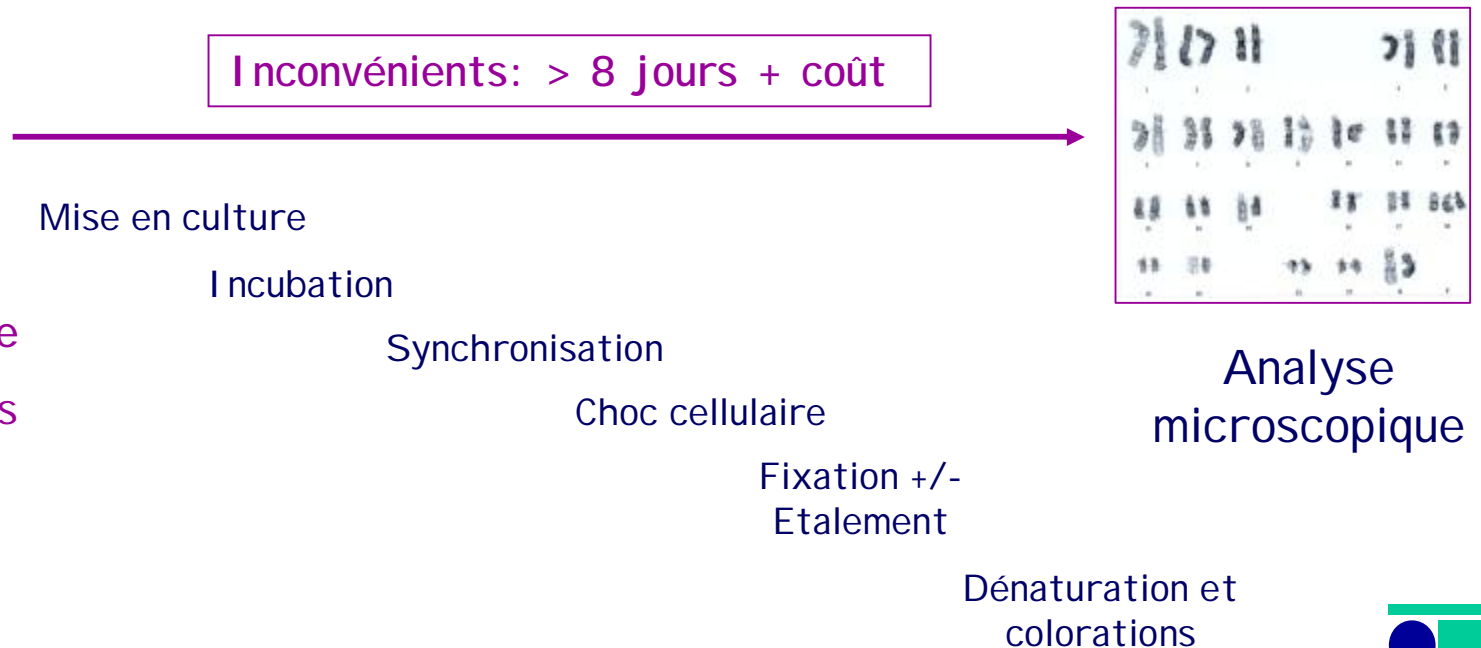
Diagnostic prénatal des anomalies chromosomiques

Approche conventionnelle: le caryotype foetal

- Obtention de cellules fœtales
- Mise en culture et établissement du caryotype fœtal



Liquide amniotique
Villosités choriales
Sang foetal



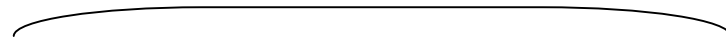
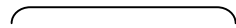


Diagnostic moléculaire des anomalies chromosomiques

Intérêt commun: ne nécessitent pas de culture cellulaire

Phase cellulaire
Cytogénétique moléculaire

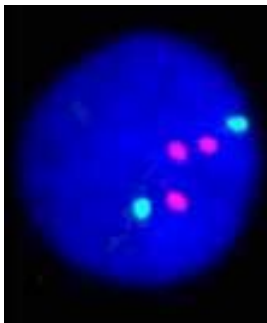
Phase homogène (ADN)
Génétique moléculaire



