

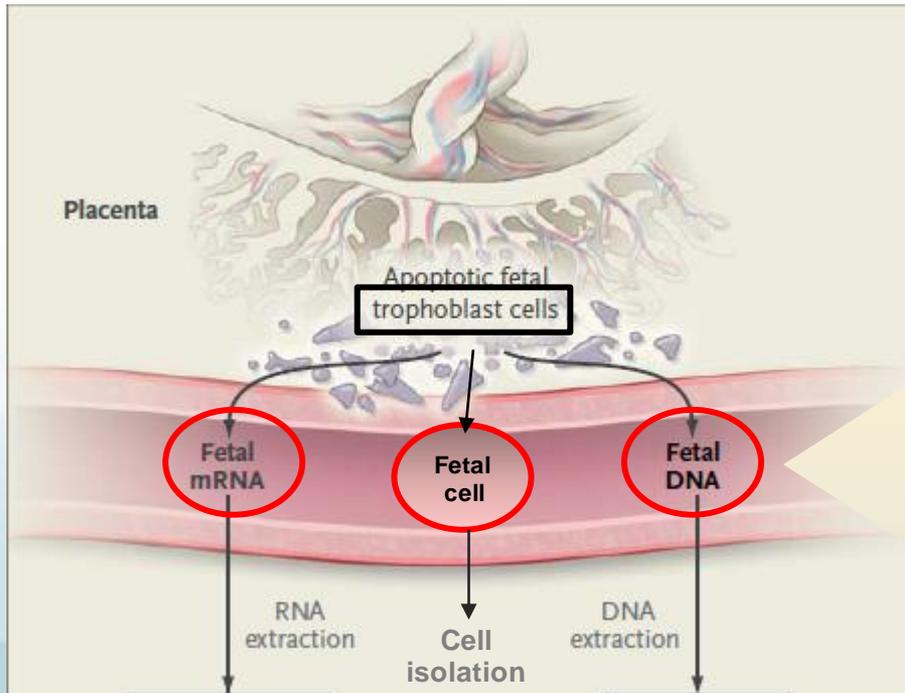
# ANALYSE DE L'ADN FOËTAL DANS LE SANG MATERNEL: APPLICATION A LA TRISOMIE 21

JM Costa

5èmes Journées de Biologie Praticienne  
Mazagan, 4-5 Avril 2014



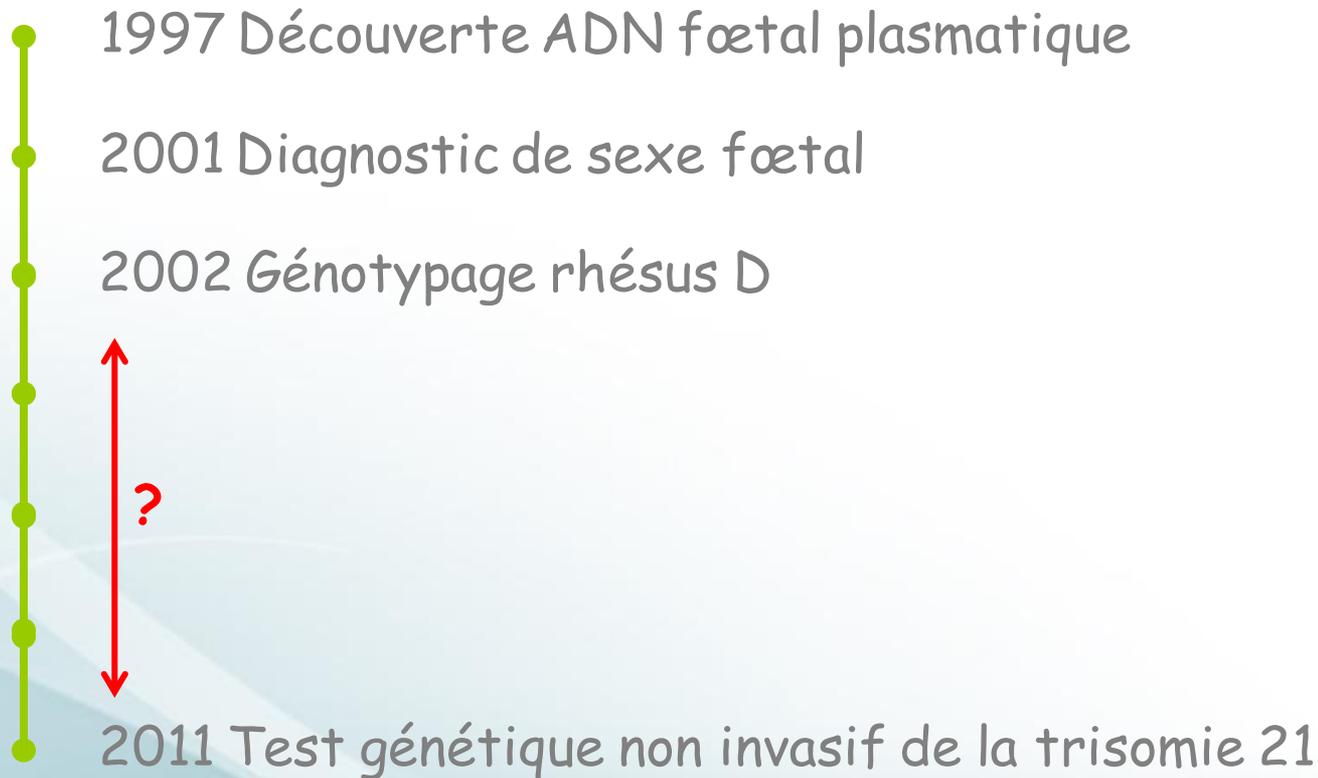
# DIAGNOSTIC PRÉNATAL NON INVASIF: LE SANG MATERNEL



