



**HAL**  
open science

# Techniques d'exploration chromosomique en prénatal : mises au point et applications

Stéphanie Brun

► **To cite this version:**

Stéphanie Brun. Techniques d'exploration chromosomique en prénatal : mises au point et applications. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0184 . tel-02412603

**HAL Id: tel-02412603**

**<https://theses.hal.science/tel-02412603>**

Submitted on 15 Dec 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX  
ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé  
SPÉCIALITÉ Génétique

Présentée et soutenue publiquement le 07 Octobre 2019

par

**Stéphanie BRUN-STÖCKLE**

Née le 30 Avril 1983 à Pessac

**TECHNIQUES D'EXPLORATION  
CHROMOSOMIQUE EN PRÉNATAL :  
MISES AU POINT ET APPLICATIONS**

**Directeurs de thèse**

Professeur Didier LACOMBE

Professeur Caroline ROORYCK-THAMBO

**Rapporteurs**

Professeur Cédric LE CAIGNEC

Professeur Christophe VAYSSIERE

**Jury**

Professeur Dominique DALLAY

Professeur Jacques HOROVITZ

Professeur Cédric LE CAIGNEC

Professeur Christophe VAYSSIERE

Juge

Juge

Juge

Juge

# REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes sincères remerciements :

- Aux membres du jury :

À Monsieur le Professeur Dominique Dallay, vous me faites l'honneur de juger ce travail. Vos qualités humaines, scientifiques et techniques sont pour moi un exemple. Je vous remercie de votre bienveillance et de votre disponibilité tout au long de mon parcours. Je vous remercie de toujours avoir trouvé le temps de me recevoir et de m'avoir aidée et soutenue. Recevez aujourd'hui le témoignage de mon plus profond respect.

À Monsieur le Professeur Jacques Horovitz, vous me faites l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie de votre accompagnement et de votre disponibilité au cours de ma formation : dès mon externat en me donnant l'envie de faire gynécologie-obstétrique jusqu'à ma formation en obstétrique et en médecine fœtale (tous les mardis tout au long de mon clinicat). Je vous remercie pour tous vos conseils et votre soutien lors de mon parcours professionnel ainsi que dans ma vie personnelle. Je tiens à vous exprimer ma sincère admiration, vos connaissances scientifiques et vos qualités humaines sont pour moi un modèle. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon plus profond respect.

À Monsieur le Professeur Cédric Le Caignec et Monsieur le Professeur Christophe Vayssiere, je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

À Monsieur le Professeur Didier Lacombe, je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail. Je tiens à vous exprimer ma sincère gratitude pour votre disponibilité et pour votre soutien tout au long de ce travail. Que ce travail soit le témoin de mon profond respect.

À Madame le Professeur Caroline Rooryck-Thambo, je te remercie d'avoir accepté de diriger ce travail. Merci infiniment pour ton écoute, ton professionnalisme, ta gentillesse, ta disponibilité et ton dynamisme. Ta bienveillance et ta disponibilité sans faille tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel ont été pour moi un grand soutien. Sois assurée de ma sincère reconnaissance, de mon plus profond respect et de mon amitié.

- Et aussi,

À l'ensemble de l'équipe du laboratoire, à l'ensemble des membres du consortium H+, et plus particulièrement au Docteur Paul Gueguen.

À Erwan Guichoux qui a beaucoup contribué à la partie technique de ce travail. Je te remercie pour ta disponibilité, ta gentillesse et ton professionnalisme.

À l'équipe hospitalière, et plus particulièrement à mes co-chefs : Mélodie, Marion, Angie et Clémence, et à Fred.

- À ma famille et mes amis :

À mes parents. Je vous remercie pour votre constant soutien tout au long de ce long parcours. Sans vous, sans vos encouragements, sans votre aide, venir à bout de ces longues études n'aurait pas été possible.

À ma sœur, merci de m'avoir toujours aidée à me détendre et d'avoir toujours été là pour moi. Merci pour tous ces moments partagés en famille avec mes nièces adorées Louison et Romy, et avec Simon.

À toute ma famille, merci pour votre soutien.

À mes très chers amis pour tous les nombreux bons moments passés ensemble ! Mélou, Vano, Angie, les gynettes (Marion B, Marion P, Julie, Anne, Camille ...) et tous les autres ! Nos liens forts, nos soirées, nos fous rires, nos voyages ont rythmé ces années et les ont rendues plus belles.

À mon baba adoré, Léon, qui me donne tant de bonheur.

À Pierre-André, mon mari, mon doudou, dont l'amour et le soutien me rendent chaque jour plus heureuse et plus forte. Je te dédie cette thèse.

À tous ceux que j'oublie forcément, mais qui comptent...

# LABORATOIRE DE RECHERCHE

**Laboratoire Maladies Rares : Génétique et Métabolisme (MRGM)**

**INSERM U1211 - Université de Bordeaux**

**CHU de Bordeaux-GH Pellegrin**

École de Sages-Femmes 2ème étage

Place Amélie Raba-Léon

33076 BORDEAUX CEDEX

FRANCE

# RÉSUMÉ

## TECHNIQUES D'EXPLORATION CHROMOSOMIQUE EN PRÉNATAL : MISES AU POINT ET APPLICATIONS

### Objectif

Le diagnostic prénatal (DPN) a pour but de détecter des pathologies fœtales *in utero*. L'objectif de ce travail était de mettre au point et d'appliquer les techniques d'exploration chromosomique en prénatal. Nous avons, tout d'abord, validé et évalué une plateforme de séquençage basée sur la technologie des semi-conducteurs, Ion Proton®, pour le dépistage prénatal non-invasif (DPNI) des principales aneuploïdies en routine clinique, puis évalué l'intérêt de l'Analyse Chromosomique sur Puces à ADN (ACPA) dans le diagnostic prénatal des retards de croissance intra-utérin (RCIU) fœtaux.

### Matériel et Méthodes

Nous avons inclus prospectivement 2505 patientes enceintes analysées par huit laboratoires hospitalo-universitaires de génétique : 695 grossesses à haut risque pour la trisomie 21 (risque  $\geq 1/250$  ou avec anomalie échographique) dans une étude de validation de la technique du test ADN libre circulant (ADNlc), et 1810 grossesses à risque, sans anomalie échographique, en routine clinique. Les issues de grossesses étaient toutes disponibles dans l'étude de validation et pour 521 grossesses dans l'étude en routine clinique. L'ADNlc extrait d'échantillons plasmatiques était séquençé, puis les données étaient analysées à l'aide du logiciel WISECONDOR. Les résultats des tests ADNlc étaient comparés aux caryotypes fœtaux ou

aux données à la naissance. Nous avons aussi évalué le taux d'échec et comparé trois méthodes d'évaluation de la fraction foétale (FF) (RASSF1A, DEFrag et SANEFALCON). Nous avons rétrospectivement inclus tous les fœtus référés pour un prélèvement invasif pour RCIU et étudié les résultats de technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), caryotypes et ACPA.

## Résultats

Les résultats des deux cohortes de l'étude sur l'ADNlc étaient cohérents et les âges gestationnels n'étaient pas significativement différents ; les données ont été combinées afin d'étoffer la cohorte à analyser. Respectivement, la sensibilité et la spécificité étaient de : 98.3% (95% IC, 93.5–99.7%) et 99.9% (95% IC, 99.4–100%) pour la trisomie 21; 96.7% (95% IC, 80.9–99.8%) et 100% (95% IC, 99.6–100%) pour la trisomie 18 ; et 94.1% (95% IC, 69.2–99.7%) et 100% (95% IC, 99.6–100%) pour la trisomie 13. Le taux de non rendus était de 1.2% initialement puis après réanalyse de 0.6%. L'estimation de la FF avec les méthodes RASSF1A et DEFrag étaient comparables, toutes deux compatibles avec une utilisation en routine clinique.

Parmi les 162 fœtus RCIU (78 associés et 84 isolés) inclus dans l'étude ACPA, 15 avaient une FISH pathologique : 10 RCIU associés et cinq RCIU isolés. Parmi 143 fœtus étudiés par ACPA, 10 (7%) présentaient un variant du nombre de copies (CNV), tous étaient des RCIUs associés (10/65 soit 15.4%; 95 IC: 8.4%-26.2%), versus 0/78 dans le groupe RCIUs isolés (95% IC: 0%-5.6%). Six fœtus (4.2%) ont présenté des variants de signification inconnue (VSI) (trois RCIU associés et trois RCIU isolés).



## **Conclusion**

Notre étude évaluant le test ADNlc utilisant la technologie des semi-conducteurs est la première étude clinique à rapporter les issues de grossesses dans une population aussi large. La plateforme est performante pour le DPNI des principales aneuploïdies. Notre protocole robuste est facilement applicable en routine clinique.

Notre étude souligne une augmentation de rendement diagnostique de l'ACPA de 6.1% (4/65) par rapport au caryotype pour le DPN des fœtus présentant un RCIU associé. Aucun CNV pathogène n'a été mis en évidence dans le groupe RCIU isolé. L'ADNlc pourrait-il supplanter l'ACPA dans cette population de RCIU isolé ?

Le développement du test ADNlc a permis de limiter le nombre de prélèvements invasifs et donc leurs complications. D'autres applications restent à développer : dépistage d'autres trisomies ou syndromes microdélétionnels.

Cependant, il faut se poser la question du phénomène « trop d'information ? » qui entraîne parfois plus de stress que d'apaisement pour les couples et toujours mettre en parallèle les avancées médicales avec les enjeux éthiques.

**Mots-clés:** diagnostic prénatal; ADN libre circulant (ADNlc); technologie des semi-conducteurs; fraction fœtale; trisomie; Analyse Chromosomique sur Puces à ADN (ACPA); retard de croissance intra-utérin (RCIU).

# ABSTRACT

## TECHNICAL DEVELOPMENT AND APPLICATIONS OF THE CHROMOSOMAL EXPLORATION TECHNIQS IN PRENATAL DIAGNOSIS

### Objective

Prenatal diagnosis allows to detect fetal pathologies *in-utero*. The goal of this work was both technical development and application of the chromosomal exploration technics in prenatal diagnosis. First, we aimed to validate and evaluate the performance metrics of the high-throughput semiconductor sequencing platform, Ion Proton®, in non-invasive prenatal genetic screening (NIPS) for common fetal aneuploidies in a clinical setting and, then to evaluate the diagnostic utility of prenatal diagnosis using the chromosomal microarray analysis (CMA) for fetuses presenting with isolated or associated intrauterine growth restriction (IUGR).

### Methods

First, regarding NIPS, a prospective cohort study including 2505 pregnant women from eight academic genetics laboratories (695 high risk pregnancies for trisomy 21 (risk  $\geq 1/250$  or with ultrasound anomalies) in a validation study, and 1810 such pregnancies, without ultrasound anomalies, in a real-life NIPS clinical setting) was conducted. An outcome was available for all cases in the validation cohort and for 521 in the clinical cohort. Cell-free DNA from plasma samples was sequenced using the Ion Proton sequencer, and sequencing data were analyzed using the open-access software, WISECONDOR. Performance metrics for detection

of trisomies 21, 18 and 13 were calculated based on either fetal karyotype result or clinical data collected at birth. We also evaluated the failure rate and compared three methods of fetal fraction quantification (RASSF1A assay, and DEFrag and SANEFALCON software).

Then, regarding the CMA study, we retrospectively included all fetuses with IUGR referred for prenatal testing and studied by rapid fluorescence in situ hybridization (FISH), karyotype, and CMA.

## **Results**

In the NIPS study, results from both cohorts were consistent and their gestational age was not significantly different, so their data were combined to increase the sample size for analysis. Sensitivities and specificities, respectively, were as follows: for trisomy 21, 98.3% (95% CI, 93.5–99.7%) and 99.9% (95% CI, 99.4–100%); for trisomy 18, 96.7% (95% CI, 80.9–99.8%) and 100% (95% CI, 99.6–100%); and for trisomy 13, 94.1% (95% CI, 69.2–99.7%) and 100% (95% CI, 99.6–100%). Our failure rate was 1.2% initially and as low as 0.6% after retesting some of the failed samples. Fetal fraction estimation by the RASSF1A assay was consistent with DEFrag results, and both were adequate for routine diagnosis.

Among the 162 IUGR fetuses (78 associated and 84 isolated IUGR) included in the CMA study, 15 had an abnormal FISH result: 10 associated and five isolated fetal IUGRs. Among the 143 fetuses studied by CMA, 10 (7%) presented pathogenic copy number variations (CNVs). All 10 were in the associated fetal IUGR group (10/65 or 15.4%; 95% confidence interval [CI]: 8.4%-26.2%) versus 0/78 in the isolated fetal IUGR group (95% CI: 0%-5.6%). Six fetuses (4.2%) carried variants of unknown significance (VOUS) (three associated and three isolated fetal IUGRs).

## **Conclusion**

We described one of the largest studies evaluating Ion Proton-based NIPS and the first clinical study reporting pregnancy outcome in a large series of patients. This platform is highly efficient in detecting the three most common trisomies. Our protocol is robust and can be implemented easily in any medical genetics' laboratory.

Our second study highlighted the added value of CMA in the case of associated fetal IUGR with an incremental yield of 6.1% (4/65) over karyotyping. No pathogenic CNVs were reported in the isolated fetal IUGR group. Could NIPS supplant CMA in isolated fetal IUGR?

The development of the NIPS test has reduced prenatal invasive testing and therefore its complications. Many more applications remain to be developed such as the screening of other trisomies and of microdeletion syndromes.

Nevertheless, we must question the “too much information phenomenon” which can lead to more anxiety than reassurance for the couples and always balance the medical advances with the ethical issues.

**Keywords:** prenatal diagnosis; non-invasive prenatal genetic screening; semiconductor sequencing; fetal fraction; trisomy; chromosomal microarray analysis; intrauterine growth restriction (IUGR).

# TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>14</b>
<b>1/ Contexte</b> .....	<b>15</b>
<b>2/ Examens génétiques</b> .....	<b>16</b>
2.1/ Techniques de cytogénétique .....	16
2.1.1/ Caryotype .....	16
2.1.2/ FISH (technique d'hybridation in situ en fluorescence) .....	18
2.2/ Techniques moléculaires .....	21
2.2.1/ Analyse Chromosomique sur Puces à ADN (ACPA) .....	21
2.2.1.1/ Principe de la CGH-array .....	21
2.2.1.2/ Limites de la CGH-array .....	23
2.2.2/ Séquençage Nouvelle Génération (NGS) .....	23
2.2.2.1/ Principe du NGS .....	24
2.2.2.2/ Limites du test ADNlc .....	27
<b>PARTIE 1 : DÉPISTAGE PRÉNATAL NON INVASIF (DPNI) OU TEST D'ADN LIBRE CIRCULANT (ADNlc)</b> .....	<b>29</b>
<b>1/ Contexte au moment de l'élaboration du projet</b> .....	<b>30</b>
1.1/ Dépistage de la trisomie 21 au moment de l'élaboration du projet .....	30
1.2/ DPNI ou test d'ADNlc .....	31
1.2.1/ État des connaissances au moment de l'élaboration du projet .....	31
1.2.2/ Objectif du projet .....	33
<b>2/ Article (23)</b> .....	<b>35</b>
<b>3/ Données non publiées : Étude de la fraction fœtale (FF) du DPNI ou test ADNlc utilisant la technologie des semi-conducteurs</b> .....	<b>36</b>

3.1/ Panel HID-Ion AmpliSeq™ Identity, technique basée sur les Single Nucleotide Polymorphisms (SNP)	36
3.2/ Les Short Tandem Repeat (STR)	39
3.3/ Estimation de la FF grâce à la proportion reads courts / reads longs	42
<b><i>PARTIE 2 : ANALYSE CHROMOSOMIQUE SUR PUCES À ADN (ACPA) DANS LE RETARD DE CROISSANCE INTRA-UTÉRIN (RCIU)</i></b>	<b>44</b>
<b>1/ Contexte</b>	<b>45</b>
1.1/ Indications de la CGH-array ou ACPA en prénatal	45
1.2/ Le retard de croissance Intra-Utérin (RCIU)	47
<b>2/ Article (33)</b>	<b>48</b>
<b><i>DISCUSSION GÉNÉRALE</i></b>	<b>49</b>
<b>1/ Test ADN libre circulant (ADNlc)</b>	<b>51</b>
1.1/ Dépistage de la trisomie 21	51
1.2/ Dépistage des aneuploïdies par le test ADNlc utilisant la technologie des semi-conducteurs	52
1.3/ Performance de la technologie des semi-conducteurs pour le test ADNlc	54
1.4/ Étude de la fraction fœtale (FF) du test ADNlc avec la technologie des semi-conducteurs	55
1.5/ Coût du test ADNlc avec la technologie des semi-conducteurs	56
1.6/ Place des tests ADNlcT21 dans le dépistage de la trisomie 21 fœtale en France en 2019	57
<b>2/ Le diagnostic prénatal invasif dans l'indication du retard de croissance intra-utérin (RCIU) isolé</b>	<b>60</b>
<b>3/ Le futur du Diagnostic Prénatal, de la médecine fœtale</b>	<b>63</b>
<b><i>CONCLUSION GÉNÉRALE</i></b>	<b>66</b>
<b><i>BIBLIOGRAPHIE</i></b>	<b>68</b>
<b><i>LISTE DES ABRÉVIATIONS</i></b>	<b>77</b>
<b><i>LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX</i></b>	<b>80</b>

# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

## **1/ Contexte**

En France, le diagnostic prénatal (DPN) est défini par l'article L2131-1 du Code de la santé publique, issu de la loi de bioéthique de juillet 2011 énonçant que « le diagnostic prénatal s'entend des pratiques médicales, y compris l'échographie obstétricale et fœtale, ayant pour but de détecter *in utero* chez l'embryon ou le fœtus une affection d'une particulière gravité» (anomalie génétique ou malformation congénitale, par exemple) (1). La loi stipule que la femme enceinte doit recevoir une information loyale, claire et adaptée à sa situation sur la possibilité de recourir, à sa demande, à des examens de biologie médicale et d'imagerie permettant d'évaluer le risque que l'embryon ou le fœtus présente une affection susceptible de modifier le déroulement ou le suivi de sa grossesse. (1)

L'Agence de la Biomédecine veille à son application afin de garantir la qualité et la sécurité des soins, via la création de centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal (CPDPN). Leur rôle est d'accompagner les couples dans leur parcours de soins en confirmant les indications, et en délivrant des avis et conseils (diagnostic, pronostic et thérapeutique) de cliniciens et de biologistes en cas de suspicion d'affection d'un embryon ou d'un fœtus.

