



Principe du génotypage foetal érythrocytaire non invasif : état des lieux des techniques utilisées

Nelly Da Silva

Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale (CNRHP)

Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien – AP-HP - Paris

**2^{ème} Journée « Yves Brossard »
d'hémobiologie foetale et néonatale**

Jeudi 11 janvier 2018
Auditorium – Hôtel de Ville de Paris

ADN fœtal circulant dans le sang maternel -caractéristiques-

découvert en 1997 par Lo YM et al., Lancet, 350: 485-7

1-ADN circulant maternel et fœtal augmentent avec l'âge gestationnel

→11 fois plus d'ADN fœtal entre l'âge précoce (11-17 SA) et l'âge tardif (37-43 SA)

Age gestationnel	11-17 SA	37-43 SA
Quantité d'ADN fœtal (copie/ml de plasma)	25.4	300

2-Même quantité d'ADN circulant fœtal entre Sérum et Plasma

Quantité d'ADN maternel 14.5 fois plus élevé dans le sérum que dans plasma

	Plasma	Sérum
% d'ADN fœtal entre 11-17 SA	3.4%	0.13%
% d'ADN fœtal entre 37-43 SA	6.2%	1%

3-La fraction fœtal est influencée par

- le poids de la mère (plus le poids est élevé, plus la fraction est basse)
- l'origine ethnique (fraction plus basse chez les afro-caribéens que chez les caucasiens)
- le tabagisme (fraction fœtal plus basse chez les fumeuses)

4-ADN fœtal mis en évidence à partir de 7 SA

5-ADN circulant fœtal se dégrade très vite après l'accouchement, absent après 48h (1/2 vie de 16.3 min)

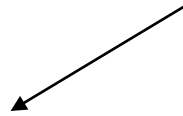
6-ADN circulant fœtal est plus petit que l'ADN circulant maternel (100-200pb versus 100-800pb)

Le génotypage fœtal érythrocytaire non invasif principe = déterminer les séquences fœtales dans le plasma maternel

Extrait d'ADN de plasma/sérum maternel
(pool d'ADN circulant maternel et fœtal)



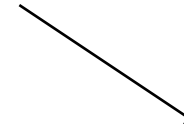
Identification
des séquences érythrocytaires
présentes chez le fœtus et
absentes chez la mère



Présence des séquences
FOETUS POSITIF



Risque d'allo-immunisation
Risque d'incompatibilité fœto-maternel



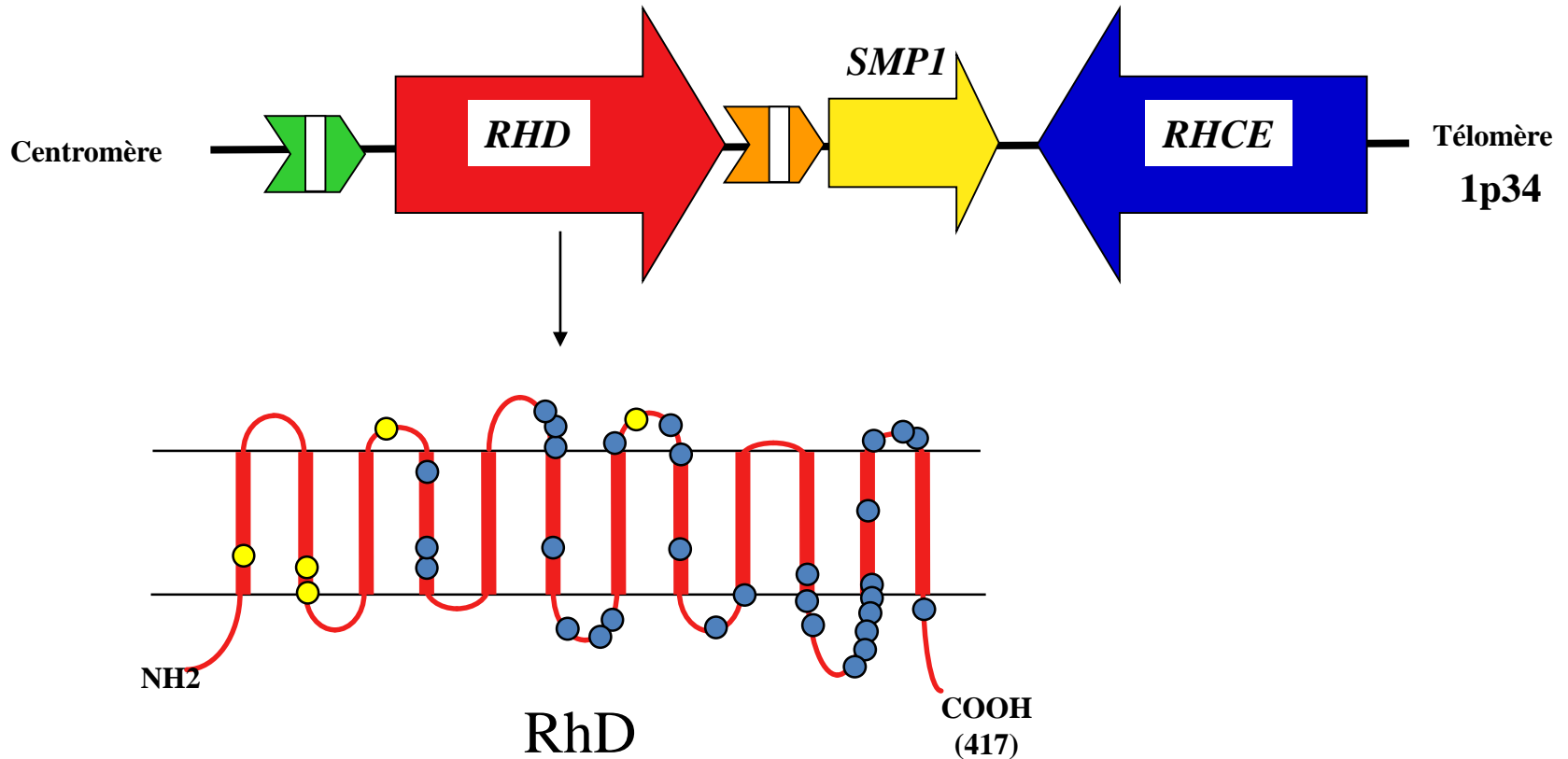
Absence des séquences
FOETUS NEGATIF
(diagnostique par défaut)