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

# DIAGNOSTIC PRÉNATAL NON INVASIF

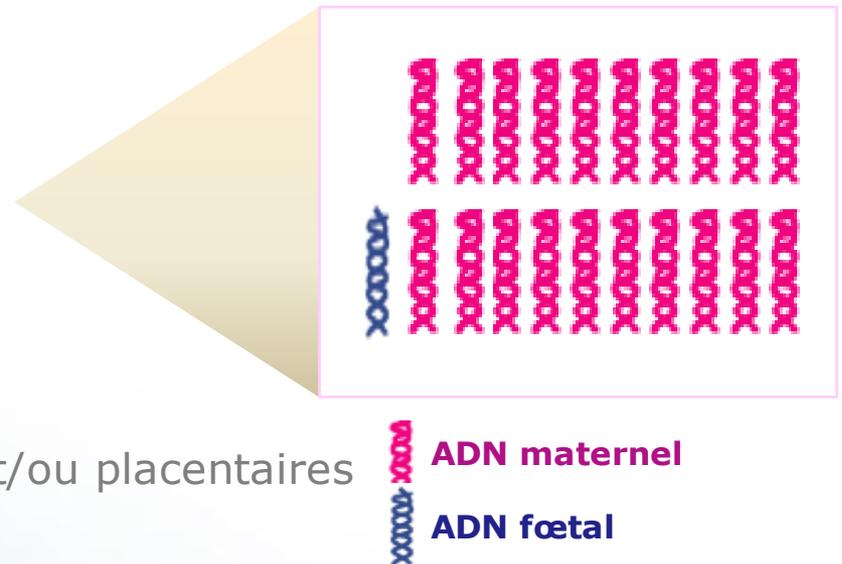
## ADN foetal libre plasmatique



# ADN FOËTAL CIRCULANT

## ► Les difficultés

- Quantité faible
  - ✓ 1<sup>er</sup> trimestre: 20-30 Geq/ml
- Fraction foétale: 5-10%
  - ✓ Age gestationnel
  - ✓ Indice de masse corporel
  - ✓ Anomalies chromosomiques et/ou placentaires
  - ✓ Ethnie?
- Ne peut pas être isolé



# ANALYSE DE L'ADN FOËTAL CIRCULANT: LE « BACKGROUND » ADN MATERNEL



## Analyse qualitative

(Recherche de marqueurs foetaux absents du génome maternel )

Détermination du sexe foetal

Génotypage RHD, Ce et Kell

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

## Analyse quantitative

(Marqueurs foetaux spécifiques ou non)

Aneuploïdies

# DIAGNOSTIC NON INVASIF DE LA TRISOMIE 21 FOËTALE: ADN FOËTAL CIRCULANT

- ▶ Les différentes approches
  - Quantification de marqueurs foëtaux spécifiques
    - ✓ Marqueurs épigénétiques (ADN foëtal hypo ou hyperméthylé)
  - Approche quantitative non spécifique