Le but est de détecter *in utero* chez l'embryon ou le fœtus une affection grave afin de donner aux futurs parents le choix de poursuivre ou non la grossesse et de permettre une meilleure prise en charge médicale de la pathologie si la grossesse est poursuivie.



Le diagnostic prénatal est guidé par un éventail de techniques d'imagerie (échographie, Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), tomodensitométrie (TDM)), de dosages biologiques (marqueurs sériques hormonaux...), mais aussi d'examens génétiques.

En cas de signe d'appel biologique ou échographique, ou d'antécédents familiaux, le CPDPN peut proposer un DPN qui nécessite le recueil de matériel génétique d'origine fœtale, par prélèvement de villosités choriales ou amniocentèse le plus souvent et, dans de rares cas, par ponction de sang fœtal. Ces méthodes classiques, dites invasives, sont consommatrices de temps et d'argent, génératrices d'angoisse pour le couple, et associées à un risque non négligeable de complications materno-fœtales telles que la fausse couche, l'accouchement prématuré ou l'infection materno-fœtale.

## **2/ Examens génétiques**

Les examens génétiques incluent les techniques de cytogénétique conventionnelle et moléculaire (caryotype, hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), prénatal BOBS), et les techniques moléculaires (Comparative Genomic Hybridization - array (CGH-array), séquençage Sanger, Séquençage Haut Débit ou Séquençage Nouvelle Génération (NGS)).

### **2.1/ Techniques de cytogénétique**

#### **2.1.1/ Caryotype**

Le caryotype détecte les anomalies de nombre et de structure des chromosomes.

Le caryotype standard (*Figure 1*) est réalisé en bandes R ou en bandes G, sur des préparations métaphasiques, avec une résolution moyenne de 400 bandes. Il ne peut pas détecter des anomalies inférieures à 5 voire 10 mégabases (Mb), selon les bandes.

Un caryotype dit de « haute résolution » doit avoir une résolution d'au moins 550 bandes par lot haploïde de chromosomes. L'étude des cellules en prométaphase (fin de prophase ou début de métaphase) par synchronisation des cultures, et le prétraitement de la culture lymphocytaire par du 5 bromodésoxyuridine, modifient les propriétés tinctoriales des bandes chromosomiques et permettent d'améliorer la résolution du caryotype. Nous pouvons ainsi observer jusqu'à 700 à 1000 bandes par lot haploïde de chromosomes. Il ne peut cependant pas détecter les réarrangements en dessous de 3 à 5 Mb selon les régions chromosomiques concernées.



*Figure 1:* Image de caryotype

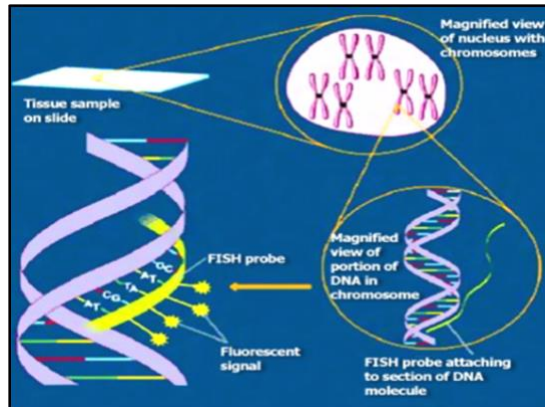
### **2.1.2/ FISH (technique d'hybridation in situ en fluorescence)**

La technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) (*Figure 2*), basée sur la propriété de réassociation spécifique des acides nucléiques, a pris son essor dans les années 90 avec l'utilisation de sondes fluorescentes, spécifiques de loci chromosomiques donnés. De très nombreuses sondes clonées issues de l'ensemble du génome sont disponibles, elles sont de type BACs (Chromosome artificiel de bactérie), PACs (Plasmides), ou cosmides. Ces sondes sont marquées puis hybridées sur des préparations métaphasiques ou sur noyaux interphasiques à la recherche d'anomalie de dosage génique dans différentes régions (centromères, télomères, régions spécifiques, chromosome entiers). Cette technique est largement utilisée de nos jours en diagnostic, notamment pour la recherche de syndromes microdélétionnels suspectés selon le phénotype du patient (syndrome de Di-George, syndrome de Williams, syndrome de Smith-Magenis...), dont la taille varie de 1 à 5Mb environ, mais aussi pour la confirmation et l'étude complémentaire des remaniements génomiques identifiés en CGH-array (étude chez le patient et ses parents). L'étude parentale en FISH permettra de ne pas méconnaître un remaniement équilibré à type de translocation, inversion ou insertion qui donnerait un plus grand risque de récurrence dans la descendance ou chez les apparentés. De plus, dans le cas des duplications, la FISH fournit une information supplémentaire par rapport aux autres techniques de dosage génique : en effet, toute duplication peut survenir sur le site de la région dupliquée (duplication eutopique, pouvant dans ce cas entraîner une interruption ou une dysrégulation du ou des gènes de la région), ou à distance de cette région (duplication ectopique dont la pathogénicité est plus difficile à mettre en évidence, pouvant être liée à un effet dose de la production d'Acide Ribonucléique (ARN) ou de protéine ou à la dysrégulation d'un gène à proximité de son insertion).

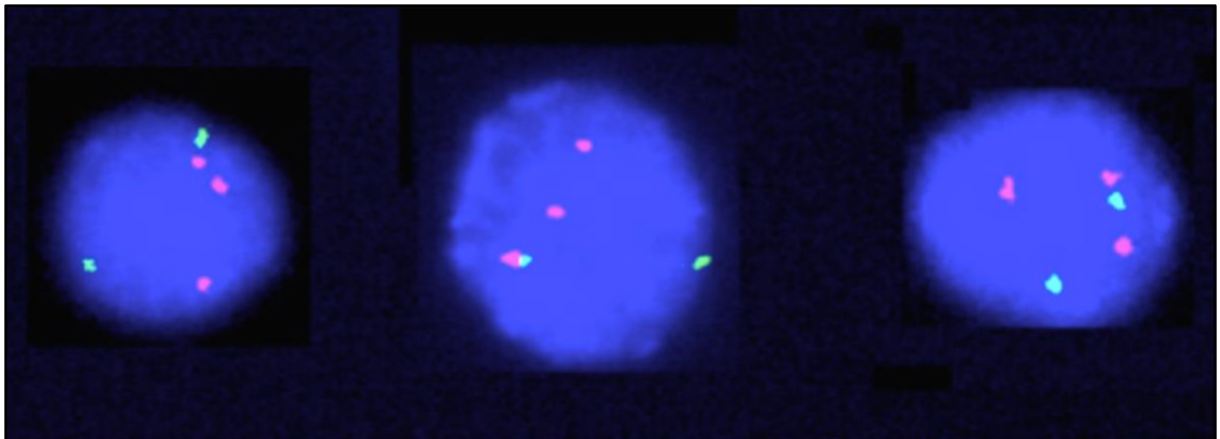
Les limites de cette technique de FISH résident en :

- sa résolution : les sondes couramment employées sont les BACs d'une longueur variant de 100 à 200 Kilobases (Kb),
  - la disponibilité des sondes : il n'existe pas forcément de sondes fiables pour une région donnée, d'autant plus si elle est limitée à une centaine de Kb.
  - le type de prélèvement : la FISH s'effectue le plus souvent sur des préparations métaphasiques, qui nécessitent donc un prélèvement sanguin rapidement mis en culture.
- Lorsqu'une anomalie est mise en évidence en CGH-array chez un patient, il faudra donc reconvoquer le patient et ses parents pour prélèvement sur tube hépariné en vue d'une mise en culture immédiate.

D'autres techniques dérivées de la FISH comme le « spectral karyotyping » (SKY), la m-FISH (FISH multicolore) et la CGH-array, sont des techniques d'analyse pangénomiques qui se sont révélées très utiles dans l'identification de matériel chromosomique d'origine inconnue (marqueur chromosomique ou remaniement chromosomique complexe), mais aujourd'hui la CGH-array supplante les autres techniques.



*Figure 2A*



*Figure 2B*

*Figure 2 :* FISH (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence)

*Figure 2A :* principe de la technique de la FISH

*Figure 2B :* Image de FISH interphasique montrant une trisomie 21

En rouge les sondes spécifiques du 21, en vert les sondes spécifiques du 13

Nous observons ici donc trois spots correspondant aux chromosomes 21.

## **2.2/ Techniques moléculaires**

### **2.2.1/ Analyse Chromosomique sur Puces à ADN (ACPA)**

L'Analyse Chromosomique sur Puces à ADN (ACPA), incluant les technologies de CGH-array (Comparative Genomic Hybridization - array) et SNP-array (Single Nucleotide Polymorphism - array) s'est développée dans les laboratoires diagnostiques hospitaliers depuis 2008 en France, tous d'abord dans des indications postnatales, puis quelques années après, en diagnostic prénatal. Elle offre un rendement diagnostique bien supérieur à celui du caryotype, mais l'interprétation des variants du nombre de copies (CNV) est parfois délicate.

#### **2.2.1.1/ Principe de la CGH-array**

La technique d'hybridation sur puces à Acide DésoxyriboNucléique (ADN) ou CGH-array (*Figure 3*) est dérivée de la technique de CGH dont la résolution, équivalente à celle du caryotype standard (5 à 10 Mb), se révélait insuffisante. Les préparations métaphasiques sont remplacées par des cibles d'ADN déposées sur lame de verre. Ces cibles peuvent être soit des clones génomiques de grande taille (BACs, PACs, cosmides), soit des produits de Polymerase Chain Reaction (PCR) (exons de gènes par exemple), soit des oligonucléotides dérivés de la séquence de chaque région, soit des clones d'ADNc (ou des ESTs). Maintenant seules les puces à oligonucléotides sont utilisées, avec une densité pouvant aller jusqu'à 1 million de sondes par réseau.

L'ADN des patients est fragmenté par digestion enzymatique, marqué par un fluorochrome, mélangé avec un ADN de référence marqué par un autre fluorochrome, puis le mélange est

hybridé sur cette lame. L'analyse se fait par mesure de l'intensité de fluorescence, pour chacun des fragments d'ADN déposés sur la lame, par un lecteur de fluorescence (scanner). Les deux fluorochromes utilisés sont la Cyanine 3 (pic d'excitation : 554 nm, pic d'émission : 568 nm) et la Cyanine 5 (Pic d'excitation : 650 nm, pic d'émission : 672 nm). Pour analyser les résultats, nous calculons le ratio des intensités de fluorescence Cyanine 5 / Cyanine 3. Nous utilisons ensuite le log2 du rapport d'intensité de fluorescence.

Le contrôle final des données d'hybridation s'effectue à l'aide du QC report du logiciel Feature Extraction (Agilent Technologies), notamment avec les valeurs de DLRS (Derivative Log Ratio Spread), les valeurs d'intensités de fluorescence et de bruit de fond pour chaque cyanine, puis avec le logiciel Cytogenomics (Agilent Technologies) pour la visualisation des ratios en log2 de chaque point.

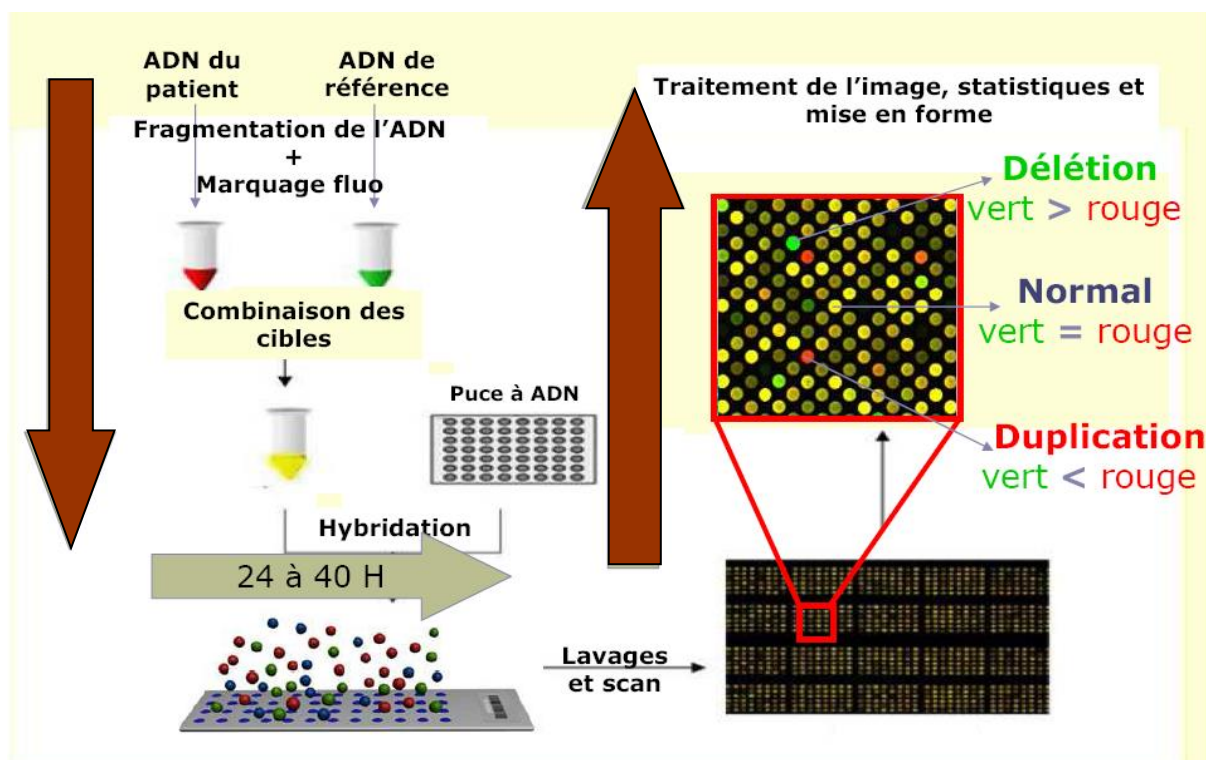


Figure 3 : Schéma d'une expérience d'hybridation génomique comparative sur puce à ADN.

### ***2.2.1.2/ Limites de la CGH-array***

La CGH-array ne détecte pas : les anomalies chromosomiques équilibrées (translocations), les mosaïques < 20% et les variants nucléotidiques dans les gènes. De plus, la CGH-array permet la mise en évidence de nouveaux variants du nombre de copies CNV tels que les Copy Number Polymorphisms (CNP) ainsi que la découverte fortuite de variants à pénétrance incomplète / expressivité variable. L'interprétation peut parfois être délicate et par là même le rendu de résultats.

Selon les données du réseau AChro-Puce en 2017, le rendement diagnostique de la CGH-array en prénatal était de 7% (2).