Absence de risque d'allo-immunisation
Compatibilité fœto-maternel

**Le génotypage foetal érythrocytaire non
invasif :
les séquences érythrocytaires recherchées**

Les séquences fœtales recherchées pour le génotypage fœtal érythrocytaire non invasif -RH1 : gène *RHD*-

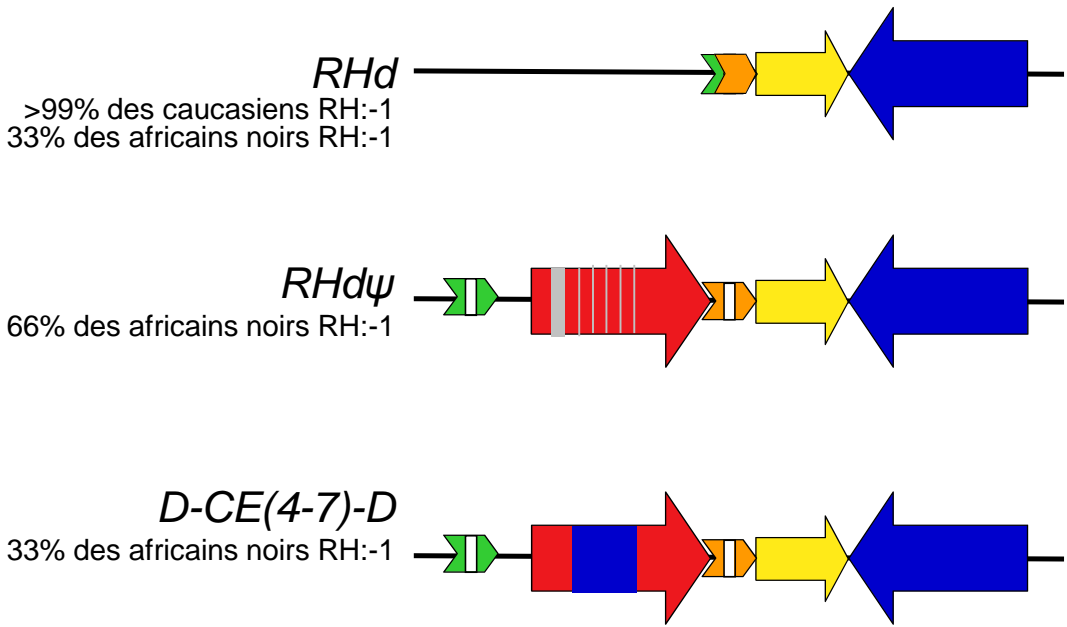


Antigène RhD : mosaïque d'épitopes présent sur toute la molécule
→ les séquences *RHD* fœtales à rechercher sont presque toutes les séquences *RHD* codantes

Les séquences fœtales recherchées pour le génotypage fœtal érythrocytaire non invasif

