

## Le Dépistage Prénatal Non Invasif DPNI des trisomies 13, 18 et 21

La découverte de la présence d'ADN fœtal dans le sang maternel associée à une nouvelle technologie de séquençage de très haut débit (NGS - *Next Generation Sequencing*), a ouvert de nombreuses perspectives dans le domaine du dépistage prénatal non invasif (DPNI). L'une des principales applications en est le dépistage des principales aneuploïdies fœtales : trisomies 13, 18 et 21.

### DPNI : une révolution dans le diagnostic prénatal

En France, l'arrêté du 23 juin 2009 a défini les modalités précises du dépistage de la trisomie 21 comportant le dosage des marqueurs sériques du premier trimestre (ou du deuxième trimestre) combiné à la mesure de la clarté nucale à l'échographie. Selon un communiqué du Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français du 29 janvier 2013 : « la mise en place avec succès de ce dépistage a permis une réduction sensible du nombre de prélèvements invasifs (amniocentèse et biopsie de trophoblaste) au plan national avec une diminution similaire des pertes fœtales secondaires à ces prélèvements (risque estimé à 1 %). S'il était mis en œuvre pour la trisomie 21, le DPNI, basé sur l'analyse de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel, permettrait de diminuer encore la fréquence des prélèvements invasifs chez les femmes à risque élevé (> 1/250). (...) On estime que 90 à 95 % des examens invasifs pourraient être évités, quand le DPNI est rassurant. Si en revanche le DPNI montrait une anomalie, ce résultat devrait être confirmé par un prélèvement invasif pour analyse du caryotype fœtal ».

L'apparition de plateformes de séquençage de très haut débit associées à un outil bioinformatique performant permet aujourd'hui, la détection des principales aneuploïdies fœtales avec d'excellentes performances (cf. tableaux 1 et 2 ci-après). Grâce à cette technologie innovante, une simple prise de sang suffit aujourd'hui pour réaliser un test de dépistage génétique de la trisomie 21, sans aucun risque pour le fœtus et avec une très grande fiabilité.

### DPNI : analyse de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel

Nous savons désormais que le sang maternel contient à la fois de l'ADN maternel et de l'ADN fœtal provenant des cellules trophoblastiques du placenta. Libéré dans le sang maternel sous forme de petits fragments d'ADN (150–200 paires de bases), l'ADN fœtal est détectable dès la 7<sup>e</sup> semaine de gestation. La quantité d'ADN fœtal varie en fonction de l'âge de la grossesse : 2 à 6 % vers 5 semaines, puis ce pourcentage augmente jusqu'à la fin de la grossesse. La durée de vie de l'ADN fœtal dans le sang maternel n'étant que de quelques minutes, il a disparu environ 30 min après l'accouchement, ce qui élimine toute contamination par une grossesse précédente.

En pratique, le diagnostic prénatal de T21 peut être réalisé dès la 12<sup>e</sup> semaine d'aménorrhée.

La fraction d'ADN fœtal est corrélée à l'évolution de la grossesse, mais elle est indépendante de l'âge maternel, de l'ethnie ou encore d'une éventuelle prise médicamenteuse ; elle diminue légèrement avec l'augmentation de l'indice de masse corporelle.

L'ADN fœtal étudié est en réalité un « ADN placentaire ». De fait, il est impératif de bien distinguer une vraie pathologie fœtale d'une mosaïque confinée au placenta, imposant la confirmation de chaque résultat positif par un caryotype réalisé sur prélèvement invasif.

### DPNI : aspects technologiques

Actuellement, ce dépistage est réalisé selon deux approches : une approche ciblée (sur les chromosomes 13, 18 et 21) et une approche plus globale, pangénomique, fondée sur le séquençage massif d'ADN (*Massively-Parallel Sequencing* ou *MPS*).

Le Laboratoire Biomnis a fait le choix d'une collaboration avec la société Illumina pour un transfert technologique du test Verifi® (*Verinata*). Ce test de séquençage massif d'ADN est réalisé avec un séquenceur HiSeq™ 2500 d'Illumina. Son principe repose sur la lecture d'un grand nombre de séquences cibles des chromosomes 13, 18 et 21. Ces cibles sont lues sans différenciation préalable des fractions fœtales et maternelles. Une capture bioinformatique sur les chromosomes d'intérêt et une exploitation bio statistique

permettent de rendre les résultats des aneuploïdies sous forme d'un résultat normalisé (NCN) par rapport à une référence génomique du fœtus étudié.

Contrairement à l'approche ciblée, le séquençage massif parallèle d'ADN couvre la totalité du génome et permet un rendu de résultats plus rapide, avec un taux d'échec (impossibilité de rendre un résultat) observé au Laboratoire Biomnis de 0,4 %, essentiellement chez des femmes ayant un indice de masse corporelle très élevé, ce qui limite la détection de la fraction fœtale.

Le tableau 1 ci-dessous résume les caractéristiques comparées des différentes technologies de DPNI ; le tableau 2 précise les performances obtenues avec le test Verifi® utilisé chez Biomnis sur un séquenceur HiSeq™ 2500 d'Illumina.