### **2.2.2/ Séquençage Nouvelle Génération (NGS)**

La technologie du NGS offre une révolution dans le domaine de la médecine fœtale puisqu'elle permet non seulement, lors d'un prélèvement invasif, d'explorer un nombre plus important de gènes, en un temps plus court, mais aussi d'explorer le génome fœtal dans le plasma maternel, sans réaliser de prélèvement fœtal invasif par ponction de liquide amniotique ou biopsie de villosités chorales. Ce dépistage prénatal non invasif (DPNI) ou désormais ADNlc (Acide DésoxyriboNucléique libre circulant) est maintenant utilisé d'une part pour dépister les principales aneuploïdies (trisomies 21, 13, 18), et pourra être utilisé d'autre part pour détecter les mutations dans les gènes impliqués dans des maladies rares. Le DPNI représentait cependant un vrai défi de par sa mise au point technique et de par le traitement bioinformatique et l'interprétation statistique des données de séquençage.



### ***2.2.2.1/ Principe du NGS***

Le séquençage de nouvelle génération (NGS : Next Generation Sequencing) représente une révolution biotechnologique majeure de ces dernières années, en permettant de séquencer de grandes quantités d'ADN en des temps réduits. Les séquenceurs de premières générations de type Sanger sont capables de lire des fragments d'environ 800 bases en une heure sur un capillaire tandis que les séquenceurs NGS de deuxième génération sont capables de lire des fragments de 150 à 300 paires de bases mais jusqu'à 20 milliards de fragments à la fois. Il existe également des séquenceurs de troisième génération, qui ne sont pas encore utilisés en pratique diagnostique à ce jour.

Le séquençage NGS est composé de trois étapes :

- **Étape 1 : Librairie de séquençage**

Une librairie, est l'ensemble des fragments d'ADN à séquencer. Pour créer une librairie, deux méthodes sont à retenir si nous voulons séquencer l'ensemble du génome ou des régions d'intérêt.

- Méthode globale (séquençage de l'ensemble du génome)

La méthode shotgun consiste en une fragmentation aléatoire de l'ADN, soit par sonication (en envoyant des ultra-sons à la bonne fréquence, l'ADN est cassé en morceaux de tailles précises), soit par fragmentation enzymatique (l'utilisation d'enzymes de restriction permet de couper l'ADN au niveau de certains motifs).

- Méthode ciblée (séquençage de régions d'intérêts)

Il faut enrichir la librairie en sélectionnant uniquement les fragments d'ADN désirés. Deux techniques sont à retenir. D'une part, il y a l'enrichissement par capture : après fragmentation,

les fragments d'ADN sont filtrés en s'hybridant à des séquences complémentaires disposées sur une plaque ou en milieu liquide. Les fragments d'ADN qui ne s'hybrident pas sont éliminés. D'autre part, il y a l'enrichissement par PCR : les fragments désirés sont amplifiés par PCR. Nous pouvons amplifier une seule région avec un couple d'amorces (simplex), ou alors amplifier plusieurs régions avec plusieurs couples d'amorces (multiplex). Dans cette stratégie, toutes les séquences d'un même amplicon seront identiques.

- **Étape 2 : Séquençage**

Il existe différentes méthodes de séquençage :

- Le séquençage par synthèse (Illumina).
- Le pyroséquençage (Roche 454).
- La ligation (SOLid Thermofisher).
- La détection des ions H<sup>+</sup> (Proton Thermofisher).

Dans l'ensemble, le principe général reste le même. Chaque fragment est d'abord cloné plusieurs fois afin d'amplifier le signal. Puis le brin complémentaire de chaque fragment cloné est synthétisé. À chaque incorporation d'un nucléotide, un signal est détecté (de la fluorescence pour Illumina ou une variation de pH sur du Proton). À la fin du séquençage, chaque fragment a été séquençé en parallèle. L'ensemble des données est enregistré dans un fichier Fastq.

- **Étape 3 : Analyse des données de séquençage**

À la fin du séquençage, la chimie fait place à la bioinformatique. Les séquences des fragments, qu'on appelle maintenant des "reads", sont sauvegardées dans un fichier Fastq contenant les séquences et leurs scores de qualité (score Phred). Ce score évalue la confiance du séquençage. Ce que nous avons alors, ce sont uniquement des courtes séquences de 150

paires de bases en général. Lorsque l'on veut obtenir la séquence complète d'un gène ou d'un génome entier, il faut reconstruire un puzzle en réalisant un alignement. Deux méthodes existent :

- Assemblage de novo : Il s'agit de résoudre un puzzle sans son modèle. Les fragments d'ADN qui sont chevauchants permettent petit à petit de reconstruire ce qu'on appelle un contig. L'assemblage des contigs entre eux permet d'obtenir un « scaffold ». Cette technique est très coûteuse en termes de calcul. Des algorithmes bioinformatiques comme les graphes de Bruijn, permettent de résoudre ce problème. Cette méthode est principalement employée pour reconstruire des génomes non connus.

- Alignement avec référence : Il s'agit toujours de résoudre un puzzle, mais cette fois, en s'aidant d'un modèle comme par exemple, une version du génome humain (hg19). Chaque read est aligné sur cette référence. La complexité de calcul est plus simple qu'avec l'alignement de novo. En général l'algorithme de Burrows Wheeler permettant de rechercher de manière efficace une correspondance entre les reads et la référence est utilisé. Après cet alignement, un fichier BAM associant à chaque read ses coordonnées génomiques est obtenu : c'est à dire le chromosome et la position. La profondeur est le nombre moyen de reads qui se superpose. Le recouvrement est l'étalement des reads sur la zone d'intérêt.

Dans le cas de la recherche de trisomies par l'ADNlc, le séquençage se fait sur l'ensemble du génome mais avec des profondeurs très faibles (inférieur à un read par région), et l'analyse est quantitative avec une comparaison du nombre de reads séquencés entre les différents chromosomes, permettant par une analyse statistique d'établir un Z score pouvant dépister l'excès d'un chromosome ou l'autre.

Les capacités d'un séquenceur sont définies par la longueur des reads produits (L), le nombre de reads produits (n), le nombre de nucléotides : (L x n), le temps de séquençage et la qualité du séquençage

### *2.2.2.2/ Limites du test ADNlc*

Le résultat si positif doit être systématiquement confirmé par un DPN invasif. Il ne s'agit pas en effet d'un caryotype complet. Le test ADNlc n'est pas indiqué en cas d'anomalies échographiques fœtales à ce jour en France.

De plus, 0,5 à 1 % de tests sont non concluants : soit en raison d'un échec de la technique NGS, soit en raison d'une quantité d'ADN fœtal circulant insuffisante (<4% de l'ADN total).

Il peut y avoir des faux positifs :

- en cas de jumeau évanescent porteur d'une trisomie et de test réalisé trop proche de la date de l'arrêt de la fonction cardiaque du jumeau en question
- en cas de discordance fœto-placentaire (mosaïque confinée au placenta)
- en cas de mosaïque maternelle
- en cas de néoplasie maternelle (ADN tumoral libre circulant).

Il peut y avoir des faux négatifs :

- en cas de triploïdie 69 XXX fœtale
- en cas de mosaïques très faibles ou anomalies chromosomiques de structure.

Ces nouvelles techniques offrent des possibilités diagnostiques de plus en plus riches mais il convient de les évaluer et de les comparer les unes aux autres, notamment avec des critères objectifs de sensibilité et spécificité. Cette démarche devrait permettre une optimisation de leur utilisation sur le plan du temps technique, du service rendu et du coût de l'examen. Nous avons utilisé le centre de médecine fœtale du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux pour réaliser les évaluations de ces différentes techniques d'investigation génétiques et permettre leur optimisation.

**PARTIE 1 : DÉPISTAGE  
PRÉNATAL NON INVASIF  
(DPNI) OU TEST D'ADN  
LIBRE CIRCULANT (ADNIc)**

# **PARTIE 1 : DÉPISTAGE PRÉNATAL NON INVASIF (DPNI) OU TEST D'ADN LIBRE CIRCULANT (ADNlc)**

## **1/ Contexte au moment de l'élaboration du projet**

Nous avons commencé ce travail en 2014.

### **1.1/ Dépistage de la trisomie 21 au moment de l'élaboration du projet**

En France, l'Arrêté du 23 juin 2009 (3) avait fixé les règles de bonnes pratiques en matière de dépistage et de diagnostic prénatal de la trisomie 21 (T21), et le dépistage combiné du premier trimestre (âge maternel, mesure échographique de la clarté nucale fœtale et dosage des marqueurs sériques maternels du premier trimestre (Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) et hormone chorionique gonadotrope  $\beta$  (hCG  $\beta$ )) était devenu alors la norme en France. Si le risque combiné était supérieur à 1/250 alors la patiente était considérée comme étant dans le groupe à risque de présenter un fœtus trisomique 21, et un prélèvement invasif pouvait alors être proposé. De larges études prospectives avaient montré que pour un taux de faux positifs de 5 %, environ 90 % des fœtus trisomiques 21 pouvaient être dépistés (4) (5).

De nombreuses équipes avaient cherché à améliorer la sensibilité et la spécificité du dépistage de la trisomie 21 au premier trimestre afin de diminuer le risque de fausse couche spontanée en diminuant le nombre de prélèvements invasifs inutiles et par là même proposer un meilleur

dépistage de la population à risque. Une nouvelle technique de dépistage de la trisomie 21 avait d'ailleurs été mise au point, il s'agit du Dépistage Prénatal Non Invasif (DPNI) ou désormais nommé test d'acide désoxyribonucléique libre circulant pour la trisomie 21 (ADNlcT21).

## **1.2/ DPNI ou test d'ADNlc**

### **1.2.1/ État des connaissances au moment de l'élaboration du projet**

Depuis la découverte de l'acide désoxyribonucléique (ADN) fœtal libre non cellulaire dans le plasma maternel en 1997 (6), de nombreuses techniques se sont développées afin d'isoler et d'étudier cet ADN. L'ADN fœtal non cellulaire provient des cellules trophoblastiques, il est présent dès quatre semaines de gestation et a une demi-vie très courte (16 min) dans la circulation sanguine. Il devient indétectable dans les deux heures après l'accouchement, le rendant ainsi spécifique de la grossesse en cours (7). Le défi technique vient du fait que cet ADN fœtal ne constitue que 6 à 10% de l'ADN non cellulaire plasmatique total au cours des premier et deuxième trimestres de la grossesse, pour atteindre jusqu'à 10-20% au troisième trimestre (8) (9). Le pourcentage d'ADN fœtal varie en fonction du poids de la patiente, de son ethnie, de son statut tabagique, et de son terme de grossesse (10). De plus, il est important de noter que cette fraction d'ADN fœtal non cellulaire semble être modifiée par le prélèvement fœtal par amniocentèse ou choriocentèse, si le geste invasif est réalisé avant la ponction veineuse (11). Une étude plus récente réalisée sur un petit échantillon de 33 femmes ne montrait cependant pas de différence avant ou après amniocentèse (12).



Plusieurs méthodes avaient été utilisées pour la détection d'aneuploïdies fœtales dans le plasma maternel, incluant en premier lieu les méthodes basées sur le ratio allélique, effectuées sur l'ARN fœtal (étude d'un SNP de PLAC4 rs8130833 par Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) puis spectrométrie de masse) (13). Puis la PCR digitale avait également été utilisée pour étudier ce même SNP (14). Ces méthodes étaient limitées aux fœtus hétérozygotes pour ce SNP (42% de fœtus homozygotes). Une troisième approche basée sur le ratio allélique épigénétique permettait l'étude des profils de méthylation différents entre le fœtus et sa mère, en utilisant des amorces spécifiques de méthylation (exemple du promoteur du gène SERPINB5 non méthylé dans le placenta et hyperméthylé dans les cellules sanguines maternelles). La sensibilité de ce test était de 100% mais son taux de faux positifs était de 9,7%, probablement du fait de la dégradation de l'ADN par la bisulfitation (15).

Puis les approches basées sur le dosage chromosomique relatif avait utilisé des techniques de dosage chromosomique épigénétique, des méthodes de PCR digitale et surtout des techniques de séquençage haut débit (Séquençage Massif en Parallèle, MPS ou MPSS Shotgun), pour revue (16). La preuve de concept pour l'application du MPS avait été décrite par deux équipes en 2008 (17) (18). Ces dernières techniques étaient, alors, les plus décrites sans doute du fait de la présence des plateformes de NGS déjà opérationnelles pour le génotypage en diagnostic postnatal. Ces approches permettaient d'évaluer la sous- ou surreprésentation de chaque région chromosomique séquencée dans le plasma maternel.

Puis des approches de séquençage massif en parallèle (MPS) ciblé sur quelques chromosomes, étaient apparues permettant ainsi de réduire la quantité de séquences générées, de diminuer les coûts, et d'augmenter le nombre de patients analysés par run. Une de ces

approches était l'analyse digitale de régions sélectionnées (Digital Analysis of Selected Regions, DANSR), qui permettait la quantification simultanée de 576 loci non polymorphiques sur les chromosomes d'intérêt (19). Une autre technique était basée sur le génotypage de 11 000 SNP sur les chromosomes d'intérêt par PCR multiplexe chez les parents du fœtus et la comparaison de la répartition des allèles dans le plasma maternel (20).

Concernant l'utilisation de la méthode des semi-conducteurs (Ion Torrent, Life Technologies), une seule publication à notre connaissance faisait état de l'étude de 13 prélèvements plasmatiques avec une puce 318 séquencée sur séquenceur moyen débit PGM (Personal genome Machine) (21). Le séquençage basé sur la technologie des semi-conducteurs détecte des différences de pH dues à la libération d'ions H<sup>+</sup> après l'incorporation de nucléotide par une ADN polymérase. Les autres plateformes de NGS utilisent des mesures de fluorescence et un système d'imagerie nécessitant des runs plus longs. L'étude de Yuan *et al* (21) avait fait l'objet de critiques quant au terme avancé des grossesses étudiées (de 13+6 à 29 SA), rendant plus facile la détection de l'ADN fœtal présent en plus grande quantité, et quant à la faible capacité du PGM, qui, générant environ 6 000 000 de reads par run, ne permettait de passer qu'un seul échantillon par puce. Cette dernière contrainte augmenterait l'effet d'imprécision inter-runs. Les auteurs admettaient que l'article de Yuan *et al* (21) représentait une véritable première étape vers le dépistage des trisomies en utilisant la technologie des semi-conducteurs et proposaient l'utilisation future du PROTON afin d'augmenter les capacités de séquençage (22).

### **1.2.2/ Objectif du projet**

L'objectif principal de ce projet était le dépistage prénatal non invasif (DPNI) d'aneuploïdies de type trisomies 21, 18, 13 du fœtus à partir du plasma maternel par séquençage haut débit

ciblé utilisant la technologie des semi-conducteurs (technologie Ion Torrent), d'en évaluer la faisabilité ainsi que ses performances diagnostiques. Cette technologie présentait des avantages quant à sa plus grande flexibilité et la rapidité de séquençage, en comparaison avec les autres plateformes de séquençage haut débit. L'autre particularité de cette étude était qu'elle porterait sur des prélèvements précoces, effectués entre 12 et 13 SA, au moment du prélèvement fœtal invasif par biopsie du trophoblaste.

Le développement de cette analyse par les centres académiques (en particulier les centres hospitaliers universitaires) devait permettre de développer une technique novatrice accessible à toutes les patientes d'acquérir un savoir-faire, des bonnes pratiques, et de standardiser la technique afin de réduire les coûts. En effet, en 2014, au début de ce travail, le DPNI ou test ADNlc n'était réalisé que par quelques laboratoires privés dans le monde, selon des techniques et algorithmes le plus souvent confidentiels, non accessibles à la communauté médicale et scientifique. De plus, ces dépistages coûteux étaient à la charge des patientes. La mise en place de cette technique devait également permettre de diminuer le nombre d'indications de prélèvements invasifs par biopsie de villosités choriales.

La mise au point par des centres académiques de ces techniques de séquençage haut débit déjà utilisées et incontournables en diagnostic postnatal était donc un enjeu considérable, tant sur le plan économique (réduction des coûts) que sur le plan scientifique et humain. Elles constituent une révolution incontournable pour la prise en charge des patientes en anténatal en France et dans le monde. Nous avons donc participé à une étude pilote prospective multicentrique française (7 centres dont le CHU de Bordeaux), le consortium H+, afin d'évaluer les performances de cette plateforme de séquençage par la technologie des semi-

conducteurs dans le dépistage prénatal non invasif des principales aneuploïdies (T21, trisomie 18 (T18) et trisomie 13 (T13)).