FISH

Méthodes ciblées

Méthodes globales



- CGH array
- SNP array
- Séquençage « massif »



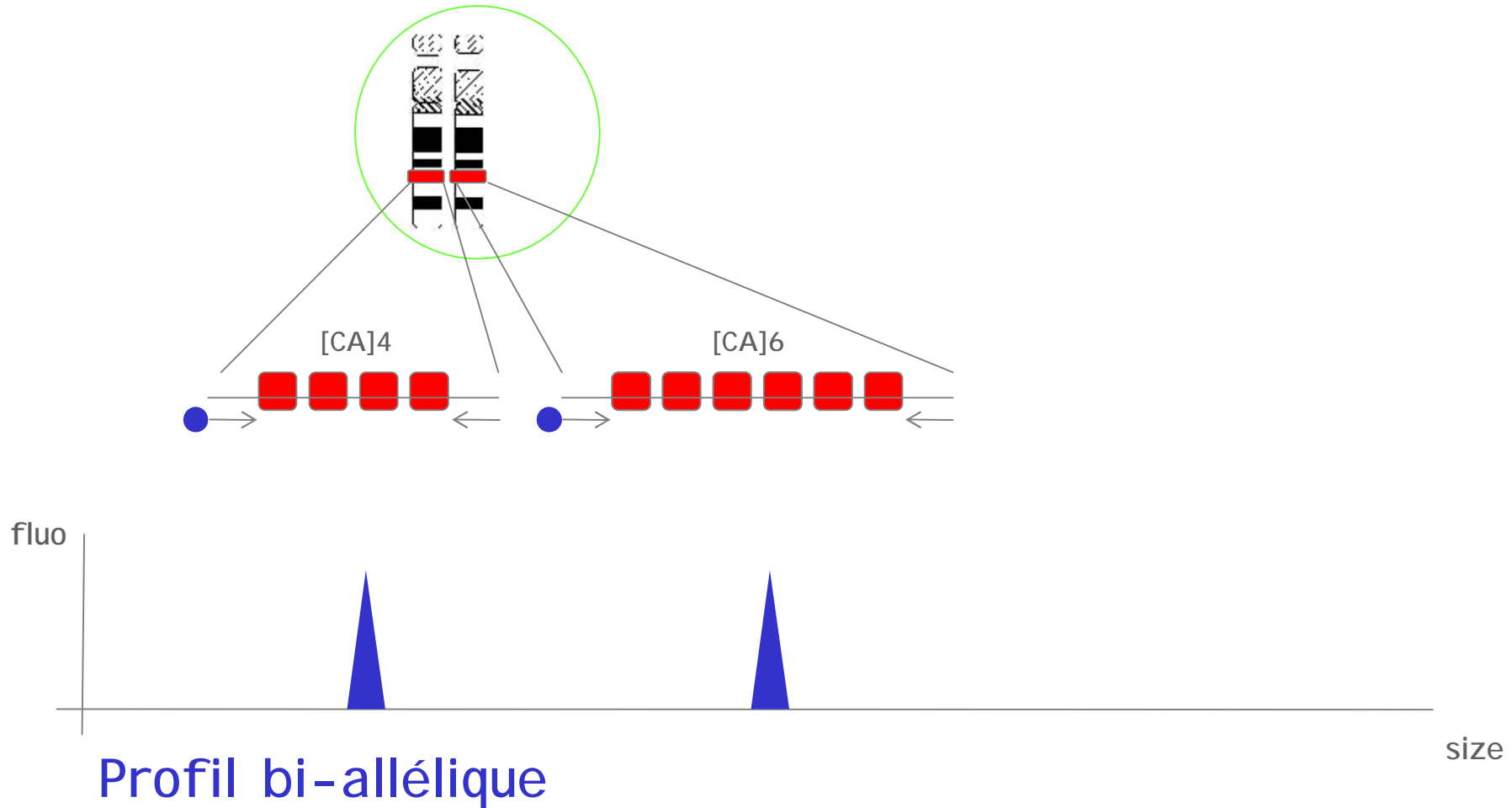


Diagnostic moléculaire des aneuploidies (trisomies 13,18,21)