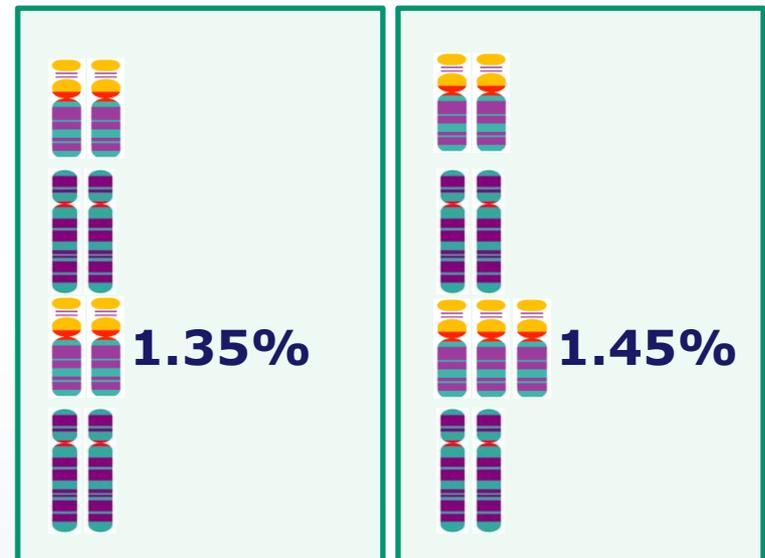
# ANALYSE QUANTITATIVE NON SPÉCIFIQUE

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



**90%** Maternel 21  
Maternel autres

**10%** Fœtal 21  
Fœtal autres



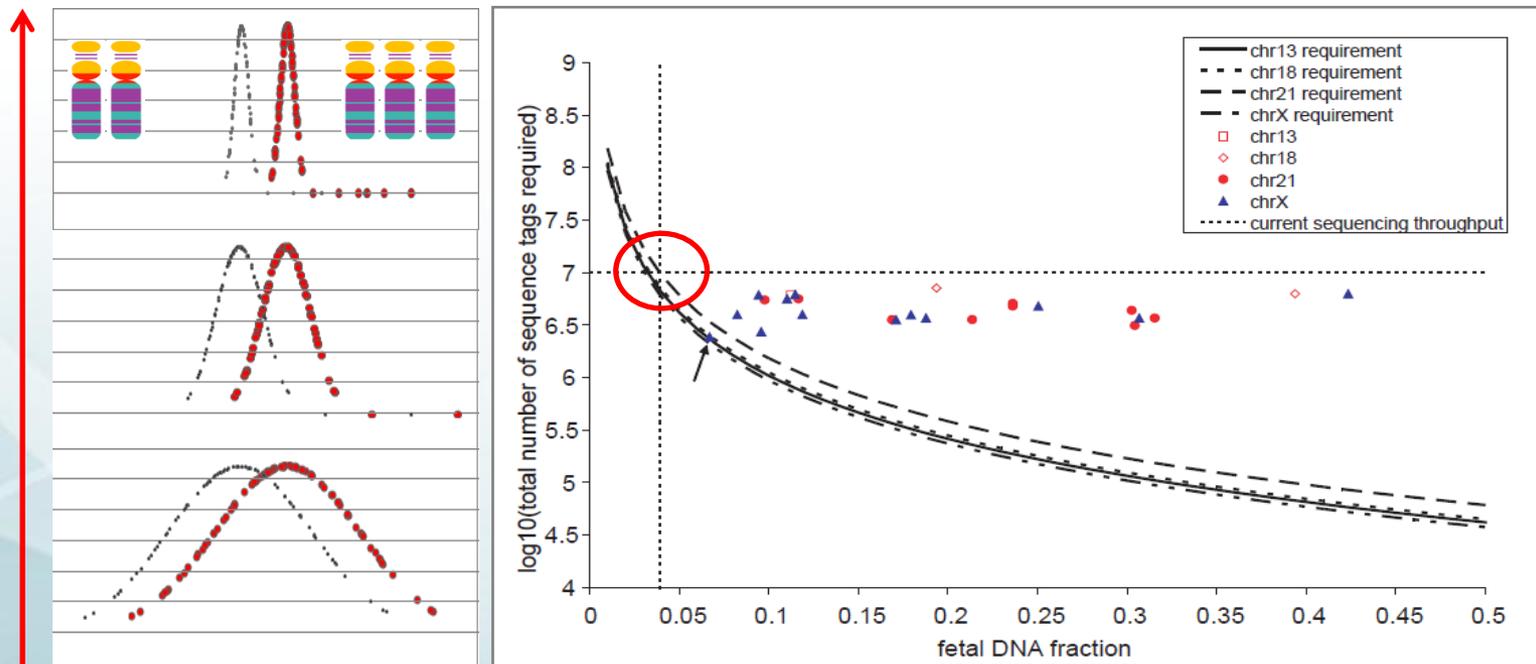
Fœtus  
euploïde

Fœtus porteur  
d'une trisomie  
21

# ANALYSE QUANTITATIVE NON SPÉCIFIQUE

## ► Concept

- Mesure de fraction chromosomique
- Comparaison statistique par rapport à une valeur attendue



# DOSAGE CHROMOSOMIQUE FOËTAL

- Quantification par « massively parallel sequencing (MPS) »

Genetic Analyzer  
Solexa (Illumina)



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

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

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

18 patientes

(terme médian: 18 semaines)

Tous les cas (9) correctement identifiés

SOLID sequencing  
(Applied Biosystems)



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

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

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

14 patientes

(terme médian: 14 semaines)

Tous les cas (9) correctement identifiés

# SEQUENÇAGE A HAUT DÉBIT: UNE RUPTURE TECHNOLOGIQUE

Par run	Séquençage SANGER	Séquençage NGS Petit débit	Séquençage NGS Haut débit	Ratio
Instrument	ABI3130XL	Illimuna MiSeq	Illimuna 1500	
Taille des fragments	500bp	27bp	27bp	
Durée	6h	5h	34h	
Nombre de reads	96	25 millions (single reads 36bp)	1.5 milliards (single reads 27bp)	
<b>Capacité</b>	<b>50KB (50 10+3)</b>	<b>15GB (15 10+9)</b>	<b>300GB (300 10+9)</b>	<b>X 300</b> <b>X 6.000.000</b>



AUDI A1 105CH



ARIANE 5 21.500CH

Génome humain 3GB  
Exome humain 30MB

# DOSAGE CHROMOSOMIQUE FOËTAL PAR MPS



Phase pré-analytique

1

Séquençage

2

Analyse bio-informatique

3



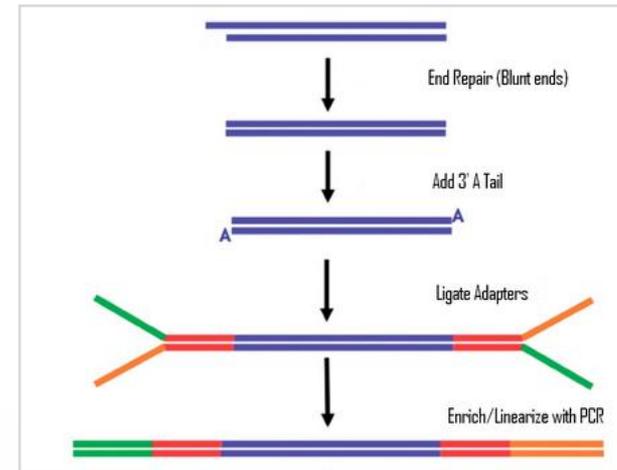
# DOSAGE CHROMOSOMIQUE FŒTAL PAR MPS

2



## Séquençage (part 1)

- Préparation de la « librairie »
- Réparation des extrémités
  - Adénylation des extrémités
  - Ligation des adaptateurs (+index)
- Enrichissement de la « librairie »