## **2/ Article (23)**





















**Table S1** Details of anomalies other than trisomies 21, 18 and 13 that were detected

Detection or confirmation by invasive testing or postpartum placental testing	Detection by NIPS
<b>Other trisomies</b>	
<i>Validation study</i>	
Trisomy 9	Yes
Trisomy 10	Yes
Trisomy 22	Suspected
<i>Clinical study</i>	
Trisomy 8	Yes
Trisomy 16	Yes
<b>Subchromosomal loss/gain of material</b>	
<i>Validation study</i>	
46,XX,del(18)(p11p11.3)	Yes
46,XX,del(11)(p14.3p12)	No
46,XY,der(7)t(1;7)(q4?1;q3?2)	Yes
46,XY,add(22)(q11.3)	Yes
47,XY,+i(8)(p10)	Yes
46,XY,del(22)(q11.2)	No
46,XX,del(4)(q32)	Yes
47,XX,+mar(14)(q11;q13)	No
arr[hg19] 1q44(244,949,906-246,805,417)x1	No
<i>Clinical study</i>	
46,XX,del(18)(p11p11.3)	Yes
<b>Gonosome related anomalies</b>	
<i>Validation study</i>	
45,X (n=9)	No
47,XXY (n=1)	No
47,XYY (n=1)	No
arr[hg19] Xq27.3q28(146,460,640-152,371,434)x3	No
<b>Balanced chromosomal rearrangement</b>	
<i>Validation study</i>	
46,XX,inv(5)(p14q12)pat	No
46,XX,t(5;11)(p15;q21)pat	No
46,XX,inv(2)(p112q13)pat	No
46,XX[30%]/46,XX,t(4;20)[70%]	No
<b>Polyplody</b>	
<i>Validation study</i>	
69,XXX (n=1)	No

**Table S2** Summarized performance metrics from published and current studies using SCSP-Proton®

	Yuan et al, 2013	Liao et al, 2014		Jeon et al, 2015	Kim et al, 2016	Crea et al, 2017	Dheedene et al, 2016*		Johansen et al, 2016*	Xi et al, 2017*	Current study	
SCSP	PGM - Shotgun	Proton - Shotgun		Proton - Shotgun	PGM and Proton - Shotgun	Proton - Shotgun approach	Proton - Shotgun		Proton - Shotgun	Proton - targeted approach	Proton - WGS	
Type of study	Feasibility study	Retrospective study	Clinical study	Retrospective study	Retrospective study	Retrospective study	Retrospective study	Clinical study	Retrospective study	Feasibility study	Validation study	Clinical Study
Bioinformatic analysis pipeline	Custom	Custom		Custom	Custom	Proprietary rights	WISECONDOR and QNaseq		WISECONDOR	Custom	WISECONDOR	
Fetal fraction quantification	None	None		None	None	Proprietary rights	FF-Y, SeqFF and read length		SeqFF	SNP ratios	RASSF1A, DEFRAG, SANEFALCON	
n samples	13	515	1760	155	101	112	275	1081	184	235	695	1810
<b>Trisomy 21</b>	n = 6	n = 55	n = 9	n = 11	n = 5	n = 16	n = 52	n = 14	n = 28	n = 30	n = 119	
<b>Sensitivity (95%CI)</b>	100%	99.94%				100% (79.4 – 100%)	98.1% (88.4 - 99.9%)		96.3% (79.1 - 99.8%)	100% (85.9 - 100%)	98.3% (95%CI: 93.5 - 99.7)	
<b>Specificity (95%CI)</b>	100%	99.46%				100% (96.2 – 100%)	100% (97.9 - 100%)		99.3% (95.7 - 100%)	97.1% (93.4 - 98.8%)	99.9% (95%CI: 99.4 - 100)	
<b>PPV (95%CI)</b>			cannot be estimated because of missing follow-up data	100% (71.5%–100%)	100% (47.8–100 %)		100.0% (91.3%–100.0%)	cannot be estimated because of missing follow-up data	96.3% (79.1 - 99.8%)	83.3% (66.5 - 93%)	99.2% (95%CI: 94.7 - 100)	
<b>NPV (95%CI)</b>				100% (97.5%–100%)	100% (96.2–100%)		99.6% (97.2%–100.0%)		99.3% (95.7 - 100%)	100% (97.6 - 100%)	99.8% (95%CI: 99.3 - 100)	
<b>FPR (95%CI)</b>	0%						0% (0 - 8.7%)		3.7% (0.2 - 20.9%)	16.7% (7 - 33.5%)	0.85% (95%CI: 0.04 - 5.3)	
<b>FNR (95%CI)</b>	0%						0.4% (0.02 - 2.8%)		0.7% (0.04 - 4.3%)	0% (0 - 2.4%)	0.18% (95%CI: 0.03 - 0.74)	
<b>Trisomy 18</b>	n = 2	n = 16	n = 3	n = 5		n = 4	n = 17	n = 1	n = 6	n = 3	n = 30	
<b>Sensitivity (95%CI)</b>	100%	100%				100% (39.8 – 100%)	94.1% (69.2 - 99.7%)		100% (51.7 - 100%)	66.7% (12.5 - 98.2%)	96.7% (95%CI: 80.9 - 99.8)	
<b>Specificity (95%CI)</b>	100%	99.24%				100% (96.6 – 100%)	100% (98.2 - 100%)		100% (97.2 - 100%)	99.6% (97.2 - 100%)	100% (95%CI: 99.6 - 100)	
<b>PPV (95%CI)</b>			cannot be estimated because of missing follow-up data	100% (47.8%–100%)			100.0% (75.9%–100.0%)	cannot be estimated because of missing follow-up data	100% (51.7 - 100%)	66.7% (12.5 - 98.2%)	100% (95%CI: 85.4 - 100)	
<b>NPV (95%CI)</b>				100% (97.6%–100%)			99.6% (97.5%–100.0%)		100% (97.2 - 100%)	99.6% (97.2 - 100%)	99.9% (95%CI: 99.3 - 100)	
<b>FPR (95%CI)</b>	0%						0% (0 - 24.1%)		0% (0 - 48.3%)	33.3% (1.8 - 87.5%)	0% (95%CI: 0 - 14.6)	
<b>FNR (95%CI)</b>	0%						0.4% (0.02 - 2.5%)		0% (0 - 2.8%)	0.4% (0.02 - 2.8%)	0.09% (95%CI: 0 - 0.55)	
<b>Trisomy 13</b>	n = 1	n = 3	n = 3			n = 1	n = 5		n = 3		n = 18	
<b>Sensitivity (95%CI)</b>	100%	100%				100% (2.5 – 100%)	100% (46.3 - 100%)		100% (31 - 100%)		94.1% (95%CI: 69.2 - 99.7)	
<b>Specificity (95%CI)</b>	100%	100%				100% (96.7 – 100%)	100% (98.3 - 100%)		100% (97.2 - 100%)		100% (95%CI: 99.6 - 100)	
<b>PPV (95%CI)</b>			cannot be estimated because of missing follow-up data				100% (46.3 - 100%)		100% (31 - 100%)		100% (95%CI: 75.9 - 100)	

<b>NPV (95%CI)</b>					100% (98.3 - 100%)	100% (97.2 - 100%)	99.9% (95%CI: 99.5 - 100)			
<b>FPR (95%CI)</b>	0%				0%(0 - 53.7%)	0% (0 - 69%)	0% (95%CI: 0 - 24.1)			
<b>FNR (95%CI)</b>	0%				0% ( 0 - 1.7%)	0% (0 - 2.8%)	0.08% (95%CI: 0 - 0.54)			
<b>Failure rate</b>	Not reported	Not reported	Not reported	Not reported	0.57% (1 low FF, 1 low number of reads)	1.8% for low FF**	6% (low FF)	Expected to be high (30.63%) as discussed by authors	0.7%	1.2%/0.6%***

\* Performance metrics have been calculated using data provided in each published study.

\*\* Some of the failed samples have been retested but their number was not reported in the study.

\*\*\* The initial failure rate was 1.2%. Some samples have been retested when possible, giving a final failure rate of 0.6%.



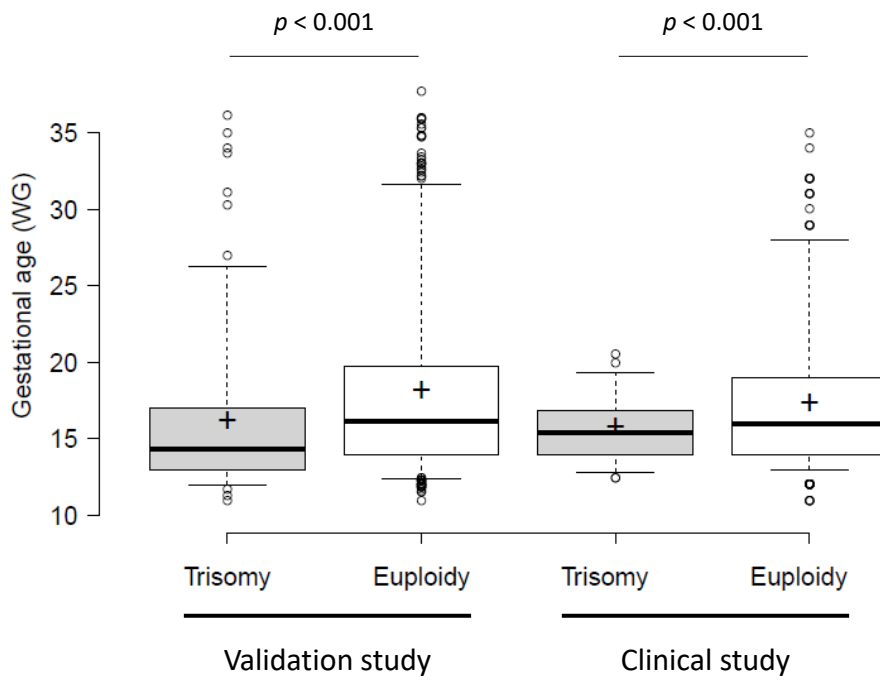


Figure S1: Box and whiskers plot of gestational age distribution in trisomy and euploidy groups, in validation and clinical studies, for cases with known outcome and known gestational age

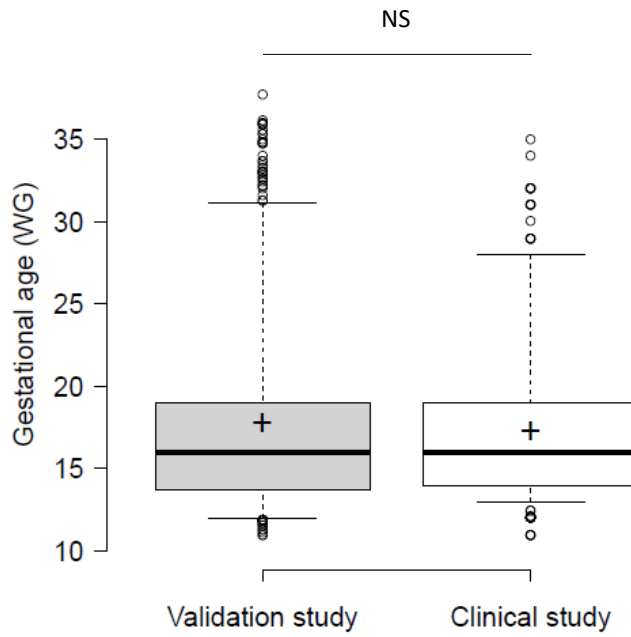
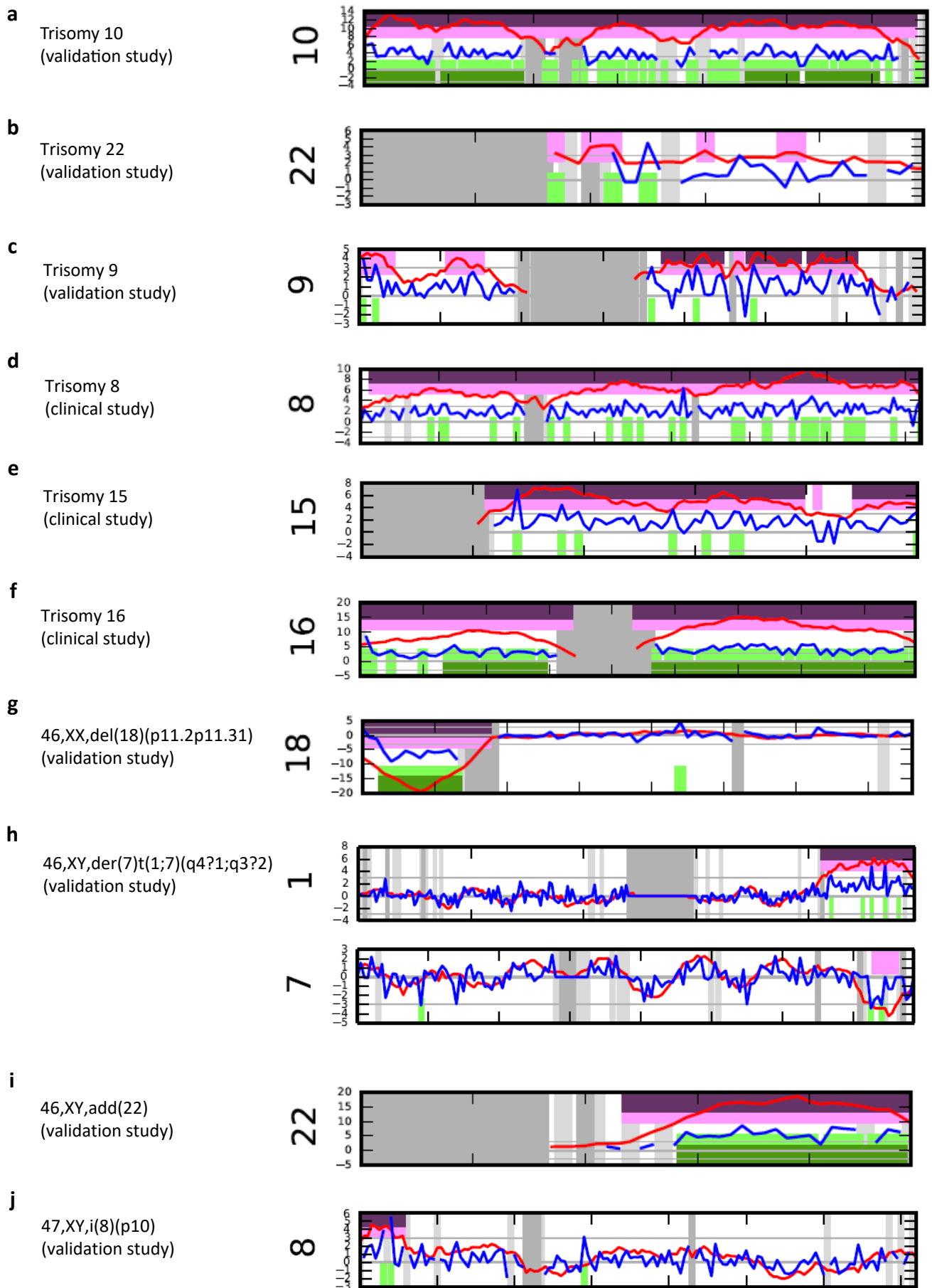
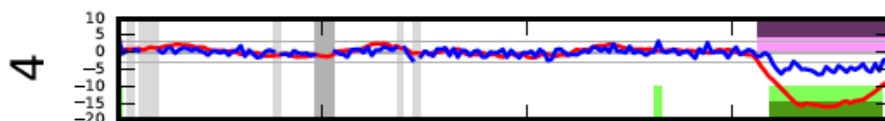
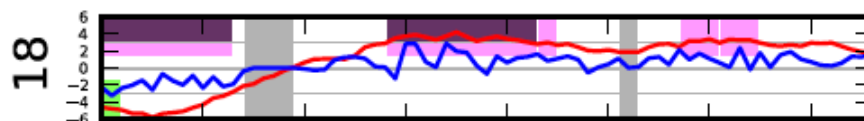


Figure S2: Box and whiskers plot of gestational age distribution in validation and clinical studies, for cases with known outcome and known gestational age



— Z-score windowed method    
  Detected deviation by individual bin method    
  Detected deviation by windowed method    
  Not enough reference bins available  
— Z-score individual bin method    
  Called by individual bin method    
  Called by windowed method    
  Unmappable region

**k**46,XX,del(4)(q32)  
(validation study)**l**46,XX,del(18)(p11)  
(clinical study)

— Z-score windowed method      Detected deviation by individual bin method      Detected deviation by windowed method      Not enough reference bins available  
— Z-score individual bin method      Called by individual bin method      Called by windowed method      Unmappable region

**Figure S3** Extracts from WISECONDOR z-score plots of chromosomal anomalies other than trisomies 21, 18 and 13. Results are shown for less common trisomies (a–e) and subchromosomal anomalies (f–l). *y*-axis displays z-score (the scale is fitted to the range of variation along the chromosome) whereas *x*-axis shows chromosomal position. Please refer to original WISECONDOR article for more details on calculation methods and the calling of chromosomal anomalies<sup>17</sup> (Straver R, Sistermans EA, Holstege H, Visser A, Oudejans CB, Reinders MJ. WISECONDOR: Detection of fetal aberrations from shallow sequencing maternal plasma based on a within-sample comparison scheme. *Nucleic Acids Res* 2014; **42**: e31.).