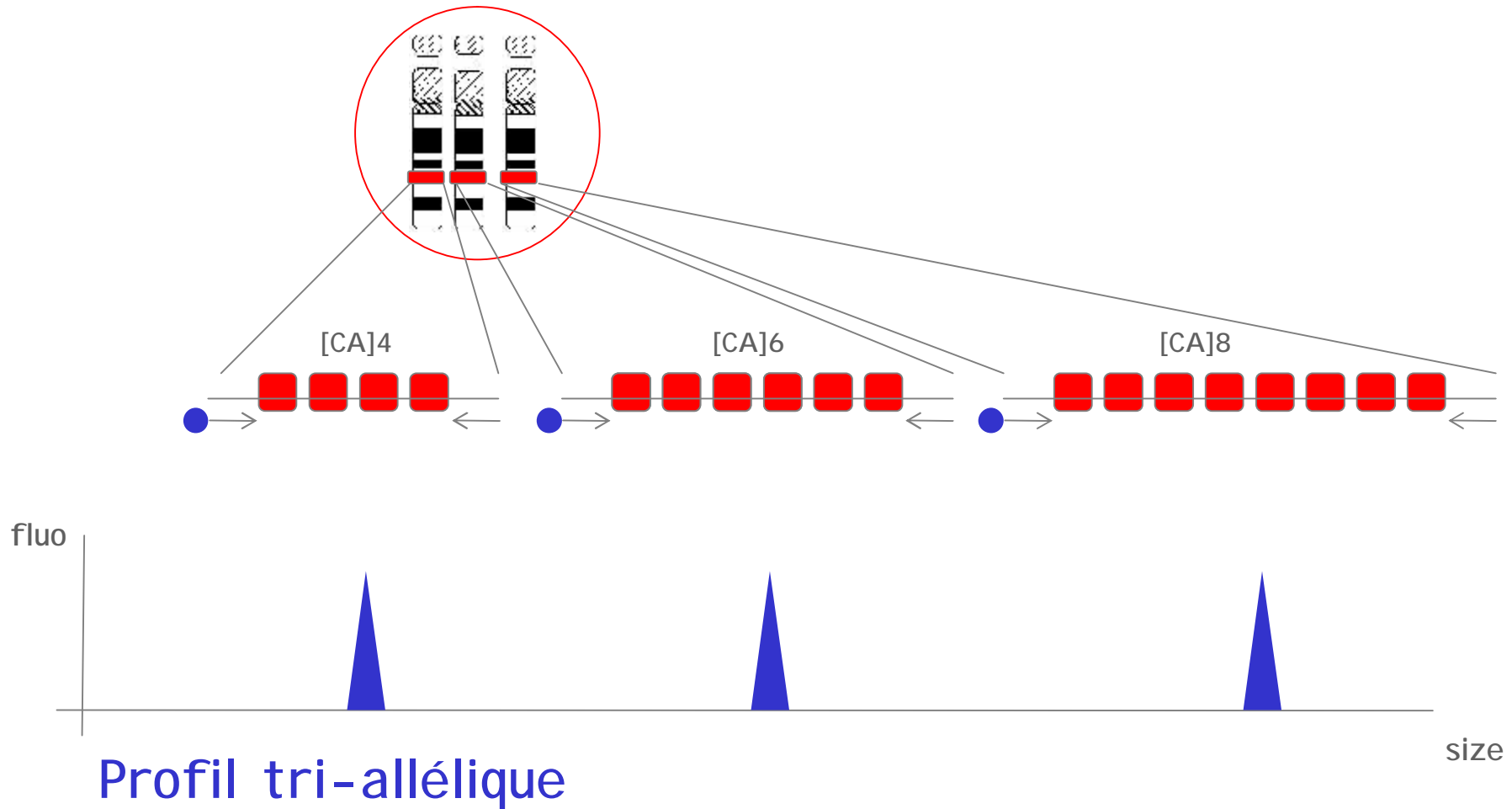
- PCR quantitative en temps réel
- Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments QMPSF
- Quantitative Fluorescent Multiplex PCR QFM-PCR
- Multiplex PCR Liquid Chromatography MPLC
- Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification MLPA
- Quantitative Fluorescent PCR QF-PCR
- Digital PCR
-