-RH1 : gène *RHD*-

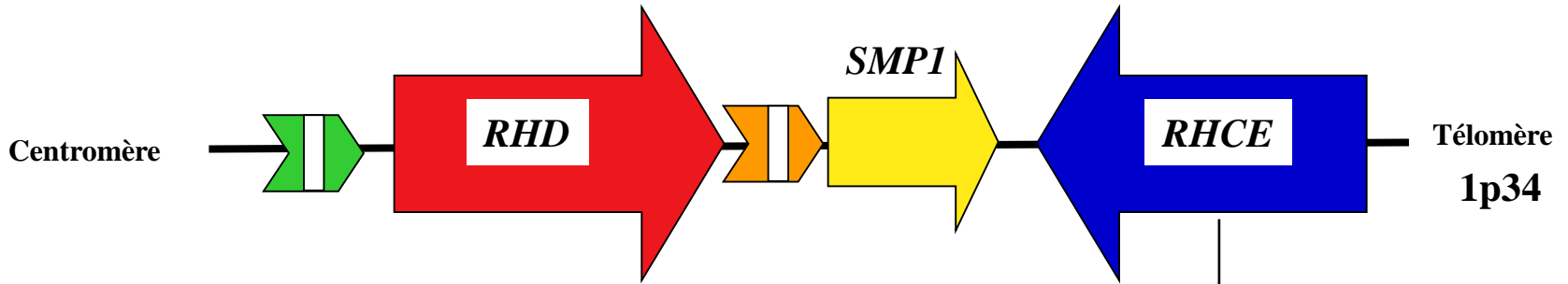
RH:-1 maternel



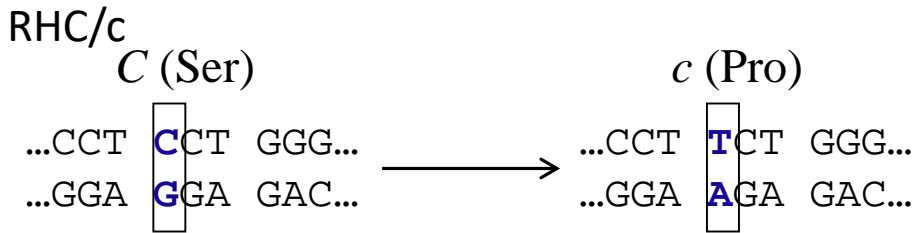
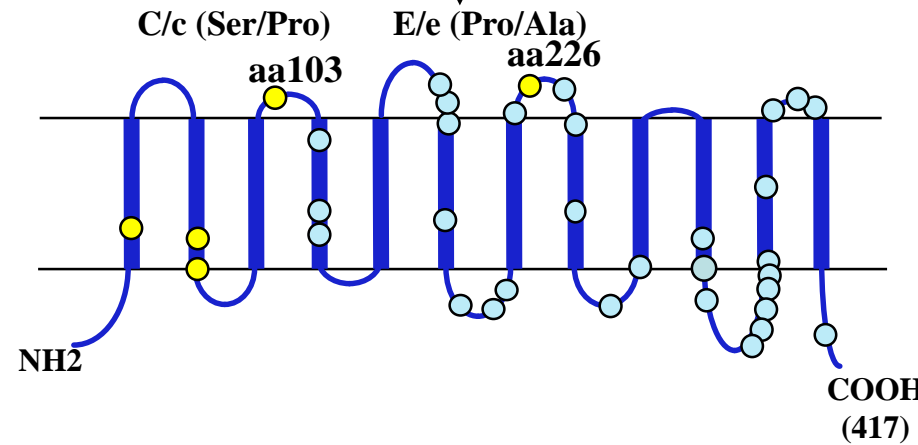
Base moléculaire
Absence du gène <i>RHD</i>
Présence de séquence <i>RHD</i> non fonctionnelle
Absence des séquences <i>RHD</i> codant les épitopes

Les séquences fœtales recherchées pour le génotypage fœtal érythrocytaire non invasif

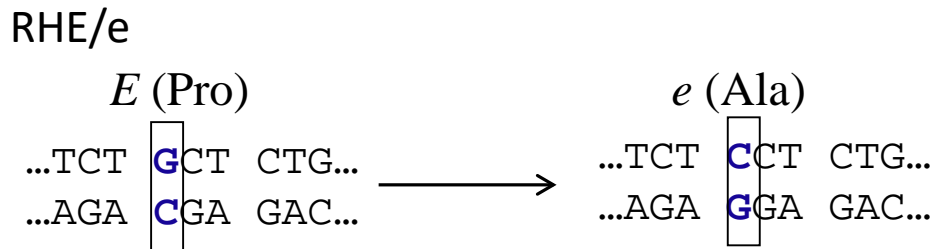
-RH2;3;4;5 : mutations ponctuelles dans *RHCE*-



•*RHCE* code pour 4 allèles majeurs *RHce*, *RHcE*, *RHCe* et *RHCE*.