### **3/ Données non publiées : Étude de la fraction fœtale (FF) du DPNI ou test ADNlc utilisant la technologie des semi-conducteurs**

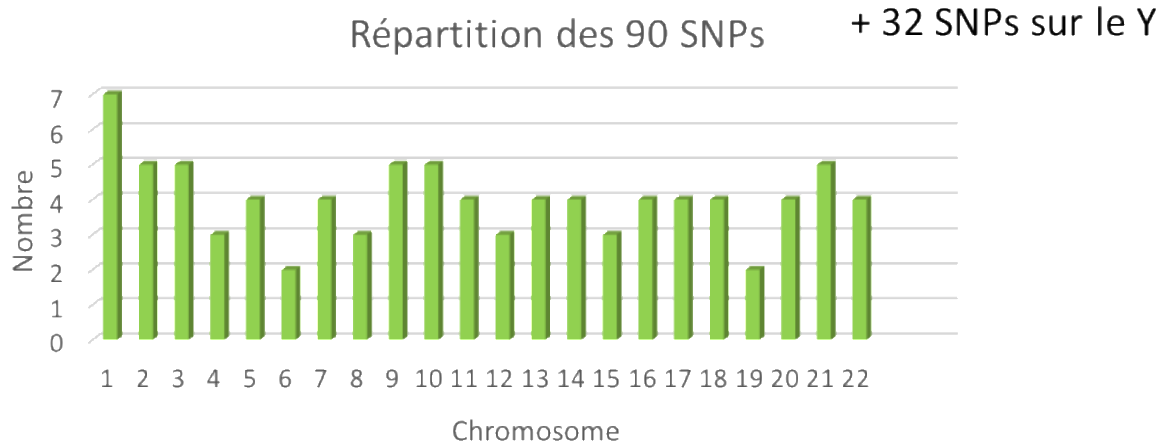
Nous nous sommes beaucoup intéressés à l'estimation de la fraction fœtale (FF). Notre objectif était de déterminer la FF sans avoir à réaliser de manipulations supplémentaires afin de refléter directement la FF des données de séquençage, de permettre la détection d'une perte de la FF au cours des étapes préparatoires (bibliothèques), de réduire les coûts inhérents à une expérience supplémentaire tout en trouvant une méthode applicable en routine clinique. Pour cela nous avons étudié plusieurs possibilités.

#### **3.1/ Panel HID-Ion AmpliSeq™ Identity, technique basée sur les Single Nucleotide Polymorphisms (SNP)**

Nous avons d'abord étudié le Panel HID-Ion AmpliSeq™ Identity, il s'agit d'un kit commercial de Life Technologies® utilisé pour l'identification humaine en médecine légale.

Notre hypothèse était de détecter des écarts de fréquence allélique quand il y a présence d'un mélange mère – fœtus et que les deux n'ont pas le même génotype, c'est inspiré de l'approche de Jiang *et al* (24) rapportant qu'il faut 5000 SNPs bien couverts pour évaluer cette fraction fœtale.

Notre kit comportait 134 SNPs (dont 34 sur le Y) avec une forte diversité génétique, particulièrement adapté à l'ADN dégradé et en faible quantité (*figure 4 et figure 5*).



*Figure 4 :* Répartition des Single Nucleotide Polymorphims (SNP) que nous avons utilisés

Individu 1 GTATTAGAGC**C**TATAGGGCTCTAA  
 Individu 1 GTATTAGAGC**T**TATAGGGCTCTAA  
 Individu 2 GTATTAGAGC**T**TATAGGGCTCTAA  
 Individu 2 GTATTAGAGC**T**TATAGGGCTCTAA

*Figure 5 :* Exemple de SNP

Pour chaque SNP, il y a deux allèles.

Lorsqu'il n'y a pas de mélange, les fréquences alléliques théoriques sont 0-100 (si homozygote) ou 50-50 (si hétérozygote). Lorsqu'il y a un mélange mère et fœtus, quatre cas sont possibles en fonction des statuts homo ou hétérozygotes respectifs de la mère et du fœtus. Ces quatre cas sont décrits dans le *Tableau 1*.

	Maximum Allele Frequency avec FF = 10 %
Mère homozygote - Fœtus hétérozygote	95%
Mère hétérozygote - Fœtus homozygote	55%
Mère homozygote - Fœtus homozygote	100%
Mère hétérozygote - Fœtus hétérozygote	50%

*Tableau 1* : Résultats attendus avec fraction fœtale à 10%

Nous avons testé 82 patientes enceintes avec ce kit. Des écarts sont bien détectés et en ne gardant que les marqueurs avec des Maximum Allele Frequency (MAF) « atypiques », la FF était estimée entre 5 et 20% selon les patientes.

Malheureusement, quand nous avons analysé deux femmes non-enceintes, les résultats étaient identiques, donc les écarts de fréquences alléliques observés étaient surtout dus aux marqueurs qui ont des hétérozygoties parfois loin de 0.5 et surement des amplifications préférentielles d'un des deux allèles. Ces écarts demeuraient même en ne gardant que les 37 SNPs qui avaient un profil « normal », avec donc une hétérozygotie proche de 50% (*figure 6*).

Chrom	Position	Target ID	HotSpot ID	Maj Allele Freq	Maj Allele Freq	Maj Allele Freq	Maj Allele Freq	Maj Allele Freq	Maj Allele Freq	Maj Allele Freq	Maj Allele Freq	Maj Allele Freq
chr1	4367323	rs1490413	rs1490413	51,408433	52,5392559	57,5313562	99,9879909	50,7559395	51,6143106	52,2757697	53,4793457	56,3488872
chr1	14155402	rs7520386	rs7520386	65,8577607	99,5065165	99,9205719	70,6760316	67,4223178	69,7431986	99,4341148	81,7313374	99,3195823
chr1	105717631	rs4847034	rs4847034	99,565481	60,4283054	96,6186253	57,6430976	97,6430976	55,3299492	99,0654206	99,4219653	54,5180336
chr1	160786670	rs560681	rs560681	99,9038419	99,9408634	98,9075878	51,5117936	99,3971546	99,5709178	99,9252243	99,3823845	99,9219331
chr1	238439308	rs10495407	rs10495407	54,4008638	99,8142127	99,7911227	99,8934848	56,456044	61,6855248	99,8322148	56,063376	99,8388601
chr1	239881926	rs891700	rs891700	98,7852425	99,8145859	51,663511	99,1483322	99,9042146	67,5963905	98,6095662	99,5480226	54,2506182
chr1	242806797	rs1413212	rs1413212	99,7178016	99,2261773	99,1940127	99,4994041	99,5142487	70,4342273	65,940418	99,519774	56,0973269
chr2	114974	rs876724	rs876724	62,5123701	99,6533795	97,5738397	67,5263775	63,0376344	72,0524017	98,3240223	100	99,8208688
chr2	10085722	rs1109037	rs1109037	99,8796575	98,4026902	100	99,7586727	50,4065041	99,9771272	59,1589227	99,9706809	99,9031008
chr2	124109213	rs993934	rs993934	99,4330672	99,4630872	99,0942029	60,7344633	99,1735537	66,8918919	66,6666667	64,516129	60,0916158
chr2	182413259	rs12997453	rs12997453	55,2088175	99,0131579	55,656697	52,0661157	66,6666667	53,5087719	100	100	97,509113
chr2	239563579	rs907100	rs907100	50,3584381	50,8058327	99,9319574	53,0597552	53,972154	99,0871892	99,9009247	51,4760148	98,441033
chr3	961782	rs1357617	rs1357617	95,0812751	97,9495268	52,057036	98,0652963	53,1487271	98,1311372	99,8194403	96,8733715	62,3983507
chr3	32417644	rs4364205	rs4364205	49,8640444	99,6210327	50,3421601	53,6565325	51,7207082	98,7557302	56,3627499	60,5586323	60,3060892
chr3	113804979	rs1872575	rs1872575	53,6506267	50,077101	99,9681478	99,9354214	99,8801247	99,9454744	50,3286653	99,9432785	59,4224847
chr3	190806108	rs1355366	rs1355366	52,0332899	50,8072878	99,443917	52,127048	99,5836985	50,5995204	99,7026575	99,9335327	99,9646322

SNP OK (MAF 50-55 ou >95)	37
SNP risqué (MAF 55-60 ou 90-95)	21
SNP à exclure (MAF >60 ou MAF <90)	32

Figure 6 : Test des différents SNPs.

Seuls 37 SNPs avaient un profil normal avec un MAF entre 50% et 55% ou supérieur à 95%.

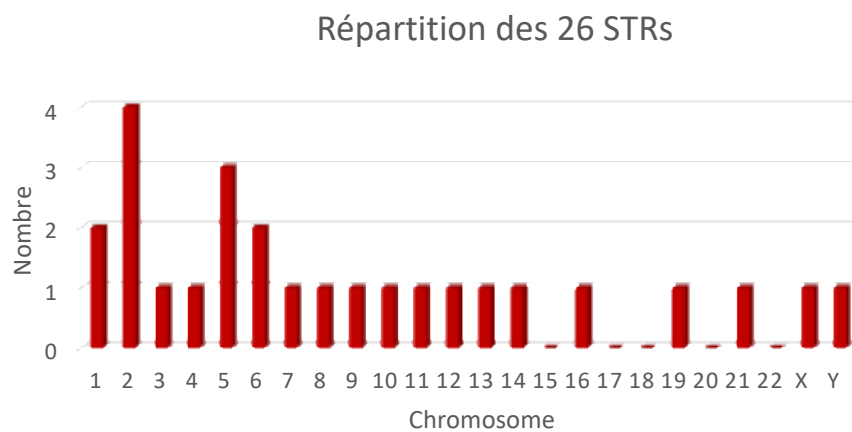
Nous avons donc décidé d'arrêter cette piste.

### 3.2/ Les Short Tandem Repeat (STR)

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé les Short Tandem Repeat (STR) qui ont l'avantage de ne pas être seulement bi-alléliques en termes d'informativité. Si trois allèles ou plus sont détectés c'est qu'il y a un mélange de plusieurs individus, ce en évitant d'avoir à évaluer un ratio sur un même allèle. En regardant les proportions des allèles paternels, nous devons pouvoir estimer une fraction fœtale. Nous avons eu une discussion technique avec la police scientifique de Lyon qui utilise cette technologie des STR pour étudier les mélanges d'ADN, mais en séquençage Sanger classique, et non en NGS (il est connu que le NGS n'aime pas les STR car les motifs répétés font déraper la polymérase).



Nous avons eu accès un kit de 26 marqueurs STR (dont un sur le X et un sur Y) non commercialisé à ce moment-là (*figure 7 et figure 8*), et nous avons été inclus dans le programme Early Access mondial pour valider ce kit.



*Figure 7*: Répartition des Short Tandem Repeat (STR) que nous avons utilisés

```

Individu 1 CACCTGACTCTCTCTCTCTCTCGTCATAT
Individu 1 CACCTGACTCTCTCTCTCTCTCTCGTCATAT
Individu 2 CACCTGACTCTCTCTCTCTCTGTCATAT
Individu 2 CACCTGACTCTCTCTCTGTCATAT
    
```

*Figure 8*: Exemple de Short Tandem Repeat (STR) multi-alléliques

Nous avons réalisé deux runs :

- **Run 1 :**

Nous avons testé des mélanges en proportions variables des deux échantillons de référence en forensic (homme 007 et femme 9947A) : 1/1 – 1/10 – 1/100 ainsi que quatre patientes enceintes et une femme non-enceinte.

Nous avons rencontré les mêmes problèmes que pour le panel SNP. Il y avait des pics parasites sur la femme non-enceinte (*figure 9*) et aussi sur les autres échantillons, il était donc impossible de différencier les pics parasites (liés au « stuttering » : polymérase qui « dérape ») des vrais allèles du père.

- **Run 2 :**

Nous avons donc eu l'idée inclure les pères afin de pouvoir être certains des profils attendus, nous avons donc lancé un nouveau recrutement avec consentement pour exploitation de l'ADN paternel. Nous avons analysé trois couples (homme + femme enceinte) (*figure 10*) ainsi que trois femmes non-enceintes (*figure 9*). Malheureusement nous ne sommes pas parvenus à séparer les pics parasites des vrais allèles du père dans l'ADN fœtal, malgré une grande profondeur de lecture.



*Figure 9* : Exemple de résultats chez une femme non enceinte



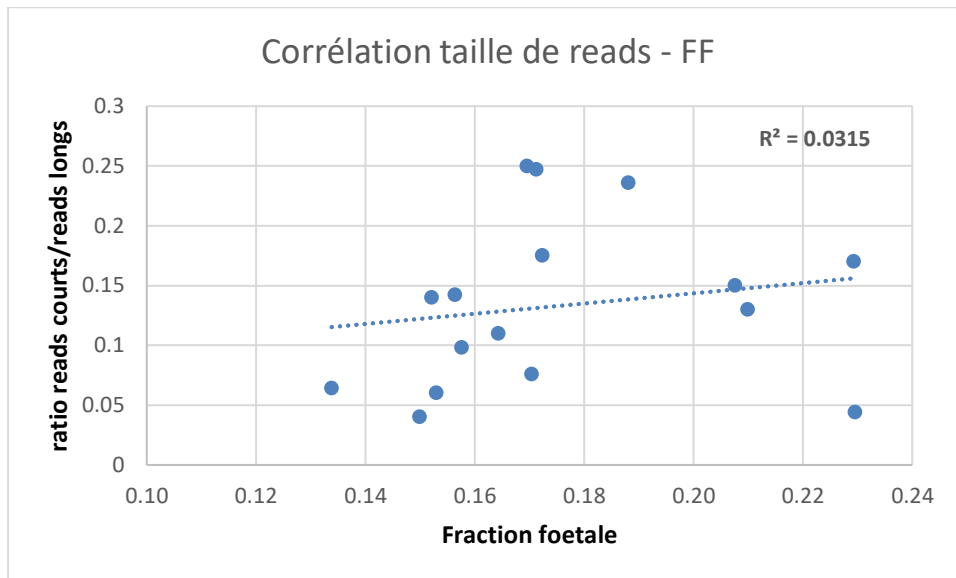
*Figure 10*: Exemple de résultats couple homme + femme enceinte

Détection de l'allèle 13 du père chez la femme enceinte

Nous n'avons donc pas retenu ce kit qui ne nous a pas semblé être utilisable pour estimer la fraction fœtale, ni même confirmer la présence d'un mélange mère-fœtus. La police scientifique est d'ailleurs arrivée à la même conclusion.

### **3.3/ Estimation de la FF grâce à la proportion reads courts / reads longs**

Puis, nous avons tenté une nouvelle approche basée sur le travail de Yin *et al* (25) : un modèle statistique pour évaluer la fraction fœtale en regardant la proportion de reads courts (130-140pb, a priori enrichis en ADN fœtal) et de reads longs (155-175pb, a priori enrichis en ADN maternel). Nous avons testé 16 échantillons dont la FF avait été préalablement déterminée par l'hôpital DPNI Cochin avec la technique de PCR digitale basée sur SRY) (*figure 11*).



*Figure 11:* Corrélation taille de reads – Fraction Fœtale

Nous n'avons pas retrouvé de corrélation ( $R^2=0.03$ ). Nous avons contacté l'équipe de Yin par mail pour ajuster le modèle, à ce jour nous sommes sans réponse.

**PARTIE 2 : ANALYSE  
CHROMOSOMIQUE SUR  
PUCES À ADN (ACPA) DANS  
LE RETARD DE  
CROISSANCE INTRA-  
UTÉRIN (RCIU)**

# **PARTIE 2 : ANALYSE CHROMOSOMIQUE SUR PUCES À ADN (ACPA) DANS LE RETARD DE CROISSANCE INTRA-UTÉRIN**

Entre janvier 2012 et décembre 2017, 1007 fœtus au sein du centre de médecine fœtale du CHU de Bordeaux ont bénéficié d'une étude par ACPA, parmi eux 143 présentaient un retard de croissance in intra-utérin.

## **1/ Contexte**

### **1.1/ Indications de la CGH-array ou ACPA en prénatal**

Les indications de l'ACPA en prénatal ont été déterminées par le réseau AChro-Puce en septembre 2013 (3), révisées en juin 2019 (en attente de diffusion).