Détermination moléculaire des aneuploïdies: Analyse de microsatellites STR (QF-PCR)



Détermination moléculaire des aneuploïdies: Analyse de microsatellites STR (QF-PCR)





Diagnostic prénatal rapide QF-PCR

Interprétation: profil allélique trisomie 21





Diagnostic prénatal rapide des aneuploidies par QF-PCR

Intérêts et limites

- Intérêts
 - Ø Délai de réponse (24h)
 - Ø Nécessite peu de matériel de départ (2ml de liquide amniotique y compris congelé)
 - Ø Coût inférieur à l'hybridation in situ FISH, très inférieur au caryotype
 - Ø Se prête à automatisation > débit
- Limites
 - Ø N'explore pas l'ensemble des chromosomes
 - Ø Les mosaïques (probablement moins efficace que la FISH)
 - Ø Diagnostic d'exclusion pour les monosomies (Syndrome de Turner)
 - Ø Les échantillons non informatifs (FISH non concernée)





Détermination moléculaire des aneuploïdies:

Recommandations

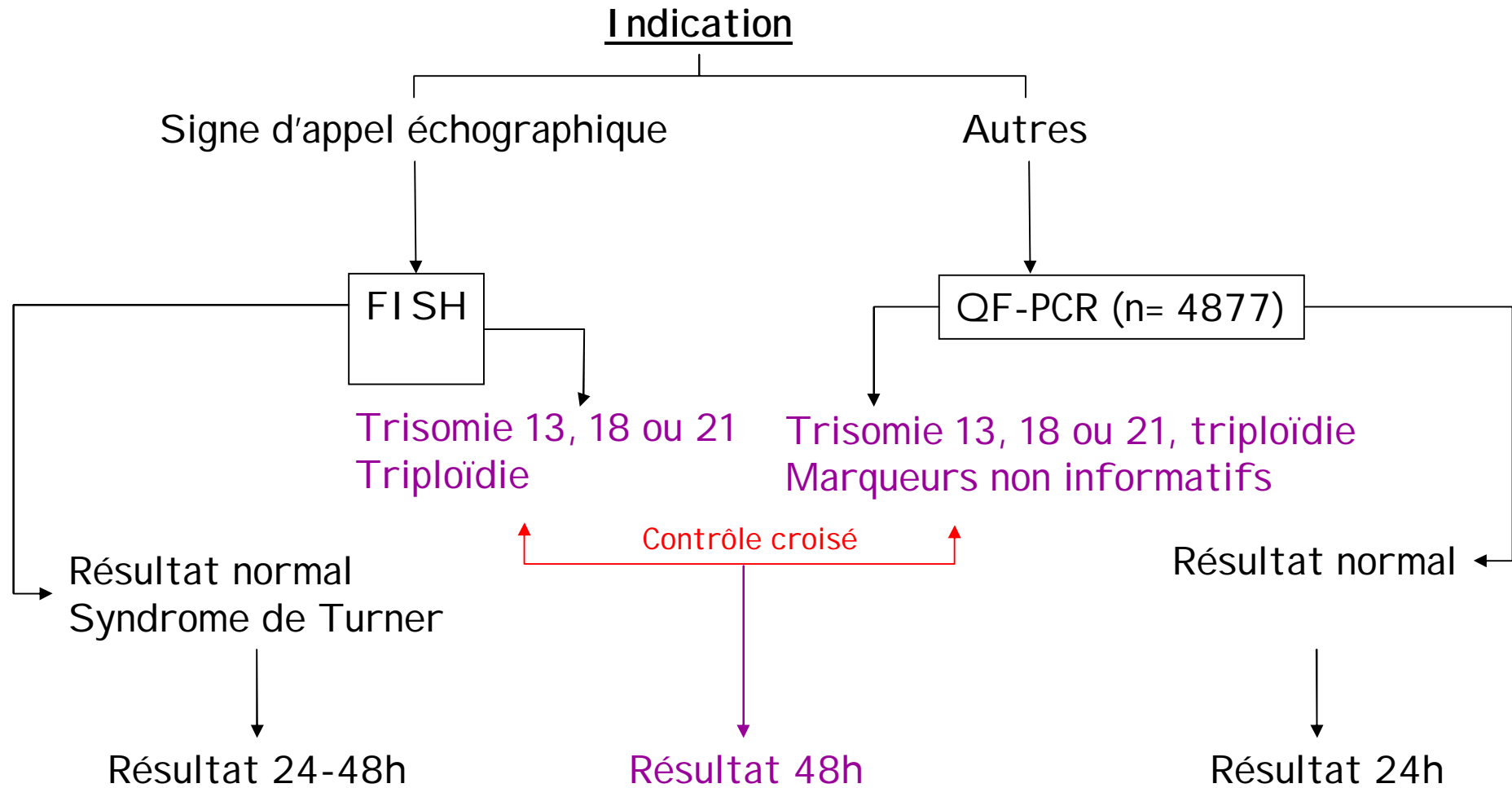
ACTTAG **CMGS** CGTGT CAGTACCGTACTTAGCGT
CGTACT **CMGS** ACGTGT CAGTACCGTACTCGTGT
TCAGTACCGTACTTAG **CLINICAL MOLECULAR** ACGTGT C
GTGT CAGTACCGTACT **GENETICS SOCIETY** ACGTGT CAG