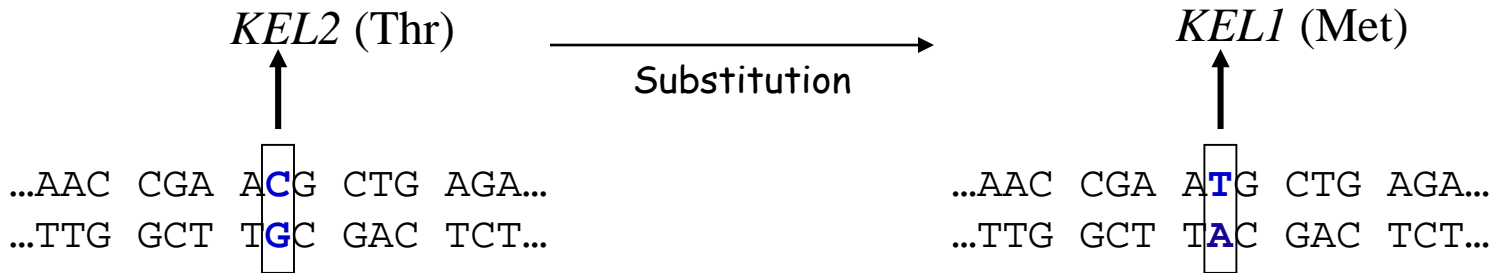
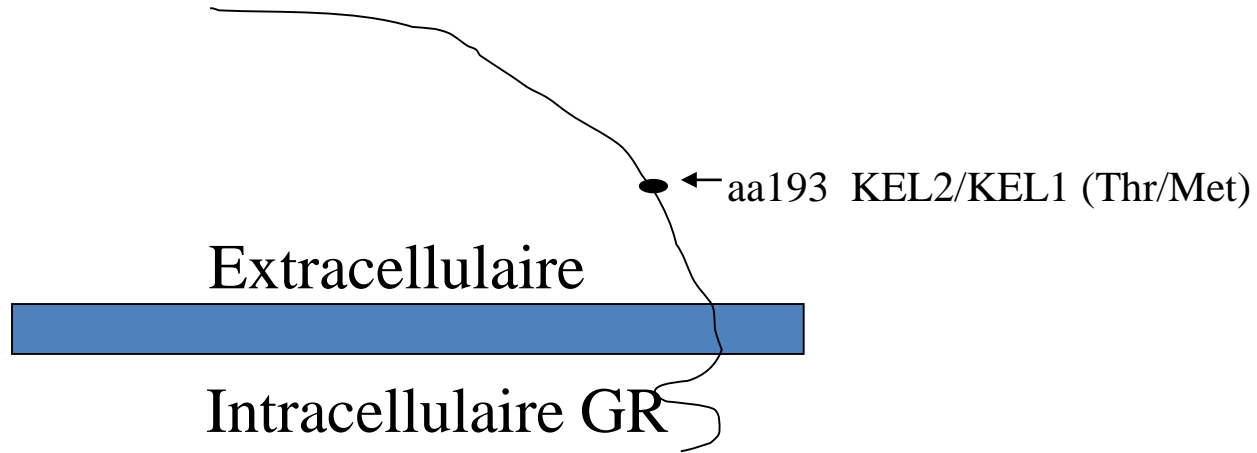
Substitution



RhCE

Les séquences fœtales recherchées pour le génotypage fœtal érythrocytaire non invasif

-KEL1;2 : mutation ponctuelle dans *KEL*-



**Le génotypage foetal érythrocytaire non
invasif :
techniques utilisées**

Le génotypage fœtal érythrocytaire non invasif par PCR temps réel

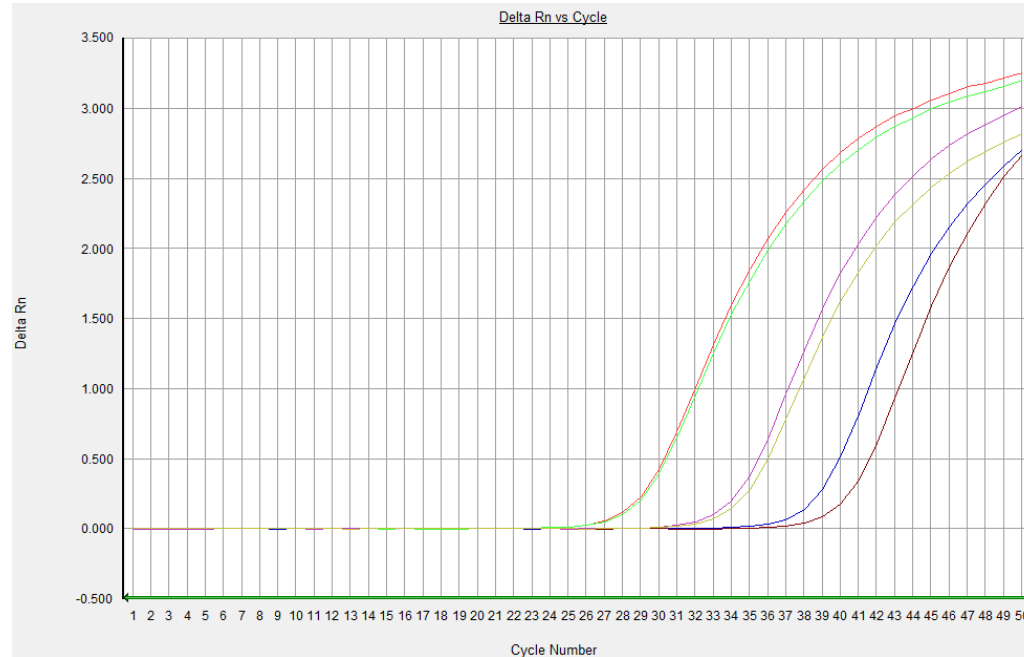
Technique la plus ancienne et la plus utilisée pour le génotypage fœtal érythrocytaire

Dans la littérature plus de 44 protocoles pour le génotypage RHD fœtal non invasif

	Prélèvement	Age gestationnel	Extraction	Cibles amplifiées
JM Corta 2002	Serum (<24h)	8SA-14SA	Manuelle (400µl-50µl)	simplexe Ex10x2 Gène de sourisx2 SODx2
C Rouillac-La Sciellour 2004	Plasma (<48h)	11SA-30SA	Manuelle (800µl-50µl)	Simplexe 7 et 10
E. Brojer et al 2005	Plasma de sang (<2h)	Les 3 trimestres de grossesse	Manuelle (1ml-60µl) Automatisée (2ml-60µl)	simplexe Ex10x1x2-Ex7x2- Intron4x1 SRYx2-SNPx2
MD. Lan Zhou et al 2005	Plasma (<48h)	10SA-42SA	Manuelle (800µl-50µl)	duplexe (Ex4-Ex10)x2 (Ex5-SRY)x2 SNPx2 GAPDx2
K. Finning 2008	Plasma (<10min)	28SA	Automatisée (560µl)	duplexe Ex10-Ex5 CCR5