- ✓ Préparer les fragments d'ADN à être séquencés

← Calendar ×		23	24	25	26	27
		lundi	mardi	mercredi	jeudi	vendredi
			J1			

# DOSAGE CHROMOSOMIQUE FOËTAL PAR MPS

2



## Séquençage (part 2)

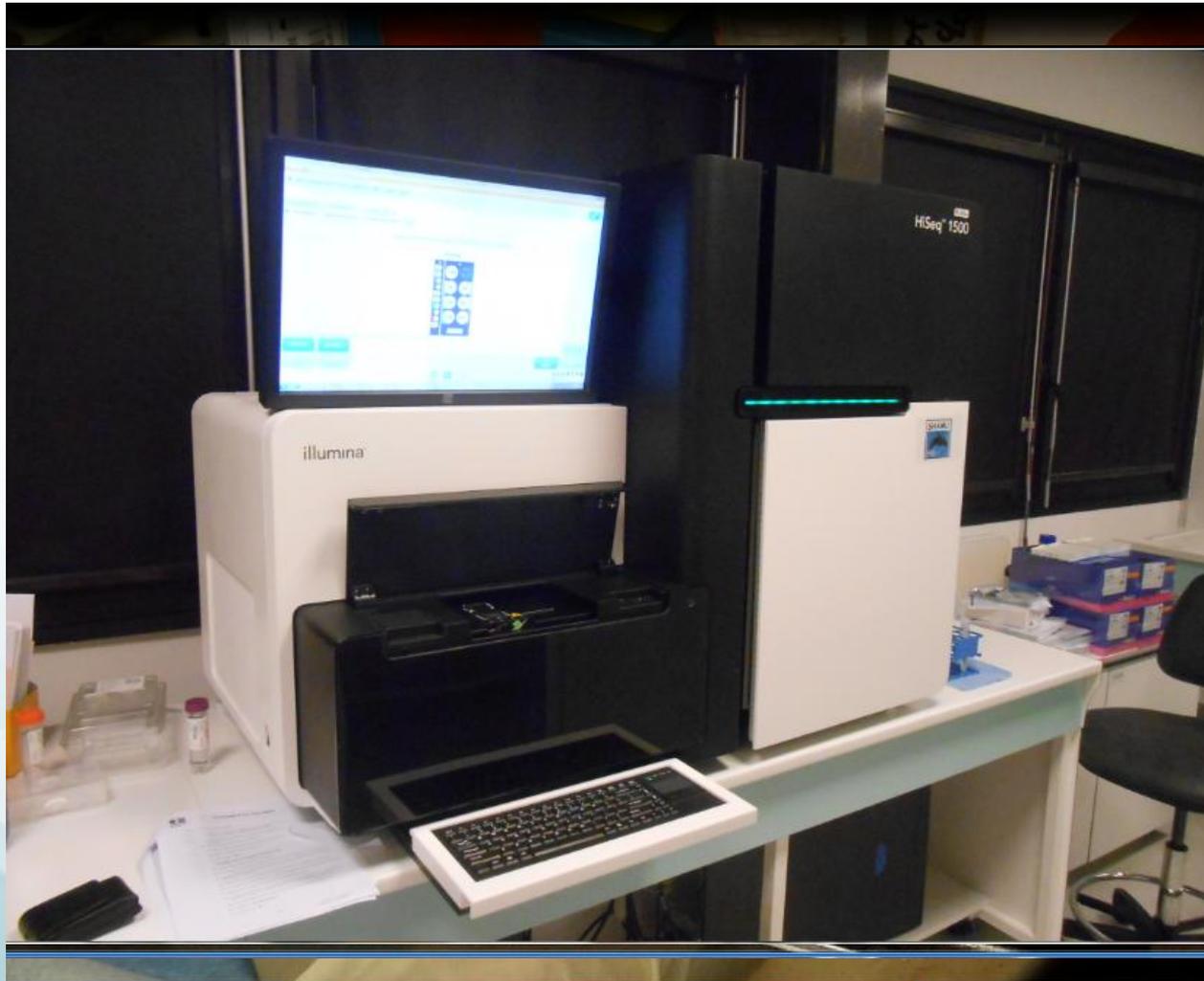
Qualification de la  
« librairie »  
Quantification de la  
« librairie »  
Normalisation de la  
« librairie »  
Multiplexage  
Hybridation sur flow cell  
Clusterisation



- ✓ Traiter un grand nombre d'échantillons
- ✓ Transférer sur le support final de séquence

← Calendar ×									
23	lundi	24	mardi	25	mercredi	26	jeudi	27	vendredi
				J2					

← Calendar ×						
23	lundi	24	mardi	25	mercredi	
				26	jeudi	
					27	vendredi
						J5



# DOSAGE CHROMOSOMIQUE FOËTAL PAR MPS

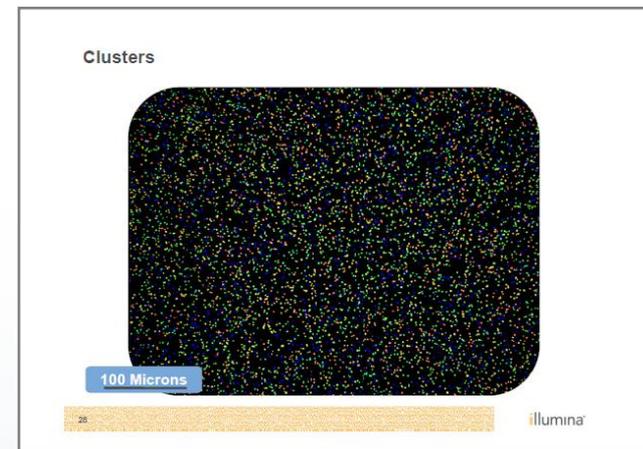
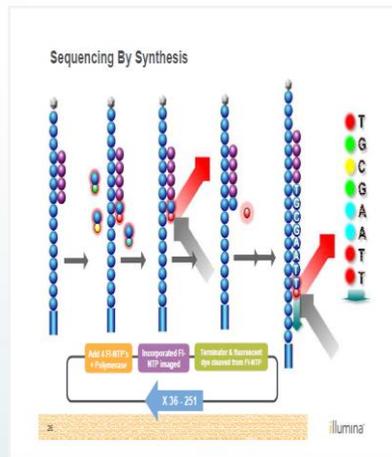
2



## Séquençage (part 3)

Séquençage...