- Association for Clinical Cytogenetics and Clinical Molecular Genetics Society QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy best practice guidelines v2.01 (2007)

“The use of QF-PCR analysis of short tandem repeats (STR) for the detection of aneuploidy has since been validated and successfully applied for the rapid diagnosis of prenatal aneuploidy by a number of UK and European labs. **The rapid result may be followed by full karyotype analysis of cultured cells**”



Détermination moléculaire des aneuploïdies: Expérience Pasteur Cerba 2007-2008



Détermination moléculaire des aneuploïdies: Expérience Pasteur Cerba 2007-2008

		Résultat QF-PCR		Résultat caryotype
Total	4877	Normal	4702	4647 caryotypes normaux
				55 anomalies chromosomiques dont 11 pouvant conduire à un phénotype anormal
		Trisomie 21	81	81 dont: 47,XX,+21[18]/46,XX[5] : 47,XY,inv(11)(q12?q22?)+21
		Trisomie 13	2	2 dont 46,XY,der(13;14)(q10;q10),+13
		Trisomie 18	15	15
		Triploidie	2	2
Contamination maternelle	52	1,07%		
Analyse supprimée	23	0,47%		

Risque résiduel 0.13-0.23%





Détermination moléculaire des aneuploïdies: Vers la fin du caryotype conventionnel complet?

- UK
 - Patientes à bas risque (absence de signes échographiques) : QF-PCR (hors chromosomes sexuels)
 - Deux centres : Londres (Guy's Hospital), Leeds
- NL
 - Patientes à bas risque (absence de signes échographiques) : MLPA > QF-PCR
 - Deux centres: Amsterdam, Nijmegen
- SVE
 - Patientes à bas risque (absence de signes échographiques) : QF-PCR ou Caryotype complet au choix de la patiente
 - Un centre: Stockholm