Le génotypage fœtal érythrocytaire non invasif par PCR en temps réel - principe -

But: mettre en évidence l'ADN fœtal par PCR spécifique des séquences fœtales recherchées



Le Ct (nombre de cycles PCR pour lequel le signal du produit PCR se distingue du bruit de fond) permet de différencier le signal fœtal du signal maternel:

absence de signal = fœtus négatif

signal tardif $Ct > 35$ = fœtus positif

signal précoce $Ct < 30$ = signal maternel

-Avantages-

- Rapide
- Peu couteuse
- Peu être utilisée à grande échelle

-Inconvénients-

- Risque de faux positif par interférence d'ADN maternel
- Risque de faux négatif

Le génotypage fœtal érythrocytaire non invasif par Spectrométrie de Masse - prince de la méthode SABER- (single allele base extension reaction)

Allèle maternel

...CGA A**C**G CTG...

Allèle fœtal

...CGA A**T**G CTG...

1-Amplification par PCR

...CGA A**C**G CTG...

...CGA A**T**G CTG...

2-Extension avec amorce d'extension+dATP

...CGA A**C**G CTG...

...CGA A**T**G CTG...

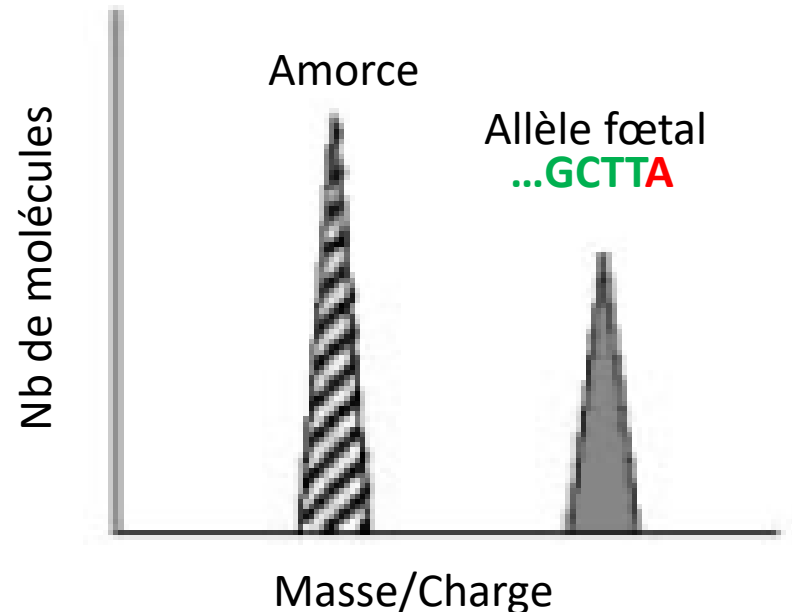
...**GCT T**
Pas d'extension

...**GCT TA**
Extension

3-Analyse par MALDI-TOF MS



4-Résultat



-Avantages-

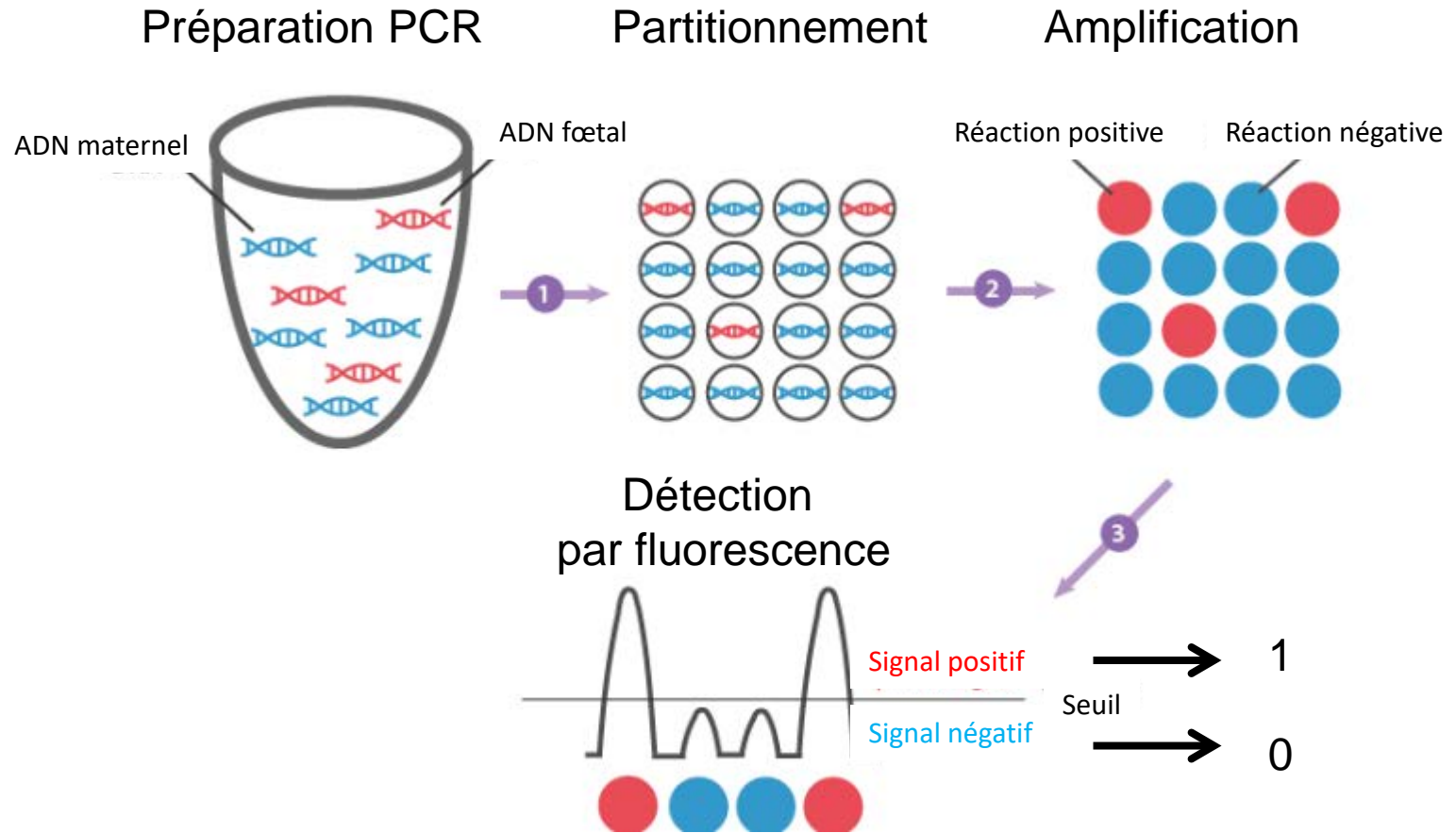
- Peu être utilisée à grande échelle
- Pas d'interférence avec l'ADN maternel