- > 10 millions de cluster par ligne (X8 par flow cell)
- 300GB

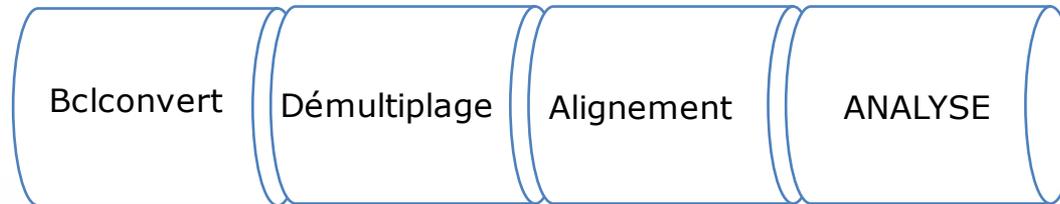


← Calendar ×									
23	lundi	24	mardi	25	mercredi	26	jeudi	27	vendredi
					J2			J5	

# ANALYSE DES DONNÉES

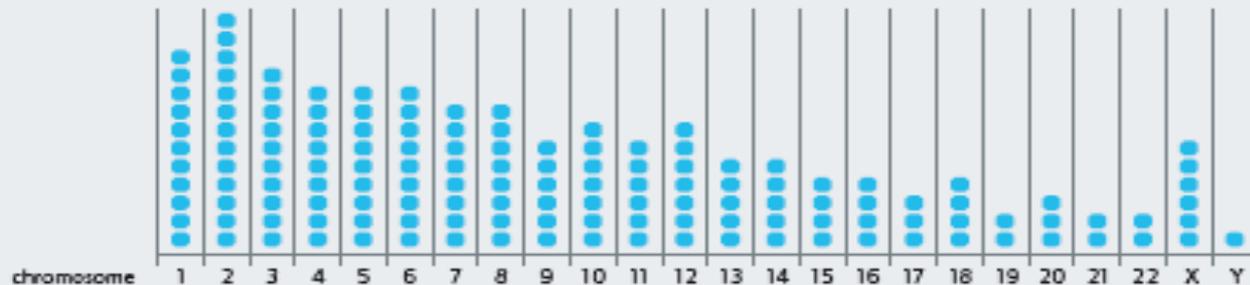
Sequencing Result

Pipeline informatique  
Environnement HPC sous Rocks Cluster  
Processeurs 96 coeurs



TCCGCCAGGCCATGAGGGG CCTGGAAATGGCTGAT  
x9 10+6/échantillon

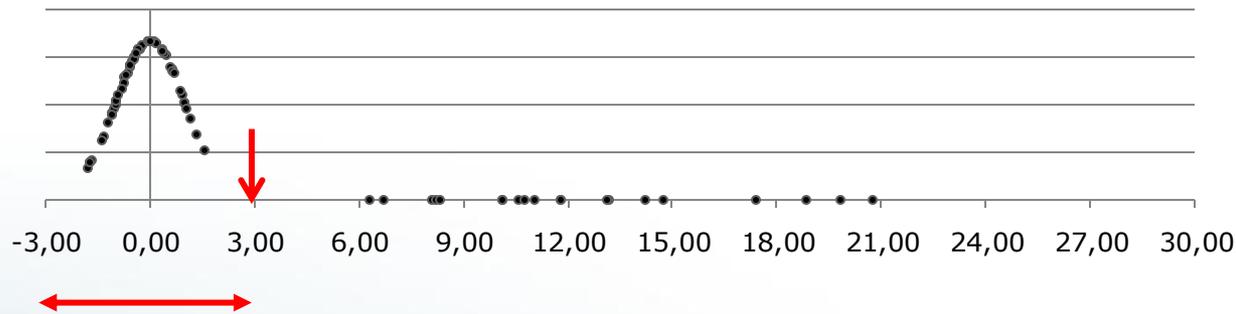
Calcul de la fraction chromosomique  
=%21 de l'échantillon par rapport au total des chromosomes



# DOSAGE CHROMOSOMIQUE FOËTAL PAR MPS

## Calcul du Z-score

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



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

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

Z-score >3 signe la sur-représentation chromosomique

# VALIDATION ET ÉVALUATION DU TEST

## ► Etude « pré-clinique » SHREK (training): modalités

- ✓ Etude non interventionnelle, multicentrique

### **Pr Alexandra Benachi**

Pr Marie-Victoire Sénat  
Dr Evelyne Gautier  
Dr Laurence Lohmann  
Pr Jean-Marie Jouannic

### **Hôpital Antoine Bécère**

Hôpital Bicêtre  
Hôpital Américain de Paris  
Hôpital Américain de Paris  
Hôpital Armand-Trousseau