Diagnostic prénatal *in utero* en France: la question des pertes foetales

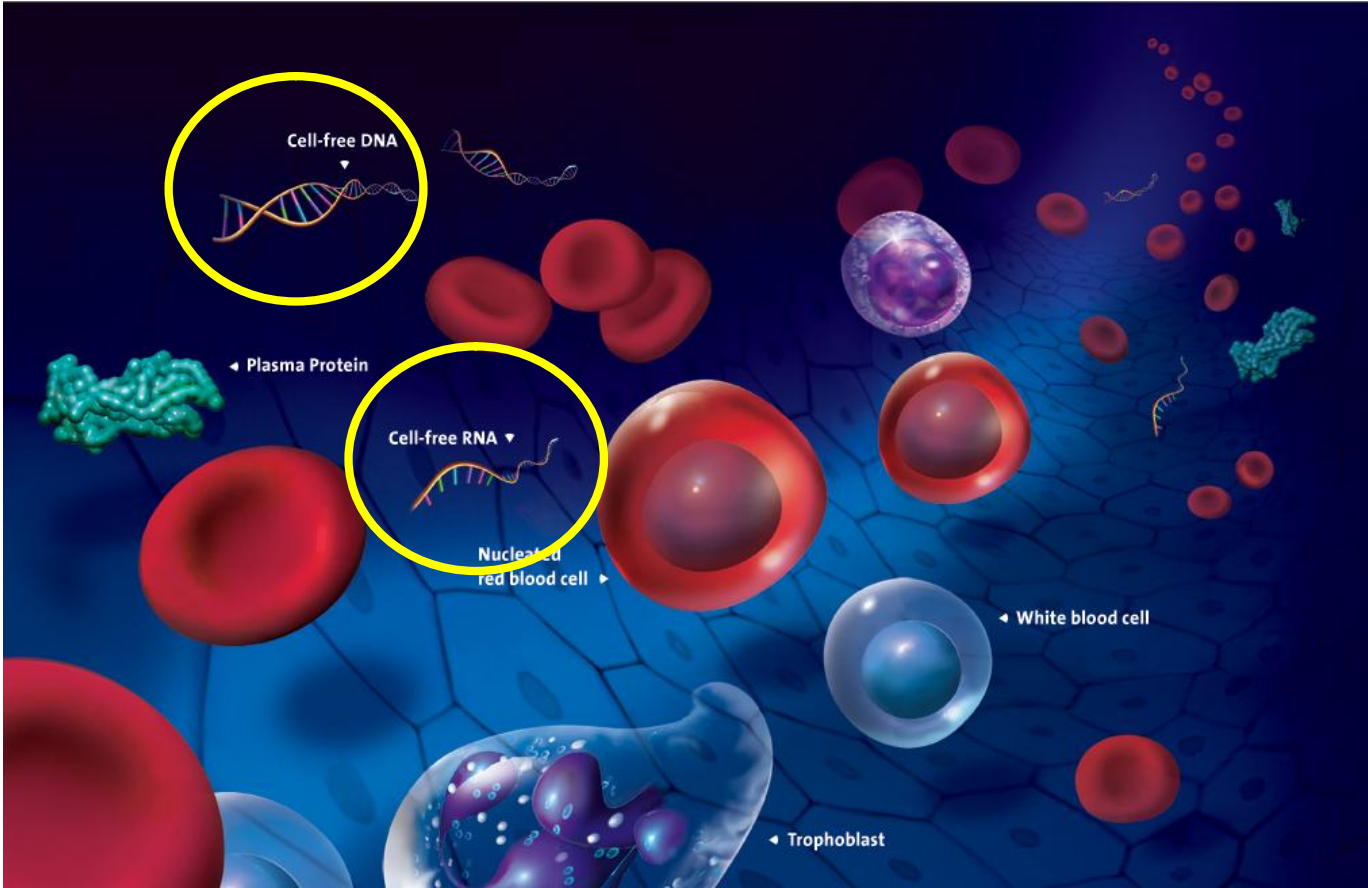
Indication	Nbre de caryotypes fœtaux	Nbre d'anomalies déséquilibrées	Nbre de trisomie 21	Nbre pertes foetales induites (pour un risque moyen de 1%)
Age maternel	32.463	758	421	324
Anomalies chromosomiques parentales	783	52		
Antécédent pour le couple	1.894	17		
Signes d'appel échographiques	16.970	2.342	984	169
Marqueurs sériques (pour 655.732 tests soit 5.3% d'amniocentèses induites)	37.221	618	403	372
Autre	1.855	44		
Sans motif médical	1.408	14		
Total	92.594	3.845		
	(pour 830.900 naissances vivantes soit 11.4% d'amniocentèses induites)			