-Inconvénients-

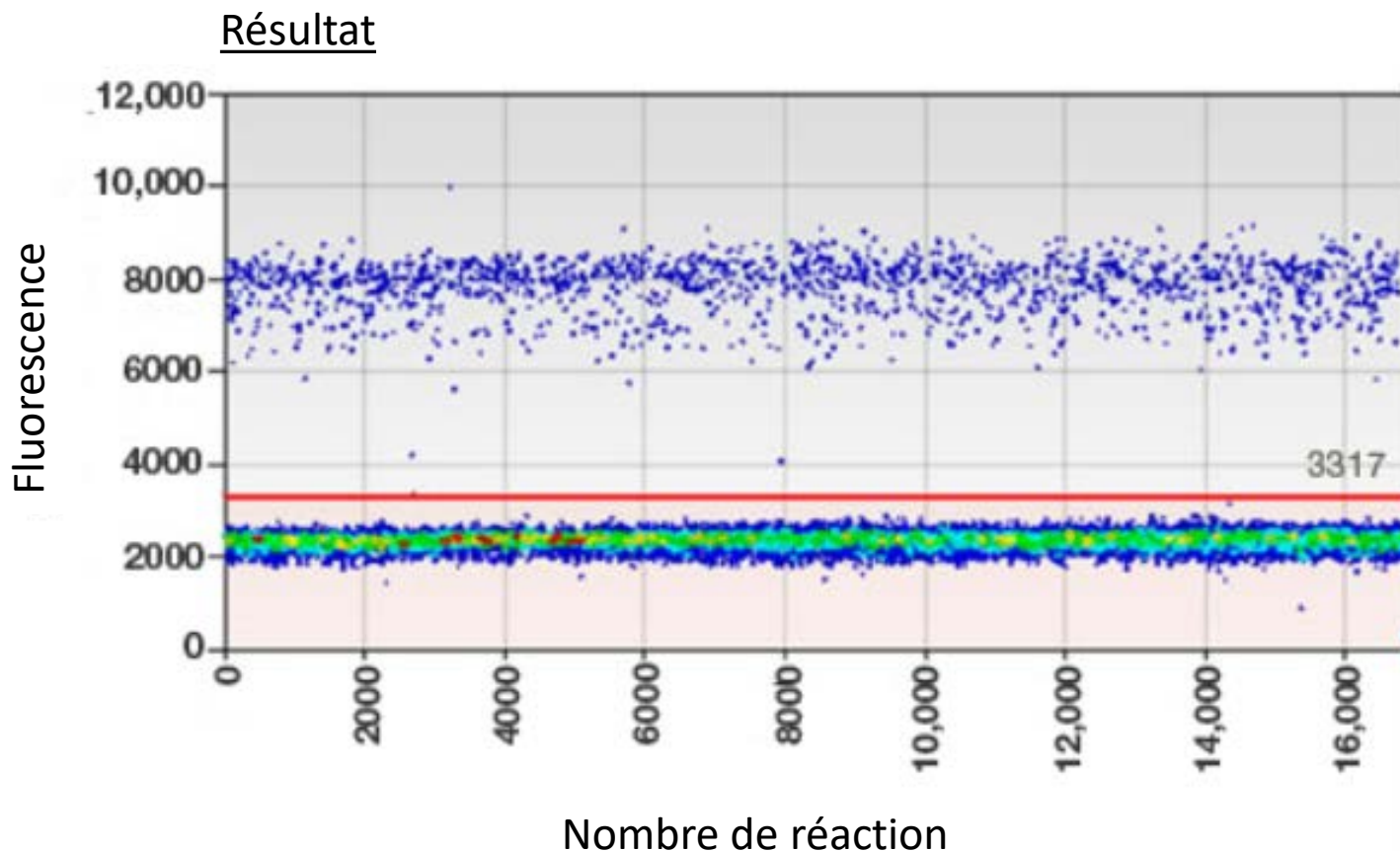
- Couteuse
- Longue
- Risque de faux négatif