- Les indications chromosomiques
  - Caractérisation d'un remaniement chromosomique identifié sur le caryotype :
    - marqueur chromosomique
    - chromosome en anneau
    - remaniement chromosomique apparemment équilibré (translocation ou inversion)  
avec signe d'appel échographique et/ou si *de novo*

- remaniement chromosomique déséquilibré (délétion ou duplication) pour lequel il est nécessaire de préciser par exemple la taille du déséquilibre ou de mieux caractériser un remaniement déséquilibré complexe sur le caryotype.

- Sont exclus les remaniements chromosomiques apparemment équilibrés, hérités et sans signe d'appel échographique.

- Les signes d'appel échographiques

- Les clartés nucales  $\geq 3,5$ mm
- Les retards de croissance intra-utérin inférieurs au 3ème percentile sans étiologie vasculaire (En juin 2019, le réseau AChro-Puce a supprimé la caractéristique « sans étiologie vasculaire »).
- Les syndromes malformatifs
- Les malformations isolées (cardiopathie, anomalie cérébrale...) ne peuvent être l'objet d'une liste et doivent être discutées au cas par cas au sein des CPDPN.

- Sont exclus des indications :

- Le dépistage combiné (avec clarté nucale  $<3,5$  mm) (En juin 2019, le réseau AChro-Puce a supprimé cet item des indications exclues).
- Le dépistage par marqueurs sériques du 2ème trimestre seuls (En juin 2019, le réseau AChro-Puce a supprimé cet item des indications exclues).
- L'âge maternel
- L'anxiété maternelle

## **1.2/ Le retard de croissance Intra-Utérin (RCIU)**

Le Collège National des Gynéco-Obstétriciens Français (CNGOF) a retenu lors des Recommandations pour la Pratique Clinique (RPC) en 2013 (27) (28) la terminologie suivante, à utiliser en anté comme en postnatal:

- Le petit poids pour l'âge gestationnel ou PAG (équivalent français de *Small for Gestational Age* ou SGA) est défini par un poids isolé (estimation pondérale *in utero* ou poids de naissance) inférieur au 10<sup>e</sup> percentile, (accord professionnel).
- Le RCIU (équivalent français de *fetal growth restriction* (FGR) ou *intra-uterine growth retardation* IUGR) correspond le plus souvent à un PAG associé à des arguments en faveur d'un défaut de croissance pathologique : arrêt ou infléchissement de la croissance de manière longitudinale (au moins 2 mesures à trois semaines d'intervalle) (accord professionnel). Plus rarement, un RCIU peut correspondre à un défaut de croissance, avec un poids proche du 10<sup>ème</sup> percentile sans être PAG (niveau de preuve 2).

Le dépistage des RCIU en prénatal est un des défis majeurs en obstétrique et en diagnostic prénatal (29). Le RCIU peut être secondaire à plusieurs étiologies : cause vasculaire, anomalies chromosomiques, syndromes génétiques, malformations congénitales et infections virales (30) (31). La cause vasculaire est la plus fréquente, elle résulte d'une mauvaise vascularisation utéro-placentaire (31) (32).

Dans les RCIU isolés, il peut parfois être difficile de faire la part des choses entre une cause vasculaire isolée ou non, ou bien une toute autre cause. Or, le réseau de professionnels AChro-Puce recommandait, jusqu'à ce jour, la réalisation de l'ACPA en prénatal pour les RCIU avec une estimation du poids fœtal inférieur au troisième percentile sans étiologie vasculaire (26). Nous nous sommes donc intéressés à cette population de fœtus ayant un



RCIU isolé avec une estimation du poids fœtal inférieur au troisième percentile ou associé afin de déterminer l'utilité diagnostique de l'ACPA dans cette population.

## **2/ Article (33)**





















# **DISCUSSION GÉNÉRALE**

# DISCUSSION GÉNÉRALE

Le diagnostic prénatal (DPN) regroupe l'ensemble des pratiques médicales ayant pour but de diagnostiquer *in utero* chez le fœtus des maladies particulièrement graves d'origine génétique, infectieuse ou autres, ou des malformations anatomiques, et d'en préciser le pronostic. Les objectifs sont multiples : permettre une meilleure prise en charge médicale à la naissance du bébé à naître, préparer les parents à l'accueillir ou, lorsqu'il s'agit d'une maladie particulièrement grave ou incurable de leur permettre de faire un choix éclairé sur le devenir de la grossesse en cours, de permettre un meilleur suivi de la grossesse voire une prise en charge thérapeutique anténatale. La médecine fœtale a complètement révolutionné le suivi de grossesse grâce aux découvertes en génétique, aux progrès en biologie et en imagerie médicale.

Le diagnostic prénatal (DPN) est un domaine en médecine en constante évolution avec l'apparition de nouvelles techniques avec notamment l'apparition du DPNI ou test d'ADN libre circulant (ADNlc).

## **1/ Test ADN libre circulant (ADNlc)**

### **1.1/ Dépistage de la trisomie 21**

La trisomie 21 (T21) est la seule maladie d'origine génétique pour laquelle un dépistage est systématiquement proposé pendant le suivi de la grossesse, en France. La trisomie 21 (T21) est une anomalie chromosomique dont la prévalence à la naissance augmente avec l'âge maternel: 1/1 500 à 20 ans, 1/900 à 30 ans, 1/250 à 38 ans et 1/100 à 40 ans (34). Elle est observée en moyenne lors de 27 grossesses sur 10 000 (35).

L'arrêté du 23 juin 2009 (3) a fixé l'organisation du dépistage de la T21 selon les trois procédures suivantes :

- à titre principal, le dépistage combiné du premier trimestre, qui se fonde sur la mesure échographique de la clarté nucale (entre 11+0 et 13+6 semaines d'aménorrhée (SA) avec une longueur cranio-caudale comprise entre 45 et 84 mm) et le dosage des marqueurs sériques du premier trimestre (PAPP-A et hCG  $\beta$  ),
- le dépistage par les marqueurs sériques seuls au deuxième trimestre de grossesse entre 14SA et 17+6 SA),
- le dépistage séquentiel intégré, qui repose sur la mesure de la clarté nucale au premier trimestre de grossesse et le dosage des marqueurs sériques du deuxième trimestre.

Lorsque le niveau de risque estimé était supérieur ou égal à 1/250, une confirmation diagnostique par caryotype fœtal est proposée, nécessitant un examen invasif (amniocentèse ou choriocentèse) associé à un risque de perte fœtale. Selon les données 2014 de l'Agence de la biomédecine, environ 18 500 examens invasifs à visée diagnostique ont été réalisés chez des femmes ayant un niveau de risque de trisomie 21 fœtale  $\geq$  1/250. Le diagnostic de

trisomie 21 fœtale n'a été confirmé par caryotype fœtal que chez 750 d'entre elles (soit 1 cas confirmé pour 25 examens invasifs) (36). D'après une méta-analyse publiée en 2015, ces prélèvements invasifs, induisent un risque de perte fœtale considéré proche de 0,11% pour une amniocentèse et 0,22% pour une biopsie de villosités choriales (37). Par ailleurs, en cas de clarté nucale  $\geq 3,5$  mm ou autres signes d'appel échographiques, un caryotype fœtal peut être réalisé (35).

Depuis novembre 2013, un nouveau test de dépistage d'aneuploïdie est disponible en France : le DPNI ou test ADN libre circulant (ADNlc) (38). L'introduction de ce test a pour but de permettre de limiter le recours aux examens invasifs. En France, ce test était alors proposé par principalement, mais non uniquement, deux laboratoires privés utilisant une plateforme NGS de type Illumina HiSeq (38), le test n'était alors pas remboursé par la sécurité sociale et coûtait environ 1000 à 1200€ à la patiente.

## **1.2/ Dépistage des aneuploïdies par le test ADNlc utilisant la technologie des semi-conducteurs**

Plusieurs auteurs se sont alors intéressés à la technologie des semi-conducteurs qui représentaient une alternative en terme de coût-efficacité intéressante (21) (39) (40) (41) (42) (43). En 2013, Yuan *et al* (21) ont prouvé avec une étude validant le concept que la technologie des semi-conducteurs pouvait aussi être utilisée pour le dépistage prénatal non invasif des aneuploïdies fœtales, avec l'avantage d'un run plus rapide durant environ trois heures. Le nombre d'échantillons testés étant faible, seulement 13 cas (six T21, deux T18 et une T13), et l'étude n'étant pas une étude prospective, les auteurs ont conclu que des études plus importantes étaient nécessaires afin de valider cette technique. En 2014, une autre étude de faisabilité du DPNI ou test ADNlc de la T21 et T18 fœtales utilisant la technologies des

semi-conducteurs (Ion Torrent Proton) a été publiée (40), elle comportait 155 patientes enceintes à haut risque d'anomalies fœtales, elle a aussi confirmé que la technologie des semi-conducteurs pouvait aussi être utilisée pour le DPNI des aneuploïdies fœtales (T21 et T18). Cependant les auteurs ont considéré que leur étude n'était pas valable pour la routine clinique car ils n'avaient pas évalué la fraction fœtale, ils ont de plus estimé qu'un échantillon de 400 patientes enceintes à haut risque serait nécessaire afin d'atteindre au moins 98% de spécificité. Puis Liao *et al* (39) ont publié la première grande étude clinique sur le dépistage prénatal non invasif des aneuploïdies fœtales utilisant la technologies des semi-conducteurs. Cet article comprend à la fois une étude rétrospective et une étude prospective. Dans l'étude rétrospective, 515 patientes avaient bénéficié d'un caryotype fœtal dans le cadre d'un diagnostic prénatal. Les 55 cas de T21 fœtales ont tous été identifiés par le test ADNlc utilisant la technologie des semi-conducteurs avec respectivement une sensibilité et une spécificité de 99.94% et 99.46%. Le test ADNlc utilisant la technologie des semi-conducteurs a aussi permis la détection de 16 T18 avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 99.24% et trois T13 avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 100%. Dans l'étude prospective 1760 patientes enceintes n'ayant pas bénéficié d'un caryotype fœtal ont été incluses : neuf T21, trois T18, trois T13 et un cas de Turner fœtaux ont été détectés. Afin de confirmer ces résultats, les auteurs ont sélectionné de manière aléatoire six cas de T21 fœtales et le cas de Turner fœtal pour la réalisation d'un caryotype fœtal et par là même, confirmer les résultats des tests ADNlc comme étant de vrais positifs. En 2015, Minarik *et al* (41) ont confirmé que le test ADNlc de la trisomie 21 (ADNlcT21) avec des systèmes de NGS moyen débit tels que Ion Torrent PGM et Illumina MiSeq menait à des résultats équivalents à ceux obtenus dans les études précédemment réalisées qui utilisaient des systèmes NGS à haut et très haut débit. Ils ont aussi rapporté que la sélection de taille de l'ADN circulant *in silico* augmentait la spécificité du test et que la sélection expérimentale de taille de l'ADN

augmentait les Z scores. Ces résultats observés auraient pu représenter une piste afin d'améliorer le rapport coût-efficacité et par là même améliorer la prise en charge en routine clinique. En Mars 2016, Johansen *et al* (42) ont reporté les premiers résultats de tests ADNlc des trisomies dans une population de 375 patientes à haut risque (risque combiné  $\geq 1/300$ ) dans un hôpital public, utilisant la technologie des semi-conducteurs (séquenceur Ion Torrent Proton). Dheedene *et al* (43) ont publié leurs résultats après avoir mis en place dans un laboratoire académique publique le dépistage prénatal non invasif des aneuploïdies utilisant la technologies des semi-conducteurs pendant 15 mois : 1081 échantillons dont 17 présentaient un résultat pathologique (14 T21, une T18 and une T16).

Notre équipe s'est donc joint à six autres équipes académiques françaises afin de développer une technique novatrice de test ADNlc basée sur la technologie des semi-conducteurs sur séquenceur Proton, accessible à toutes les patientes et de standardiser la technique afin de réduire les coûts.

### **1.3/ Performance de la technologie des semi-conducteurs pour le test ADNlc**

Notre étude est une des plus grandes études évaluant le test ADNlc utilisant la technologie des semi-conducteurs Ion Proton et est la première étude clinique à rapporter les issues de grossesses dans une population aussi large (23).

Une méta-analyse de 2017 incluant 32 études, soit 169675 grossesses de singletons, a mis en évidence une sensibilité de 99,3 % (IC 95 % [0,955–0,999]) et une spécificité de 99,9 % (IC 95 % [0,998–0,999]) pour le dépistage de la T21 dans la population générale. Dans cette même population, les sensibilités et spécificités communes pour T13 et T18 n'ont pu être



calculées en raison du faible nombre d'études. Dans les populations à haut risque, la sensibilité était de 99,8 % (IC 95 % [0,981–0,999]) pour la T21, de 97,7 % (IC 95 % [0,958–0,987]) pour la T18 et de 97,5 % (IC 95 % [0,819–0,997]) pour la T13. La spécificité globale pour ces trois trisomies était de 99,9 % (IC 95 % [0,998–0,999]) (44). Une seconde méta-analyse publiée en 2017 incluant 35 études et comparant les résultats des tests ADNlc réalisés aux caryotypes et aux issues néonatales sur des grossesses monofoetales, mettait en évidence une sensibilité supérieure à 99 % pour la T21, de 98 % pour la T18 et de 99 % pour la trisomie 13 avec un taux de faux positif global de 0,13 % (45).

Nos résultats sont concordants avec ces deux méta-analyses avec respectivement une sensibilité et une spécificité de : 98.3% (IC 95% [93.5 - 99.7]) et 99.9% (IC 95 % [99.4 -100]) pour la T21, 96.7% (IC 95% [80.9 - 99.8]) and 100% (IC 95% [99.6 - 100]) pour la T18 ; à noter pour la T13 une sensibilité plus faible que celle rapportée dans la littérature 94.1% (IC 95% [69.2 - 99.7]) mais une spécificité de 100% (IC 95% [99.6 - 100]) (23).

#### **1.4/ Étude de la fraction fœtale (FF) du test ADNlc avec la technologie des semi-conducteurs**

En Mars 2016, Johansen *et al* rapportent les premiers résultats de DPNI des trisomies dans une population de 375 patientes dans un hôpital public, utilisant la technologie des semi-conducteurs et Wisecondor pour la détection des trisomies et SeqFF pour l'estimation de la fraction fœtale (42). SeqFF est une méthode de détermination de la FF basée sur le fait que certaines régions du génome sont surreprésentées dans l'ADN fœtal libre circulant par rapport à l'ADN libre circulant maternel (46). Dheedene *et al* (43), dans un laboratoire académique, ont évalué la fraction fœtale en utilisant trois algorithmes : FF based on Y chromosome-specific reads (FF-Y), SeqFF and Fragment length distribution. Ils ont établi que l'étude de la

fraction fœtale améliorerait la fiabilité du DPNI tout en aidant à l'interprétation des Z-scores. Il s'agit, à notre connaissance des deux seuls articles sur le DPNI utilisant la technologie des semi-conducteurs qui aient rapporté leurs techniques permettant de calculer la fraction fœtale, avant notre travail.

Nous nous sommes intéressés à l'estimation de la fraction fœtale et avons étudié plusieurs possibilités : le Panel HID-Ion AmpliSeq™ Identity technique basée sur les Single Nucleotide Polymorphisms (SNP), les Short Tandem Repeat (STR) et la proportion de reads courts et de reads longs, toutes non concluantes. Une autre étude sur 84 échantillons de patientes enceintes a validé une technique d'évaluation de la FF basée sur 250000 SNPs avec la technologie des semi-conducteurs (47), cependant aucun test n'a été effectué sur des patientes non enceintes dans cet article.

Enfin, nous avons comparé trois méthodes : une expérimentale (RASSF1A) et deux in silico, (DEFRAG et SANEFALCON), montrant que l'estimation de la fraction fœtale par DEFRAG et RASSF1A étaient comparables, validant donc ces deux techniques pour l'utilisation en routine clinique, tandis que la validation de SANEFALCON nécessite d'autres études (23).

### **1.5/ Coût du test ADNlc avec la technologie des semi-conducteurs**

Le prix du test ADNlcT21 a considérablement baissé depuis 2013 ; en effet depuis janvier 2019 le prix est de 362,88€ selon la Caisse Primaire d'Assurance Maladie (codes NABM 4087 et 4088, tous les deux à 1344B) et d'environ 390€ dans un laboratoire privé de ville lorsque l'indication de la réalisation du test ADNlc est en dehors des recommandations. Les laboratoires privés ont dû réduire leurs prix avec l'émergence d'autres laboratoires privés

utilisant la technologie des semi-conducteurs et proposant des prix beaucoup moins élevés. En effet, en 2016, deux études ont été publiées sur le IONA® test qui propose un test de DPNI CE-IVD (norme qualité européenne) pour les trisomies 21,18 et 13 utilisant la plateforme de séquençage Ion Proton (48) (49); toutes les deux ont confirmé que le IONA® test était un test performant pour le dépistage des trisomies en population à haut risque. Cependant, ce test ne permet pas d'étudier un nombre important d'échantillons simultanément (seulement huit échantillons à la fois).