Données Agence de la Biomédecine et INSEE pour l'année 2006



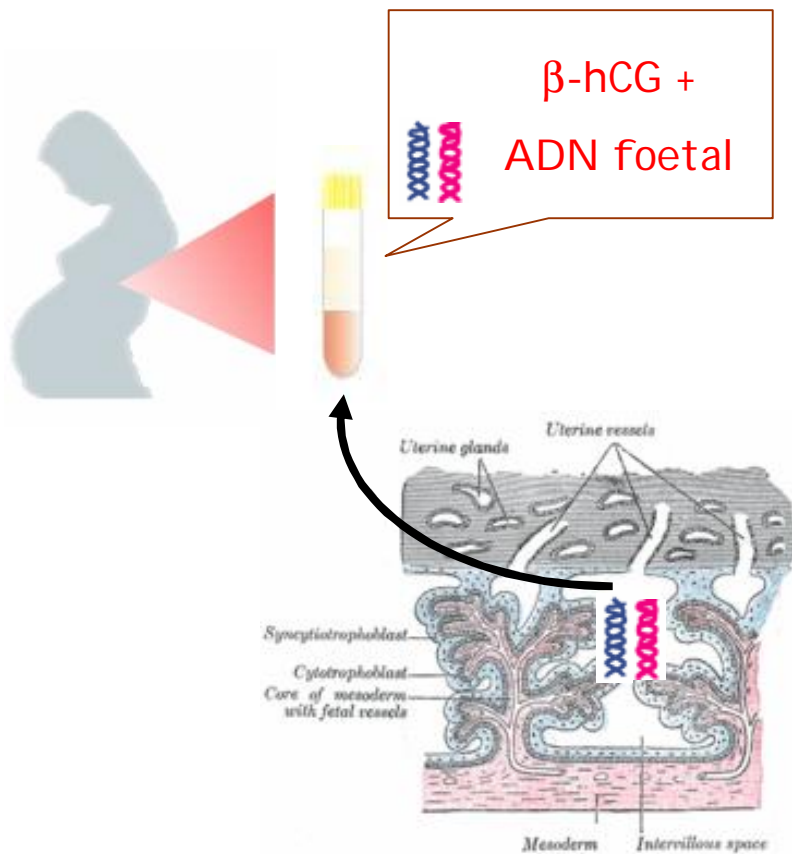


Diagnostic prénatal non invasif : le sang maternel



ADN foetal libre circulant

Physiopathologie (1)



- Origine tissulaire:
les villosités chorales
- Origine cellulaire:
les cyto/syncytiotrophoblastes





ADN fœtal circulant

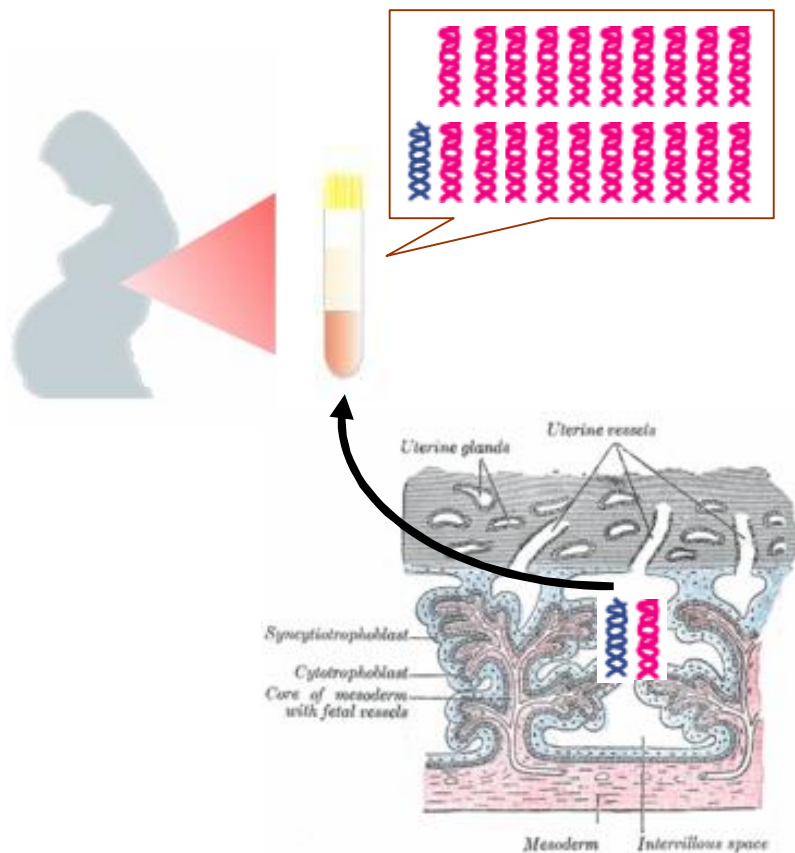
Physiopathologie (2)