CNRHP Le génotypage foetal érythrocytaire non invasif par PCR digitale

(PCR numérique : diviser pour plus de sensibilité)
-principe-



Le génotypage foetal érythrocytaire non invasif par PCR digitale (PCR numérique : diviser pour plus de sensibilité) -principe-



Quantification absolue basée sur la loi de Poisson
sans établir une courbe standard préalable

CNRHP Le génotypage fœtal érythrocytaire non invasif par PCR digitale

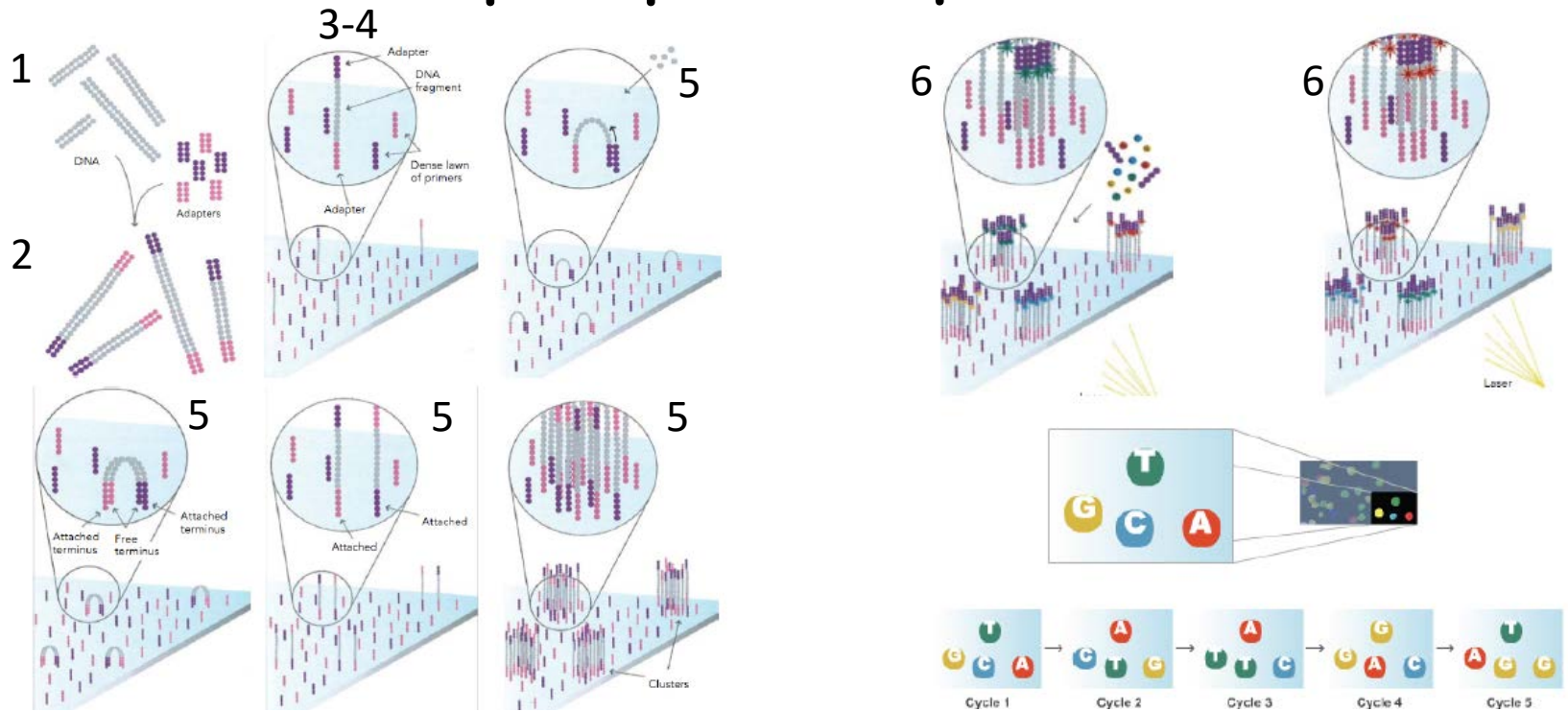
-Avantages-

- Plus sensible. Peut-être utilisée pour des âges gestationnels très précoces (<11SA)
- PCR moins sensible aux inhibiteurs

-Inconvénients-

- Couteuse
- Délicate pour la mise au point
- Longue

Le géotypage foetal érythrocytaire non invasif par NGS (next Generation Sequencing) -principe technique Illumina-