Lors de notre étude de validation de la technique, nous avons alors évalué notre coût à 300€ par échantillon hors temps technicien.

Une récente revue de la littérature rapporte que le rapport coût-efficacité est variable lorsque le test ADNlc n'est pas proposé de façon systématique mais s'intègre dans une stratégie de dépistage, et que celui-ci n'est pas favorable lorsque le test ADNlc est proposé à toutes les patientes (50). De plus une étude française récente comparant cinq stratégies de dépistage de la T21 est aussi arrivée à la conclusion que le test ADNlcT21 en population générale était la stratégie la plus onéreuse et que bien qu'elle augmentait le taux de dépistage de la T21, elle diminuait aussi le taux de détection d'autres anomalies chromosomiques par rapport aux autres stratégies de dépistage étudiées (51).

## **1.6/ Place des tests ADNlcT21 dans le dépistage de la trisomie 21 fœtale en France en 2019**

Ce test est disponible depuis 2013 en France, proposant le dépistage des trois principales trisomies autosomiques, les trisomies 13, 18 et 21 (38). Il se déploie progressivement dans toute l'Europe, mais l'encadrement de sa prescription en France n'a commencé qu'en 2015,

avec les recommandations de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF) ACLF version 1 (52) et ACLF version 2 (53)), suivies en 2017 par Recommandations pour le dépistage des anomalies chromosomiques fœtales par l'étude de l'ADN libre circulant (ADNlc) (ACLF version 3) (54)).

La Haute Autorité de Santé (HAS) a publié en avril 2017 un rapport (35) indiquant que le test sur ADNlc dans le cadre du dépistage de la trisomie 21 peut être proposé si le risque estimé de trisomie 21 par le dépistage est supérieur ou égal à 1/1000, quelle que soit la stratégie utilisée (dépistage combiné du premier trimestre ou marqueurs sériques maternels du deuxième trimestre). Par ailleurs, il est également recommandé qu'un caryotype fœtal soit proposé d'emblée à toute femme enceinte dont le niveau de risque de trisomie 21 est supérieur à 1/50. Un test sur ADNlc pourra cependant être réalisé si la femme enceinte le préfère. La HAS n'a pas émis de recommandations pour les grossesses multiples.

En 2017, l'ACLF (54) recommande de proposer ce test pour les indications suivantes :

- en cas de grossesse singleton, si le risque de trisomie 21 fœtale évalué après dépistage par les marqueurs sériques est supérieur à 1/50 si ce dépistage a la préférence de la femme enceinte par rapport au prélèvement invasif recommandé ;

- en cas de grossesse singleton, si le risque de trisomie 21 fœtale évalué après dépistage par les marqueurs sériques est compris entre 1/51 et 1/1000 ;

- en cas d'antécédent de grossesse avec aneuploïdie ou si un des parents est porteur d'une translocation robertsonienne impliquant un chromosome 13 ou un chromosome 21, sans passer par l'étape des marqueurs sériques maternels et après conseil génétique ;

- en cas de grossesse multiple, sans passer par l'étape des marqueurs sériques maternels ;

- si l'échographie du premier trimestre ou le dépistage par les marqueurs sériques n'ont pas pu être réalisés ;

- en cas de profil de marqueurs sériques maternels hors bornes, en particulier ceux évocateurs de trisomie 18.

Il y avait donc une discordance entre les recommandations émises par l'HAS et l'ACLF. De plus, bien que l'HAS recommande le test ADNlcT21, celui-ci n'était pas pris en charge par la sécurité sociale et restait à la charge des patientes.

Un arrêté spécifique du 14 décembre 2018 (55), publié le 27 décembre 2018, a fixé les nouvelles modalités de dépistage et a permis le remboursement de ce test ADNlcT21 dans certaines indications à partir du 18 janvier 2019 :

- en cas de grossesse singleton, si le risque de trisomie 21 fœtale évalué après dépistage par les marqueurs sériques est supérieur à 1/50 et si ce dépistage a la préférence de la femme enceinte par rapport au prélèvement invasif recommandé ;

- en cas de grossesse singleton, si le risque de trisomie 21 fœtale évalué après dépistage par les marqueurs sériques est compris entre 1/51 et 1/1000 ;

- en cas de grossesse multiple ;

- en cas d'antécédent de grossesse avec trisomie 21 ;

- en cas de parent porteur d'une translocation robertsonienne impliquant le chromosome 21.

Les indications de remboursement demeurent toujours moins larges que les indications du test ADNlc émises par l'ACLF en 2017 (54).

L'HAS se positionne seulement sur le dépistage de la T21, or le test ADNlc est aussi performant pour le dépistage de la T18 et la T13. De plus le test ADNlc est beaucoup plus performant que le dépistage combiné de la T21 en population générale en ce qui concerne le dépistage de la T21 (56). Dans l'étude SAFE 21, 2436 patientes avec un haut risque de T21 au premier trimestre ( $>1/250$ ) ont été incluses ; après information 21,1% d'entre elles ont exprimé une préférence pour le test invasif mais la majorité d'entre elles 75.7% d'entre elles étaient plus en faveur du test ADNlc (57).

Le test ADNlc nous paraît être l'avenir très proche du dépistage de la T21, la T18 et la T13 au premier trimestre en population générale, tel que cela est déjà réalisé dans d'autres pays (Italie, Pays-Bas, Etats-Unis) (35)

## **2/ Le diagnostic prénatal invasif dans l'indication du retard de croissance intra-utérin (RCIU) isolé**

Le dépistage, le diagnostic et le diagnostic prénatal invasif du RCIU demeurent un défi et un enjeu majeur en médecine fœtale, il y a encore de nombreux nouveau-nés considérés comme hypotrophes à la naissance qui n'ont pas été diagnostiqués comme RCIU en anténatal. En effet, la performance de l'échographie pour dépister les PAG est faible avec une sensibilité de 22 % en France (27). Depuis 2013, le réseau AChro-Puce (26) recommande la réalisation de l'ACPA en prénatal pour les RCIU avec une estimation du poids fœtal inférieur au troisième percentile sans étiologie vasculaire.

Au fil des réunions du Comité Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal (CPDPN), nous nous retrouvions toujours à discuter de l'indication de DPN en cas de RCIU isolé avec finalement une impression de mauvais rendement diagnostique, nous avons donc décidé d'étudier cette question.

Notre travail (33) est le premier article à soulever la question de l'intérêt de l'ACPA dans le diagnostic prénatal des RCIU isolés. En effet, dans notre population de 84 RCIU isolés, aucun Copy Number Variation (CNV) n'a été mis en évidence, ce qui va à l'encontre des autres publications (58).

Depuis la publication de notre étude, 150 DPN de plus ont été réalisés pour RCIU dans notre centre : 108 RCIU isolés et 42 RCIU associés. Parmi les 42 nouveaux cas RCIU associés, nous avons détecté un cas de trisomie 14 en mosaïque, deux CNV pathogènes et trois Variant Of Unknown Significance (VOUS) hérités. Parmi les 108 nouveaux cas de RCIU isolés, nous avons détecté une trisomie 16 confinée au placenta, trois VOUS hérités et un VOUS *de novo*. Le VOUS *de novo* était une duplication de 5,4 Mb en 19p13.11p12 incluant 102 gènes dont 8 OMIM Morbid, il s'agit donc d'un CNV, celui-ci est rare, peu décrit dans les bases de données, c'est donc notre seul cas de CNV sur une population de 192 RCIU isolés (84+108).

Une étude récente s'est aussi intéressée à une population de 127 RCIU isolés avec une estimation de poids fœtal inférieur au dixième percentile Hadlock, l'ACPA a permis de mettre en évidence 10 CNV et 2 VOUS et a permis un gain diagnostique d'anomalies chromosomiques de 5,5% par rapport au caryotype (59). Les critères d'indication à un prélèvement invasif et à une ACPA nous paraissent tout de même trop larges dans cette étude.

Les prélèvements invasifs sont source de stress et de complications (37), il est donc nécessaire de toujours remettre en question leurs indications, d'autant plus que nous sommes rentrés dans l'ère du DPNI. Dans notre série de RCIU isolés, la FISH et le caryotype ont mis en évidence une monosomie X, une mosaïque 45,X(50)/46,XX(50) et trois triploïdies. Seule la triploïdie, en fonction du désir du couple, est une indication d'interruption médicale de grossesse (IMG), en effet le syndrome de Turner en l'absence de signes d'appels échographiques associés n'est plus une indication d'IMG. L'IMG pour syndrome de Turner en l'absence de signes d'appels échographiques associés n'est globalement plus pratiquée en France.

La place de l'ACPA dans cette population de RCIU isolé reste encore à évaluer par de futures études. Il se pose de même la place du test ADNlc dans cette population bien que nous sachions que le test ADNlc n'est pas en mesure de mettre en évidence une triploïdie.

De plus, le réseau AChro-Puce s'est réuni cette année et recommande maintenant la réalisation de l'ACPA en prénatal pour tous les RCIU avec une estimation du poids fœtal inférieur au troisième percentile. Ils ont retiré des recommandations la caractéristique « sans étiologie vasculaire », car comme nous le soulevons dans l'article il peut parfois être difficile de faire la part des choses entre une cause vasculaire isolée ou non, ou bien une toute autre cause de RCIU isolé.



### **3/ Le futur du Diagnostic Prénatal, de la médecine fœtale**

Aujourd'hui le dépistage prénatal non invasif est déjà utilisé en France pour la détermination du sexe fœtal permettant d'éviter le diagnostic prénatal moléculaire si le fœtus est de sexe féminin dans le cadre de maladie génétique « récessive » liée à l'X et pour le génotypage du rhésus fœtal. Le test ADNlc a des limites : échec de technique, faux positifs (jumeau évanescent porteur d'une trisomie, mosaïque confinée au placenta, mosaïque maternelle et néoplasie maternelle(60)) et faux négatifs.

Yin *et al* (25) ont démontré que la détection des anomalies subchromosomiques est possible par le test ADNlc utilisant la technologie des semi-conducteurs. Nous l'avons confirmé dans notre étude rapportant d'autres cas de trisomies rares autosomales (RAT) (deux trisomies 16, une trisomie 15 et une trisomie 8) ainsi que six autres anomalies subchromosomiques (23). Depuis la fin de notre étude, dans notre centre au CHU de Bordeaux, nous avons mis en évidence avec le test ADNlc : trois trisomies 16, une trisomie 7 et une trisomie 22 partielle. Xie *et al* ont testé 23823 échantillons avec le test ADNlc utilisant la technologie des semi-conducteurs, 188 sont revenus positifs (une T2, une T7, 15 T13, 45 T18, 125 T21, une aneusomie multiple) il n'y a eu aucun faux négatif (61).

Plusieurs études récentes (62) (25) soulignent l'intérêt du dépistage de ces RAT à l'aide du DPNI, en effet ces RAT sont souvent associées à de mauvaises issues obstétricales telles que le RCIU ou la mort fœtale in utero, leur dépistage précoce permet donc une meilleure prise en charge de la grossesse de ces patientes.

Dans une population de 57204 grossesses en Chine, la plateforme Proton a été plus performante que la plateforme Illumina pour la détection des anomalies des chromosomes sexuels (60). L'ACLF ne recommande pas le dépistage par ADNlc des anomalies des chromosomes sexuels (gonosomes), il n'entre pas dans le champ du dépistage par ADNlc pour des raisons de performances du test et d'éthique (54).

Le dépistage de syndromes microdélétionnels tels que le syndrome de Di Georges sont possibles avec le test ADNlc (63). Cependant, l'ACLF a déclaré en 2017 (54) que le dépistage des syndromes microdélétionnels n'entre pas dans le champ de l'ADNlc à l'heure actuelle, car elle considère qu'il n'existe pas pour le moment de preuve scientifique suffisante dans la littérature en ce qui concerne la spécificité, la sensibilité et la valeur prédictive positive pour envisager l'utilisation de l'analyse de l'ADN fœtal circulant dans cette application, et ceci d'autant que, mis à part les anomalies en 22q11.2, la fréquence est très basse.

Certaines études ont aussi validé la faisabilité du test ADNlc pour le dépistage des maladies monogéniques basées sur la détection de l'haplotype paternel (64).

Le test ADNlc permet donc le dépistage d'autres anomalies que les aneuploïdies : RAT, anomalies subchromosomiques, syndromes microdélétionnels et maladies monogéniques. Le développement de ce test pourrait permettre d'encore plus réduire le nombre d'indication de tests invasifs ainsi que les indications de l'ACPA tout en améliorant la prise en charge obstétricale de certaines patientes. La question de l'encadrement éthique de toutes ces avancées et possibilités de dépistage se pose. Il ne faut cependant pas oublier qu'une échographie obstétricale de qualité reste primordiale : datation de la grossesse, nombre

d'embryons, chorionicité, analyse morphologique ... Il faut aussi rester vigilant face à un usage prématuré non régulé du test ADNlc à partir de tests disponibles sur internet (détermination du sexe fœtal, interruptions volontaires de grossesse abusives...).

De plus en plus de centres considèrent que l'ACPA doit être proposé systématiquement en cas d'indication de prélèvement invasif à la place d'un caryotype et ce quel que soit l'indication clinique pour ce test. Ceci expose à la détection de VOUS et à leurs interprétations parfois difficiles. De plus l'exome qui est l'analyse de la partie codante du génome fait maintenant partie du paysage de la médecine fœtale. Sommes-nous à l'aube de l'exome en systématique en cas de prélèvement invasif ? Quelles sont les limites ?

A l'ère de l'ACPA, de l'ADNlc et maintenant de l'exome, Hashiloni-Dolev *et al* (65) décrivent le phénomène "Pandora's pregnancy". En effet, avec tous ces tests possibles l'information et la communication avec les couples deviennent de plus en plus complexes exacerbant parfois l'angoisse et le stress des couples. Les couples se retrouvent parfois dans des situations de « risque d'être à risque », de probabilités statistiques plutôt que de certitudes. Nous ne sommes plus toujours dans le cas de résultat positif ou négatif, les couples sont donc parfois dans des situations complexes avec des décisions difficiles à prendre.

Le challenge de la médecine fœtale entre les avancées techniques médicales et le questionnement éthique reste important et doit toujours être présent dans nos esprits de professionnels de santé.

# CONCLUSION GÉNÉRALE

# CONCLUSION GÉNÉRALE

La FISH, le caryotype, l'ACPA, le test ADNlc et l'exome représentent aujourd'hui les différentes techniques d'investigations génétiques en médecine fœtale. L'invention du test ADNlc a ouvert la porte au non-invasif permettant de limiter le nombre de prélèvements invasifs et par là même leurs complications. Même si les avancées du test de l'ADNlc sont rapides, d'autres applications restent à développer avec notamment le dépistage d'autres trisomies ou syndromes microdélétionnels. Les techniques telles que la FISH, le caryotype, et l'ACPA auront a priori toujours leur place afin de confirmer le résultat de l'ADNlc.

Il faut cependant toujours se remettre en question et se poser la question du phénomène « trop d'information ? ». Celui-ci entraîne parfois plus de stress que d'apaisement pour les couples.

En médecine fœtale, il est nécessaire de toujours mettre en parallèle les avancées médicales avec les enjeux éthiques.

# **BIBLIOGRAPHIE**

# BIBLIOGRAPHIE

1. article L2131-1 du Code de la Santé Publique, loi bioéthique juillet 2011 [Internet]. Disponible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/>
2. Réseau AChro-Puce, Bilan 2017 [Internet]. Disponible sur : <https://www.ffgh.net>
3. Arrêté du 23 juin 2009 fixant les règles de bonnes pratiques en matière de dépistage et de diagnostic prénatals avec utilisation des marqueurs sériques maternels de la trisomie 21 [Internet]. Disponible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/>
4. Spencer K, Souter V, Tul N, Snijders R, Nicolaides KH. A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol.* avr 1999;13(4):231-7.
5. Nicolaides KH, Spencer K, Avgidou K, Faiola S, Falcon O. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol.* Mars 2005;25(3):221-6.
6. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 16 août 1997;350(9076):485-7.
7. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* janv 1999;64(1):218-24.
8. Lo YMD, Chan KCA, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FMF, *et al.* Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med.* 8 déc 2010;2(61):61ra91.
9. Lun FMF, Chiu RWK, Chan KCA, Leung TY, Lau TK, Lo YMD. Microfluidics

digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* oct 2008;54(10):1664-72.