### **Clamart**

Le Kremlin-Bicêtre  
Neuilly-sur-Seine  
Neuilly-sur-Seine  
Paris

- ✓ Population mixte: caryotype fœtal connu + patientes à risque devant subir un geste invasif
  - Clarté nucale élevée
  - Signe d'appel échographique autre que nuque
  - Marqueurs sériques > 1/250
  - Antécédent personnel ou pour le couple d'anomalie chromosomique
  - Age maternel
- ✓ Echantillon sanguin prélevé soit a priori, soit en post-caryotype
  - Age médian 37 ans (range 23-50)
  - Terme médian 13SA (range 11-31)

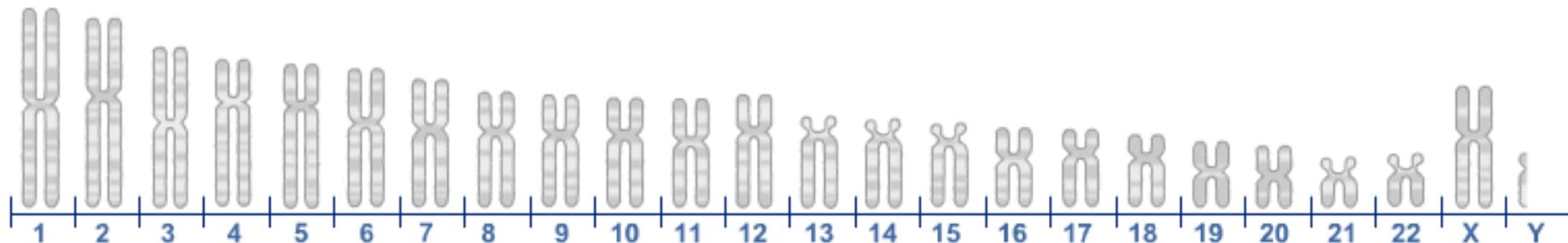
# VALIDATION ET ÉVALUATION DU TEST CERBA

- ▶ Etude « pré-clinique » SHREK: résultats de la comparaison test Cerba vs caryotype foetal (gold standard)
  - ✓ Données brutes globales: 356 tests réalisés chez 193 patientes
  - ✓ Mise en contrôle: 18 (soit 5%) > délai technique 5 jours pour 95% des patientes

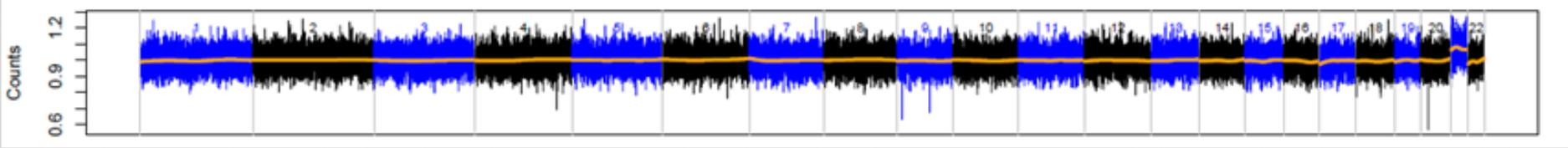
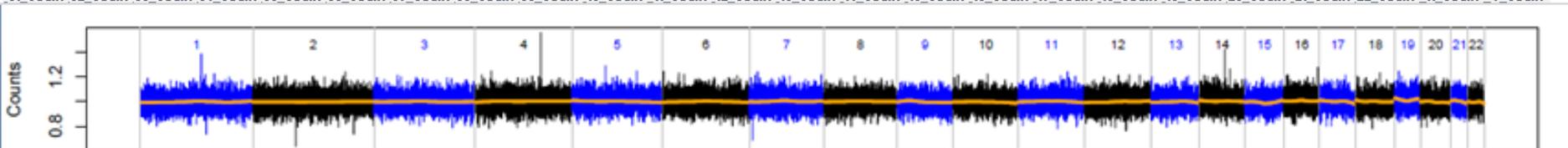
Résultat du test CERBA	Résultat caryotype		Total
	47,XX+21 ou 47,XY+21	N ou Autre	
Positif	74	0	74
Négatif	0	282	282
Total	<b>74</b>	<b>282</b>	356

Sensibilité	100,00%
Spécificité	100,00%

# AVANTAGE DE L'APPROCHE « WHOLE GENOME »



01\_count 02\_count 03\_count 04\_count 05\_count 06\_count 07\_count 08\_count 09\_count 10\_count 11\_count 12\_count 13\_count 14\_count 15\_count 16\_count 17\_count 18\_count 19\_count 20\_count 21\_count 22\_count X\_count Y\_count