- 1-Génération d'une banque d'ADN plasmatique ou d'un produit de PCR de la région cible plasmatique
- 2-Ajout d'adaptateurs spécifiques aux extrémités
- 3-Dénaturation de l'ADN
- 4-Fixation aléatoire de l'extrémité des simples brins

- 5- PCR « bridge »: création de doubles brins, puis dénaturation et création de groupes denses où les fragments sont amplifiés
- 6-Séquençage avec lecture à chaque cycle de la base ajoutée par chaque cluster
- 7-Interprétation

Le génotypage fœtal érythrocytaire non invasif par NGS(next Generation Sequencing)

-Avantages-

- Pas d'interférence de l'allèle maternel

-Inconvénients-

- Couteuse
- Difficile à mettre au point
- Longue
- Besoin de Bio-informatique pour l'interprétation

Le génotypage fœtal érythrocytaire non
invasif :
risque de faux positifs et faux négatifs

2 SOURCES

I-Présence de variants silencieux érythrocytaires chez le fœtus

Développer des PCRs pour discriminer les variants *RHD* silencieux et non silencieux

II-Interférence des contaminations par augmentation de la sensibilité de la technique:

contamination par aérosol

lors du prélèvement, lors de la décantation du plasma,

lors de l'extraction,

lors de la manipulation de l'éluat...

Prendre des précautions lors de la technique:

port de charlotte

chargement des plaques PCR sous enceinte...

2 SOURCES

I-Problème d'extraction ou d'inhibition de la PCR :

- Inclusion d'un ADN traceur déposé dans le plasma (témoin d'extraction de l'ADN et de non-inhibition de la PCR).
- Amplification d'un gène de contrôle (ex:β-globine)

II-Absence d'ADN fœtal pour les fœtus conclus négatifs

- Amplification du gène SRY si fœtus mâle
 - Valable seulement pour 50% des examens
- Amplification du gène fœtal RASSF1A hyperméthylé
- Amplification d'un polymorphisme/mutation de gène absent chez la mère et présent chez le père
- Répéter le test sur un second prélèvement fait plus tard dans la grossesse
 - Concentration plus élevée en ADN fœtal
 - Rattrape les erreurs d'étiquetage
 - Rattrape un croisements pré- ou per-analytique des échantillons

Le génotypage foetal RHD non invasif -son application dans les différents pays-

Pays	SA minimal du test		Technique utilisée	Tests supplémentaires réalisées	
	Immunisation	Prévention		Immunisation	Prévention
France (HAS)	11 à 12	11 à 12	PCR temps réel	2 ^{ième} prélèvement	2 ^{ième} prélèvement
Danemark	14	14	PCR temps réel	Non	Non
Royaume Uni	16 (4-5-7-10)	11 (5-7)	PCR temps réel	Non	Non
Finlande	16	24	PCR temps réel	Marqueur foetal SRY+2 ^{ième} prélèvement	Marqueur foetal SRY
Allemagne	9	20	PCR temps réel	2 ^{ième} prélèvement	Non
Italie	18		PCR temps réel	2 ^{ième} prélèvement	
Pays Bas	11	27	PCR temps réel	Marqueur foetal (SRY ou autre)	Non
Slovénie	16		PCR temps réel	Marqueur foetal SRY	
Espagne	9		PCR temps réel	Marqueur foetal SRY ou 2 ^{ième} prélèvement	
Suisse	10		PCR temps réel	2 ^{ième} prélèvement	
Australie	12		PCR temps réel	Marqueur foetal SRY +RASSF1A + 2 ^{ième} prélèvement	
Brésil	16		PCR temps réel	Marqueur foetal SRY	
USA			Spectrométrie de Masse		



Dr Yves BROSSARD

UF biologie CNRHP

Dr A. MAILLOUX

Dr S. HUGUET-JACQUOT

Dr C. TOLY-NDOUR

Dr H. DELABY

Equipe technique

UF clinique CNRHP

Dr A. CORTEY

Dr F. PERNOT

Pauline THOMAS

Dr E. MAISONNEUVE, Dr S. FRISZER, Dr L. GUILBAUD, Dr F. DHOMBRES

Pr J.M. JOUANNIC

Pôle biologie médicale et pathologie :

Dr M. VAUBOURDOLLE



The screenshot shows a website page with the following content:

- Centre National de Référence en Hémiobiologie Périnatale** (CNRHP) logo and address: 184, rue de Valenciennes, 75012 PARIS.
- Actualités 2017 - 2018** section with a "SAVE THE DATE" announcement.
- Text: "Après le succès de 2015, nous avons le plaisir de vous annoncer l'organisation des 25èmes Journées Yves Brossard d'Hémiobiologie Fœtale et Néonatale".
- Event details: "Le jeudi 11 janvier 2018, Auditorium de la Mairie de Paris".
- Registration information: "Le programme définitif est disponible ici", "Nous comptons sur votre présence", "Les inscriptions sont désormais closes".
- Image of the Paris City Hall at night.
- Footer: "Unité clinique de soins des incompatibilités fœto-maternelles et néonatales", "Unité fonctionnelle d'expertise en Hémiobiologie Périnatale", "Pôle de Biologie Médicale et Pathologie - Site Est-Parisien", "Responsable : Dr Anne Cortey", "Tél. 01 71 97 03 05".

Pr J.M. JOUANNIC