10. Poon LCY, Musci T, Song K, Syngelaki A, Nicolaides KH. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes. *Fetal Diagn Ther.* 2013;33(4):215-23.

11. Samura O, Miharuru N, Hyodo M, Honda H, Ohashi Y, Honda N, *et al.* Cell-free fetal DNA in maternal circulation after amniocentesis. *Clin Chem.* juill 2003;49(7):1193-5.

12. Bussani C, Di Tommaso M, Cioni R, Pasquini L, Quitadamo L, Scarselli G. Quantitative variation analysis of fetal DNA in maternal plasma samples collected before and after amniocentesis. *J Obstet Gynaecol Res.* juin 2011;37(6):571-4.

13. Lo YMD, Tsui NBY, Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Heung MMS, *et al.* Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med.* févr 2007;13(2):218-23.

14. Lo YMD, Lun FMF, Chan KCA, Tsui NBY, Chong KC, Lau TK, *et al.* Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 7 août 2007;104(32):13116-21.

15. Tong YK, Ding C, Chiu RWK, Gerovassili A, Chim SSC, Leung TY, *et al.* Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations. *Clin Chem.* déc 2006;52(12):2194-202.

16. Webb A, Madgett T, Miran T, Sillence K, Kaushik N, Kiernan M, *et al.* Non invasive prenatal diagnosis of aneuploidy: next generation sequencing or fetal DNA enrichment? *Balkan J Med Genet.* déc 2012;15(Suppl):17-26.

17. Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y, Lau VYM, Zheng W, Leung TY, *et al.* Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic



sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 23 déc 2008;105(51):20458-63.

18. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 21 oct 2008;105(42):16266-71.

19. Sparks AB, Struble CA, Wang ET, Song K, Oliphant A. 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*. avr 2012;206(4):319.e1-9.

20. Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J, *et al*. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn*. déc 2012;32(13):1233-41.

21. Yuan Y, Jiang F, Hua S, Du B, Hao Y, Ye L, *et al*. Feasibility study of semiconductor sequencing for noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy. *Clin Chem*. mai 2013;59(5):846-9.

22. van Haften G. Rapid prenatal testing using semiconductor sequencing? *Clin Chem*. mai 2013;59(5):735-6.

23. Allach El Khattabi L, Brun S, Gueguen P, Chatron N, Guichoux E, Schutz S, *et al*. Performance of Semiconductor sequencing platform for non-invasive prenatal genetic screening for fetal aneuploidies: results from a multicenter prospective cohort study in a clinical setting. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 6 sept 2018;

24. Jiang P, Chan KCA, Liao GJW, Zheng YWL, Leung TY, Chiu RWK, *et al*. FetalQuant: deducing fractional fetal DNA concentration from massively parallel sequencing of DNA in maternal plasma. *Bioinformatics*. 15 nov 2012;28(22):2883-90.

25. Yin A-H, Peng C-F, Zhao X, Caughey BA, Yang J-X, Liu J, *et al*. Noninvasive detection of fetal subchromosomal abnormalities by semiconductor sequencing of maternal

plasma DNA. Proc Natl Acad Sci USA. 24 nov 2015;112(47):14670-5.

26. groupe ACPA et DPN et le groupe qualité du réseau AChro-Puce. Guide des bonnes pratiques de l'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) en période prénatale. sept 2013; Disponible sur: [www.eacrf.org/docs/ACPA/guide%20bonnes%20pratiques%20ACPA%20DPNv1.pdf](http://www.eacrf.org/docs/ACPA/guide%20bonnes%20pratiques%20ACPA%20DPNv1.pdf)
27. French College of Gynecologists and Obstetricians. [Intra-uterine growth retardation: guidelines for clinical practice--Short text]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). déc 2013;42(8):1018-25.
28. Vayssière C, Sentilhes L, Ego A, Bernard C, Cambourieu D, Flamant C, *et al.* Fetal growth restriction and intra-uterine growth restriction: guidelines for clinical practice from the French College of Gynaecologists and Obstetricians. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. oct 2015;193:10-8.
29. Papageorgiou AT, Ohuma EO, Altman DG, Todros T, Cheikh Ismail L, Lambert A, *et al.* International standards for fetal growth based on serial ultrasound measurements: the Fetal Growth Longitudinal Study of the INTERGROWTH-21st Project. Lancet. 6 sept 2014;384(9946):869-79.
30. Bamberg C, Kalache KD. Prenatal diagnosis of fetal growth restriction. Semin Fetal Neonatal Med. oct 2004;9(5):387-94.
31. Sankaran S, Kyle PM. Aetiology and pathogenesis of IUGR. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. déc 2009;23(6):765-77.
32. Bauer R, Walter B, Brust P, Füchtner F, Zwiener U. Impact of asymmetric intrauterine growth restriction on organ function in newborn piglets. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 22 sept 2003;110 Suppl 1: S40-49.
33. Brun S, Pennamen P, Mattuizzi A, Coatleven F, Vuillaume ML, Lacombe D, *et al.* Interest of chromosomal microarray analysis in the prenatal diagnosis of fetal intrauterine

growth restriction. *Prenatal Diagnosis*. déc 2018;38(13):1111-9.

34. HAS. Les performances des tests ADN libre circulant pour le dépistage de la trisomie 21 foetale (Volet 1) [Internet]. 2015 sept. Disponible sur : [www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr)

35. HAS. Place des tests ADN libre circulant dans le sang maternel dans le dépistage de la trisomie 21 foetale Synthèse de l'argumentaire et recommandations [Internet]. 2017 avr. Disponible sur : [www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr)

36. ABM. Diagnostic prénatal 2014 - Agence de la biomédecine [Internet]. 2015. Disponible sur : [https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2015/donnees/diag-prenat/01-diag\\_prenat/synthese.htm](https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2015/donnees/diag-prenat/01-diag_prenat/synthese.htm)

37. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. janv 2015;45(1):16-26.

38. Letourneau A, Costa J-M, Benachi A. [Fetal DNA in maternal plasma and serum]. *Gynecol Obstet Fertil*. févr 2015;43(2):163-5.

39. Liao C, Yin A, Peng C, Fu F, Yang J, Li R, *et al*. Noninvasive prenatal diagnosis of common aneuploidies by semiconductor sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 20 mai 2014;111(20):7415-20.

40. Jeon YJ, Zhou Y, Li Y, Guo Q, Chen J, Quan S, *et al*. The feasibility study of non-invasive fetal trisomy 18 and 21 detection with semiconductor sequencing platform. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e110240.

41. Minarik G, Repiska G, Hyblova M, Nagyova E, Soltys K, Budis J, *et al*. Utilization of Benchtop Next Generation Sequencing Platforms Ion Torrent PGM and MiSeq in Noninvasive Prenatal Testing for Chromosome 21 Trisomy and Testing of Impact of In Silico and Physical Size Selection on Its Analytical Performance. *PLoS ONE*. 2015;10(12):e0144811.

42. Johansen P, Richter SR, Balslev-Harder M, Miltoft CB, Tabor A, Duno M, *et al.* Open source non-invasive prenatal testing platform and its performance in a public health laboratory. *Prenat Diagn.* 30 mars 2016;
43. Dheedene A, Sante T, Smet MD, Vanbellinghen J-F, Grisart B, Vergult S, *et al.* Implementation of non-invasive prenatal testing by semiconductor sequencing in a genetic laboratory. *Prenat Diagn.* 13 mai 2016;
44. Iwarsson E, Jacobsson B, Dagerhamn J, Davidson T, Bernabé E, Heibert Arnlind M. Analysis of cell-free fetal DNA in maternal blood for detection of trisomy 21, 18 and 13 in a general pregnant population and in a high risk population - a systematic review and meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* janv 2017 ;96(1):7-18.
45. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* sept 2017;50(3):302-14.
46. Kim SK, Hannum G, Geis J, Tynan J, Hogg G, Zhao C, *et al.* Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenat Diagn.* août 2015;35(8):810-5.
47. Kim M, Kim J-H, Kim K, Kim S. Cost-effective and accurate method of measuring fetal fraction using SNP imputation. *Bioinformatics.* 01 2018;34(7):1086-91.
48. Poon LC, Dumidrascu-Diris D, Francisco C, Fantasia I, Nicolaides KH. IONA test for first-trimester detection of trisomies 21, 18 and 13. *Ultrasound Obstet Gynecol.* févr 2016;47(2):184-7.
49. Papageorgiou AT, Khalil A, Forman M, Hulme R, Mazey R, Mousa HA, *et al.* Clinical evaluation of the IONA test: a non-invasive prenatal screening test for trisomies 21, 18 and 13. *Ultrasound Obstet Gynecol.* févr 2016;47(2):188-93.
50. García-Pérez L, Linertová R, Álvarez-de-la-Rosa M, Bayón JC, Imaz-Iglesia I, Ferrer-

Rodríguez J, *et al.* Cost-effectiveness of cell-free DNA in maternal blood testing for prenatal detection of trisomy 21, 18 and 13: a systematic review. *Eur J Health Econ.* sept 2018;19(7):979-91.

51. Le Bras A, Salomon LJ, Bussièrès L, Malan V, Elie C, Mahallati H, *et al.* Cost-effectiveness of five screening strategies for trisomies and other unbalanced chromosomal abnormalities: a model-based analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 22 avr 2019;

52. Association des cytogénéticiens de langue française. Recommandations de l'ACLF pour le dépistage non invasif des anomalies chromosomiques foetales. [Internet]. Reims; 2015. Disponible sur : [http://www.eacjf.org/docs/recommandation-ACLF\\_DPNI-V1.pdf](http://www.eacjf.org/docs/recommandation-ACLF_DPNI-V1.pdf)

53. Association des cytogénéticiens de langue française. Recommandations pour le dépistage non invasif des anomalies chromosomiques foetales (DPNI) Version 2 - 2015 [Internet]. 2015. Disponible sur : [www.eacjf.org/docs/recommandation-ACLF\\_DPNI-V2.pdf](http://www.eacjf.org/docs/recommandation-ACLF_DPNI-V2.pdf)

54. ACLF. Recommandations pour le dépistage des anomalies chromosomiques foetales par l'étude de l'ADN libre circulant (ADNlc) [Internet]. 2017 Version. Disponible sur : [www.eacjf.org/docs/GBP-ADNlc-V3.pdf](http://www.eacjf.org/docs/GBP-ADNlc-V3.pdf)

55. JORF n°0294 du 20 décembre 2018 texte n° 33 Arrêté du 14 décembre 2018 modifiant l'arrêté du 23 juin 2009 modifié fixant les règles de bonnes pratiques en matière de dépistage et de diagnostic prénatals avec utilisation des marqueurs sériques maternels de trisomie 21 NOR : SSAP1834386A [Internet]. Disponible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2018/12/14/SSAP1834386A/jo/texte>

56. Costa J-M, Letourneau A, Favre R, Bidat L, Belaisch-Allart J, Jouannic J-M, *et al.* Cell-free fetal DNA versus maternal serum screening for trisomy 21 in pregnant women with and without assisted reproduction technology: a prospective interventional study. *Genet Med.* 2018;20(11):1346-53.

57. Seror V, L'Haridon O, Bussièrès L, Malan V, Fries N, Vekemans M, *et al.* Women's

Attitudes Toward Invasive and Noninvasive Testing When Facing a High Risk of Fetal Down Syndrome. *JAMA Netw Open*. 1 mars 2019;2(3):e191062.

58. Borrell A, Grande M, Pauta M, Rodriguez-Revenga L, Figueras F. Chromosomal Microarray Analysis in Fetuses with Growth Restriction and Normal Karyotype: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Fetal Diagn Ther*. 9 sept 2017;

59. An G, Lin Y, Xu LP, Huang HL, Liu SP, Yu YH, *et al*. Application of chromosomal microarray to investigate genetic causes of isolated fetal growth restriction. *Mol Cytogenet*. 2018;11:33.

60. Xue Y, Zhao G, Li H, Zhang Q, Lu J, Yu B, *et al*. Non-invasive prenatal testing to detect chromosome aneuploidies in 57,204 pregnancies. *Mol Cytogenet*. 2019;12:29.

61. Xie M-J, Liang Z-K, He D, Xu W-W, Wu Y-S, Yang X-X, *et al*. Noninvasive Prenatal Testing of Rare Autosomal Aneuploidies by Semiconductor Sequencing. *DNA Cell Biol*. mars 2018;37(3):174-81.

62. Scott F, Bonifacio M, Sandow R, Ellis K, Smet M-E, McLennan A. Rare autosomal trisomies: Important and not so rare. *Prenat Diagn*. Sept 2018;38(10):765-71.

63. Zhang C, Liang B, Qiao L, Xuan L, Li H, He Q, *et al*. Effect quantification and value prediction of factors in noninvasive detection for specific fetal copy number variants by semiconductor sequencing. *Mol Genet Genomic Med*. juill 2019;7(7):e00718.

64. Saba L, Masala M, Capponi V, Marceddu G, Massidda M, Rosatelli MC. Non-invasive prenatal diagnosis of beta-thalassemia by semiconductor sequencing: a feasibility study in the sardinian population. *Eur J Hum Genet*. 2017;25(5):600-7.

65. Hashiloni-Dolev Y, Nov-Klaiman T, Raz A. Pandora's Pregnancy: NIPT, CMA and Genome Sequencing - A New Era for Prenatal Genetic Testing. *Prenat Diagn*. 4 juin 2019 ;

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACLF : Association des Cytogénéticiens de Langue Française

ACPA : Analyse Chromosomique sur Puces à ADN

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNlc : Acide DésoxyriboNucléique libre circulant

ADNlcT21 : Acide DésoxyriboNucléique libre circulant de la trisomie 21

ARN : Acide RiboNucléique

BAC : Chromosome artificiel de bactérie

CGH-array : Comparative Genomic Hybridization – array

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CNGOF : Collège National des Gynéco-Obstétriciens Français

CNP: Copy Number Polymorphisms

CNV : Copy Number Variation

CPDPN : Centres Pluridisciplinaires de Diagnostic PréNatal

DANSR : Digital Analysis of Selected Regions

DPN : Diagnostic PréNatal

DPNI : Dépistage Prénatal Non Invasif

FF : fraction foetale

FGR : Fetal Growth Restriction

FISH : technique d'hybridation *in situ* en fluorescence

HAS : Haute Autorité de Santé

hCG  $\beta$  : hormone chorionique gonadotrope  $\beta$

IMG : Interruption Médicale de Grossesse

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

Kb: Kilobases

m-FISH : technique d'hybridation *in situ* en fluorescence multicolore

MAF : Maximum Allele Frequency

Mb : mégabase

MPS : Séquençage Massif en Parallèle

MRGM : Maladies Rares : Génétique et Métabolisme

NGS : Séquençage Nouvelle Génération, Next Generation Sequencing

PAG : Petit Poids pour l'Âge Gestationnel

PAPP-A : Pregnancy-Associated Plasma Protein-A

PCR : Polymerase Chain Reaction

PGM : Personal genome Machine

RAT : trisomies rares autosomales

RCIU : Retard de Croissance Intra-Utérin

RPC : Recommandations pour la Pratique Clinique

RT-PCR : Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction

SA : Semaines d'Aménorrhée

SGA: Small for Gestational Age

SKY : spectral karyotyping

SNP : Single Nucleotide Polymorphisms

SNP-array : Single Nucleotide Polymorphism - array

STR: Short Tandem Repeat

STR: Short Tandem Repeat

TDM : TomoDensitoMétrie

T13 : Trisomie 13

T18 : Trisomie 18



T21 : Trisomie 21

VOUS : Variant Of Unknown Significance

# LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

- **Liste des Figures :**

<i>Figure 1</i> : Image de caryotype .....	17
<i>Figure 2</i> : FISH (technique d'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence).....	20
<i>Figure 3</i> : Schéma d'une expérience d'hybridation génomique comparative sur puce à ADN.....	22
<i>Figure 4</i> : Répartition des Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) que nous avons utilisés.	37
<i>Figure 5</i> : exemple de SNP .....	37
<i>Figure 6</i> : Test des différents SNPs.....	39
<i>Figure 7</i> : Répartition des Short Tandem Repeat (STR) que nous avons utilisés.....	40
<i>Figure 8</i> : Exemple de Short Tandem Repeat (STR) multi-alléliques.....	40
<i>Figure 9</i> : Exemple de résultats chez une femme non enceinte.....	41
<i>Figure 10</i> : Exemple de résultats couple homme + femme enceinte.....	42
<i>Figure 11</i> : Corrélation taille de reads – Fraction Fœtale.....	43

- **Liste des Tableaux :**

<i>Tableau 1</i> : Résultats attendus avec fraction fœtale à 10%.....	38
---	----