4194,4159	4506,866	3783,126	3600,3307	3377,8588	3220,3097	2771,0355	2730,0485	2081,6669	2426,865	2459,7469	2486,0424	1794,0214	1681,7771	1438,9219	1342,4747	1342,0588	1441,3208	946,2113	1147,3633	632,10594	591,93229	2365,9473	12,050197
4176,343	4504,6223	3786,8562	3596,8419	3391,2704	3220,5983	2768,0277	2738,1777	2080,391	2420,144	2470,8889	2488,2229	1801,2512	1680,0282	1439,6493	1341,3385	1345,6847	1441,8445	947,42696	1147,3564	633,15784	591,2784	2382,7438	11,982279
4196,6734	4515,5657	3795,1211	3601,8309	3375,0009	3225,7398	2767,1469	2732,9763	2080,2052	2425,2622	2465,7693	2496,6118	1799,8325	1678,5888	1449,6664	1332,544	1341,9504	1441,968	929,63036	1138,7613	631,15336	592,0013	2354,9509	12,55119
4186,7172	4498,6277	3794,8733	3601,5049	3378,8459	3221,297	2768,3732	2734,6466	2078,6038	2421,2818	2463,1755	2491,7805	1797,4538	1680,249	1438,5486	1339,0128	1342,264	1441,47	943,53296	1146,7371	634,49241	592,01201	2400,2097	10,873702
4183,7402	4507,166	37918	3590,0915	3377,5194	3215,213	2764,0939	2734,9155	2087,2751	2425,7443	2473,3502	2491,6824	1806,571	1676,8766	1442,3488	1340,6485	1340,4077	1441,611	939,49082	1147,622	628,97362	592,86011	2387,7445	10,971188
4178,4869	4495,5943	3789,3125	3602,8746	3383,1324	3224,9068	2779,017	2724,6439	2078,2469	2420,8627	2460,0652	2498,0653	1800,4603	1677,6597	1438,6295	1347,2309	1343,6293	1441,8412	954,38388	1142,5849	633,09518	590,77639	2344,4793	10,441534
4205,4029	4515,3319	3788,5059	3595,6189	3368,7108	3224,8915	2759,5775	2731,6969	2083,8554	2436,5235	2464,8226	2488,3931	1801,8874	1680,6165	1449,4994	1335,3873	1344,8466	1442,148	926,71761	1146,5512	629,62401	594,89122	2316,3517	28,629573
4169,097	4494,1414	3790,188	3596,7013	3377,3491	3217,7899	2762,0363	2735,2797	2082,3475	2421,0393	2466,244	2487,4973	1853,4611	1685,8414	1443,6173	1344,8341	1336,6824	1442,1696	942,39672	1147,36	630,11433	589,45916	2315,434	25,528579
4178,6773	4504,9484	3789,4702	3600,4542	3378,6763	3222,1122	2769,8941	2734,7311	2077,7671	2419,9311	2467,5132	2491,3274	1803,1346	1680,7621	1438,0449	1346,0731	1339,5063	1442,0123	953,56754	1146,6874	629,7871	588,92401	2318,378	40,817609
4182,1852	4511,9164	3786,3108	3603,2594	3383,5771	3227,8428	2765,902	2730,4365	2086,4305	2422,2524	2470,9529	2494,1861	1803,6624	1677,5536	1441,2415	1340,777	1335,1629	1442,2698	937,3522	1142,79	632,02869	591,90976	2281,1684	48,404751
4189,4483	4507,6651	3786,2334	3587,5286	3374,9695	3220,0397	2763,8596	2726,7435	2084,3365	2429,6626	2474,8728	2492,4879	1801,2549	1681,4562	1452,8078	1339,3828	1347,781	1442,5974	935,10652	1146,9071	635,79092	594,07179	2336,1397	33,312076
4210,1043	4510,9074	3801,6984	3587,351	3378,3337	3233,6015	2763,8702	2725,2745	2076,2259	2431,1108	2474,498	2491,4879	1796,8007	1672,5606	1449,2042	1334,5362	1343,6072	1442,8366	923,5415	1146,9644	630,88579	592,29919	2293,4003	37,750391
4183,2145	4503,1448	3782,9053	3599,362	3380,1385	3224,7845	2768,2216	2732,4861	2085,9626	2423,4475	2470,9962	2492,8073	1798,5657	1683,727	1444,2773	1346,5973	1334,2686	1442,6885	943,71955	1148,2076	630,92591	591,05163	2386,4381	10,289981
4180,4054	4499,1941	3792,5183	3604,4536	3387,744	3219,337	2771,3713	2739,8963	2086,0788	2419,0918	2476,1633	2488,7776	1794,788	1678,7519	1440,4034	1347,2373	1335,7298	1442,3485	944,5896	1148,5902	631,06537	590,86437	2280,2755	55,498566
4177,7488	4496,8942	3835,7415	3592,3619	3378,1965	3216,7447	2767,0913	2727,7538	2074,5806	2418,5198	2461,3657	2495,6799	1795,102	1676,415	1442,6213	1345,4248	1342,334	1442,545	949,06283	1147,1872	630,27187	591,85737	2243,555	57,759486
4186,6404	4504,6151	3791,6311	3595,3352	3382,4868	3222,0196	2767,86	2738,2168	2081,3355	2419,9112	2478,5676	2491,6027	1801,0502	1675,0452	1437,8788	1342,0522	1335,8575	1442,6504	940,03827	1149,8471	630,87204	589,43856	2273,9129	52,616836
4194,8367	4506,8311	3785,8689	3589,2252	3371,0358	3222,2451	2765,04	2727,8365	2086,4121	2429,7474	2456,5221	2494,8688	1799,3333	1681,9314	1447,7629	1337,4315	1350,8886	1442,5822	942,77431	1147,1905	635,42355	596,71208	2259,9203	41,248418
4185,5489	4509,0526	3788,3381	3600,2728	3375,2915	3230,6091	2764,3713	2731,9489	2077,8123	2422,3391	2467,9344	2494,3303	1799,7498	1681,6173	1444,3262	1340,5098	1342,3603	1442,8025	939,58926	1144,8209	633,55104	591,72361	2082,6821	106,12946
4190,1753	4503,4269	3780,5105	3591,0211	3381,5919	3221,5102	2771,0863	2720,2274	2082,806	2424,0265	2468,7646	2484,526	1801,0003	1681,6183	1446,9747	1349,8671	1342,5339	1442,8245	949,38125	1142,3876	634,20334	594,73614	2296,2657	32,205966
4185,7616	4511,4074	3792,8951	3607,3508	3387,1126	3219,8718	2767,0779	2728,7298	2075,4509	2418,1352	2461,9624	2490,6587	1802,532	1681,2551	1442,04	1343,3669	1339,3449	1443,1541	948,01442	1145,3526	631,06333	590,96261	2395,5539	12,374174