**Tableau 1 : caractéristiques comparées des différentes technologies pour le DPNI**

|                 | Verifi®<br>Illumina      | MaterniT21<br>Sequenom   | Harmony<br>Ariosa        | Panorama<br>Natera                               |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| Méthode         | MPS*                     | MPS                      | Ciblé                    | Ciblé  |
| Nb de Reads     | > 19.0M                  | 16.3M                    | 1.1M                     | 6.5M   |
| Taux d'échec    | 0.07 %                   | 1.4 %                    | 4.6-4.9 %                | 5.9-12.6 %                                       |
| Délai technique | 3-6 jours                | 7-10 jours               | 7-10 jours               | 7-10 jours                                       |
| Prélèvement     | 2 tubes de sang maternel | 2 tubes de sang maternel | 2 tubes de sang maternel | 2 tubes de sang maternel + 2 tubes sang paternel |

\* MPS: Massively-Parallel Sequencing

- Rabinowitz, et al. ASHG Abstract 2012.; Presented data at NSGC AEC 2012
- Norton ME, et al. *Am J Obstet Gynecol.* 2012 doi:10.1016/j.ajog.2012.05.021
- Palomaki GE, et al. *Genet Med.* 2012 Mar;14(3):296-305
- Futch et al., *Prenat Diagn* 2013 Apr [Epub ahead of print]

**Tableau 2 : données obtenues avec le test Verifi® d'après l'étude MELISSA (Maternal Blood Is Source to Accurately Diagnose Fetal Aneuploidy). Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Genome-Wide Fetal Aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing, *Obstet Gynecol.* 2012 May; 119(5): 890-901.**

| Performance    | Sensibilité       | 95 % IC    | Spécificité        | 95 % IC    |
|----------------|-------------------|------------|--------------------|------------|
| T21<br>(n=493) | 100 %<br>(89/89)  | 95.9-100.0 | 100 %<br>(404/404) | 91.1-100.0 |
| T18<br>(n=496) | 97.2 %<br>(35/36) | 85.5-99.9  | 100 %<br>(460/460) | 99.2-100.0 |
| T13<br>(n=499) | 78.6 %<br>(11/14) | 49.2-99.9  | 100 %<br>(485/485) | 99.2-100.0 |

Au plan de l'interprétation, les limites sont actuellement bien répertoriées, les faux positifs (estimés à 0,2 %) pouvant résulter d'une mosaïque confinée au placenta, d'une anomalie du

nombre de copies maternelles (mosaïque maternelle) ou d'une néoplasie maternelle ; les faux négatifs (0,08 %) seraient liés à des mosaïques très faibles d'aneuploïdies 13,18 et 21, des anomalies de structures impliquant des segments chromosomiques (13,18 et 21) de très petite taille ou d'autres chromosomes que les 13, 18 et 21 (0,2%) ou encore d'une triploïdie (69XXX).

## Conclusion

Le DPNI des trisomies 13, 18 et 21 est applicable en routine ; ses très bonnes performances ont été démontrées dans de nombreuses publications internationales.

Ce test non invasif est désormais disponible au Laboratoire Biomnis, hors nomenclature dans l'attente des directives des Autorités de Santé.

## Références :

1. Tracy Futch, John Spinosa, Sucheta Bhatt, et al. Initial clinical laboratory experience in noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy from maternal plasma DNA samples. *Prenatal Diagnosis* 2013;33: 569-574.
2. Norton ME, Brar H, Weiss J, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012 Aug;207(2):137.e1-8. doi: 10.1016/j.ajog.2012.05.021. Epub 2012 Jun 1. PubMed PMID: 22742782.
3. Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med.* 2012;14(3):296-305. doi: 10.1038/gim.2011.73. Epub 2012 Feb 2. PubMed PMID: 22281937
4. American College of Obstetricians and Gynecologists and Society for Maternal-Fetal Medicine. Committee Opinion No. 545, December 2012. Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol* 2012;120:1532-4.
5. Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, et al. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206(4):322.
6. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Maternal Blood IS Source to Accurately Diagnose fetal aneuploidy (MELISSA) Study Group. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol.* 2012;119(5):890-901.
7. Sparks AB, Wang ET, Struble CA, et al. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn.* 2012;32(1):3-9.
8. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, et al. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206(4):319.e1-9.
9. Wellesley D, Dolk H, Boyd PA, et al. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(5):521-6.
10. Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, et al. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn* 2012;32:1-9
11. Sehnert AJ, Rhees B, Comstock D, et al. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem.* 2011;57(7):1042-9.



12. Sayres LC, Allyse M, Norton ME, Cho MK. Cell-free fetal DNA testing: a pilot study of obstetric healthcare provider attitudes toward clinical implementation. *Prenat Diagn.* 2011;31(11):1070-6.
13. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, *et al.* DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med.* 2011;13(11):913-20.
14. Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, *et al.* Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;204(3):205.e1-11. Epub 2011 Feb 18.
15. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, *et al.* Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;23;105(51):20458-63.
16. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin No. 88, December 2007. Invasive prenatal testing for aneuploidy. *Obstet Gynecol.* 2007;110(6):1459-67.
17. Eddleman KA, Malone FD, Sullivan L, *et al.* Pregnancy loss rates after midtrimester amniocentesis. *Obstet Gynecol.* 2006;108(5):1067-72.
18. Palomaki GE, Steinort K, Knight GJ, Haddow JE. Comparing three screening strategies for combining first- and second-trimester Down syndrome markers. *Obstet Gynecol.* 2006;107(2 Pt 1):367-75.
19. Lo YM, Tein MS, Lau TK, *et al.* Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998;62(4):768-75. PubMed PMID: 9529358; PubMed Central PMCID: PMC1377040
20. Lo YM, Tein MS, Lau TK, *et al.* Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998;62(4):768-75.