- Apparition précoce dans la circulation maternelle (~ 6SA)
- Augmentation de la concentration tout au long de la grossesse
- Disparition rapide (< 48 h) après accouchement (1/2 vie 16 min)
- Pas de persistance après grossesse



Diagnostic prénatal à partir du sang maternel

ADN foetal libre: difficultés et limites d'analyse



- Ne représente que 3 à 6% de l'ADN plasmatique
- Analyse restreinte aux séquences absentes ou différentes du génome maternel





Analyse de l'ADN fœtal circulant

Indications actuelles

1. Détermination du sexe fœtal : séquences dérivées du chromosome Y (gène *SRY*)





Analyse de l'ADN fœtal circulant

Intérêts

- Maladies génétiques liées à l'X
 - Eviter un geste invasif (CVS) chez les patientes conductrices qui portent un fœtus de sexe féminin (ne présentant aucun risque)
- Hyperplasie congénitales des surrénales (déficit en 21-hydroxylase)
 - Eviter le recours à un traitement corticoïde chez les patientes qui portent un foetus de sexe masculin (traitement inutile)
- Ambiguïtés sexuelles échographiques
 - Aide à la prise en charge. Eviter le recours à une amniocentèse





Analyse de l'ADN fœtal circulant

Expertise Pasteur Cerba

1. Détermination du sexe fœtal : séquences dérivées du chromosome Y (gène *SRY*)

Année	Tests
2001	216
2002	347
2003	369
2004	413
2005	452
2006	451
2007	460
2008	497

Activité annuelle PC

Principales pathologies concernées:

- Myopathie de Duchenne et de Becker
- Déficit en 21-hydroxylase
- Hémophilies A et B
- Retards mentaux liés à l'X





Analyse de l'ADN fœtal circulant

Indications actuelles

1. Détermination du sexe fœtal : séquences dérivées du chromosome Y (gène *SRY*)
2. Génotypage rhésus D fœtal (incompatibilités foeto-maternelles): séquences dérivées du gène *RHD*





Pourquoi faut-il proposer le génotypage *RHD* foetal ?

Recommandation du CNGOF 2006

Intérêts

- Augmente la pertinence de la prophylaxie
Pour éviter 1 cas d'allo-immunisation, il faut traiter:
 - 278 femmes en l'absence de génotypage
 - 166 femmes si le génotype foetal RHD est connu positif
- Limiter l'exposition des immunoglobulines anti-D
 - Produits dérivés du sang
 - Produit rare (stocks limités)



Génotypage *RHD* foetal à partir du sang maternel

Expériences récentes en Europe 2007-2008

	Sanquin NL	IBGRL GB	Pasteur-Cerba FR
Patientes	2415	1869	2794
Terme (SA)	28	28	>10
Unconclusive	2.1%	3.0%	3.3%
Fœtus RHD négatif	915 (38.4%)	670 (35.9%)	894 (31,9%)
Faux-négatifs	7 (0,26%)	3 (0,16%)	0 (en cours)
Faux-positifs	5 (0,20%)	14 (0,75%)	>3 (0,10%)





Analyse de l'ADN fœtal circulant

Nouvelles applications (études cliniques en cours)

1. Diagnostic de l'achondroplasie

- ∅ Développement du test: **R**
- ∅ Etude multicentrique nationale **£** en attente avis CPP









2. Génotypage Kell

- ∅ Développement du test: **R**
- ∅ Etude préliminaire Antoine Béclère **£** début septembre 2009





Diagnostic prénatal non invasif de la trisomie 21: Où en est-on?

	Preuve de concept	Développement	Etude clinique	Routine
 Dosage chromosomique relatif (RCD) par ratios DNA-SNPs				
 Dosage chromosomique relatif (RCD) par Digital PCR				
 Quantification par « séquençage massif »				
 Dosage chromosomique relatif (RCD) par ratios RNA-SNPs	