# VALIDATION ET ÉVALUATION DU TEST CERBA

- ▶ Etude « pré-clinique » SHREK: résultats de la comparaison test Cerba vs caryotype foetal (gold standard)
  - ✓ Données brutes globales: 356 tests réalisés chez 193 patientes
  - ✓ Mise en contrôle: 18 (soit 5%) > délai technique 5 jours pour 95% des patientes

Résultat du test CERBA	Résultat caryotype		Total
	47,XX+21 ou 47,XY+21	N ou Autre	
Positif	74	0	74
Négatif	0	282	282
Total	74	282	356

Sensibilité	100,00%
Spécificité	100,00%

Résultat du test CERBA	Résultat caryotype		Total
	47,XX+18 ou 47,XY+18	N ou Autre	
Positif	10	0	10
Négatif	0	346	346
Total	10	346	356

Sensibilité	100,00%
Spécificité	100,00%

Résultat du test CERBA	Résultat caryotype		Total
	47,XX+13 ou 47,XY+13	N ou Autre	
Positif	9	0	9
Négatif	0	347	347
Total	9	347	356

Sensibilité	100,00%
Spécificité	100,00%

# VALIDATION ET ÉVALUATION DU TEST CERBA

## ► Conclusion : résultats en accord avec toutes les données internationales\*

L'ADN foetal circulant est le meilleur bio-marqueur actuel de la trisomie 21 foetale et autres aneuploïdies:

- ✓ Performance élevée:
  - Trisomie 21: sensibilité 99,1-100% et spécificité 99,7-100%
  - Trisomie 18: sensibilité 97,2-100% et spécificité 99,7-100%
  - Trisomie 13: sensibilité 78,6-91,7% et spécificité 99,1-100%
- ✓ Une seule molécule à doser
- ✓ Depuis 10SA jusqu'au terme

\* Sequencing-Based Tests to Determine Fetal Down Syndrome (Trisomy 21) from Maternal Plasma DNA. TEC Assessment Program Volume 27, No. 10 April 2013.

# SITUATION INTERNATIONALE ACTUELLE

## ► Les laboratoires proposant le test



- 📍 Ariosa Diagnostics Inc (1)
- 📍 BGI Health (1)
- 📍 Laboratoire Cerba (1)
- 📍 Lifecodexx AG (1)
- 📍 Medisupport SA (1)
- 📍 Natera, Inc. (1)
- 📍 Sequenom Inc (1)
- 📍 Verinata Health Inc (1)

+1: University Leuven. Belgique

+1: University College London Hospitals, NHS. Grande-Bretagne

+1: University Nijmegen, Hollande

# QUEL IMPACT SUR LA PRISE EN CHARGE DES PATIENTES?

- ▶ A quelles patientes ce test est-il destiné?
  - ✓ A toutes les femmes enceintes en remplacement des marqueurs sériques?
  - ✓ Aux patientes à risque élevé en remplacement de l'amniocentèse?
  
- ▶ Dans quelles circonstances?
  - ✓ En présence d'une hyperclarté nucale ou d'un signe d'appel échographique?

15h45 - 15h45 Infection à *Helicobacter pylori*. Point de vue du Gastroentérologue  
N. Kanouni - Rabat

15h45 - 16h15 *Helicobacter Pylori*: Place des examens biologiques dans le dépistage, le diagnostic et la surveillance thérapeutique  
F. Megraud - Bordeaux

16h15 - 16h15 Discussion

— Pause café —

17h10 - 18h30

**Atelier Auto-immunité / GIGALAB**  
Cas cliniques de maladies auto-immunes et du système  
H. El Kabli - Casablanca

**Atelier Cerba :**  
Apports et implications pratiques des nouvelles technologies de séquençage pour les laboratoires marocains : l'exemple du test génétique prénatal non invasif de la trisomie 21 et autres aneuploïdies  
J.M. Costa Cerba - Paris

18h30 - 20h00 Assemblée Générale de l'AMBM

### COMITÉ SCIENTIFIQUE

Pr. A. Adlouni	Dr. Y. Idrissi El Kaitouni
Dr. M. Benazzouz	Pr. J. Ingrand
Pr. M. Benbachir	Dr. M. Kadiri
Pr. Y. El Jahiri	Pr. L. Lahlou Amine
Pr. M. Essakalli	Dr. A. Loudghiri
Dr. Jc. Gnassia	Dr. H. Ouazzani Touhami

### MEMBRES DU BUREAU

Vice-président : AZEDOUG Abdelah  
Secrétaire général : OUJAZZANI TOUHAMI Hicham  
Secrétaire adjoint : KARIM Amal  
Trésorier : KADIRI Mohamed  
Trésorier adjoint : LOUDGHIRI Abdellatif  
Asseur : EL HAJJAJI Mohamed  
Asseur : BENBOUZID Abdelkrim  
Asseur : EL JAHIRI Younes  
Asseur : DAOUD Salah Eddine  
Asseur : ABDELLATIFI Mohamed  
Asseur : IDRISSE KAITOUNI Youssef  
Asseur : BENAZZOUC Mohamed

10 Ans



2004 / 2014

èmes

10 Ans  
2004 / 2014



## Journées Nationales de Biologie Praticienne

La biologie médicale :  
un atout pour  
la médecine préventive



MAZAGAN

4-5 Avril 2014

Programme scientifique



KEEP  
CALM  
AND  
WAIT  
FOR THE  
DOCTOR