



Génotypage plaquettaire fœtal non-invasif : Principe et indications

Dr R.PETERMANN

Département d'Immunologie Plaquettaire

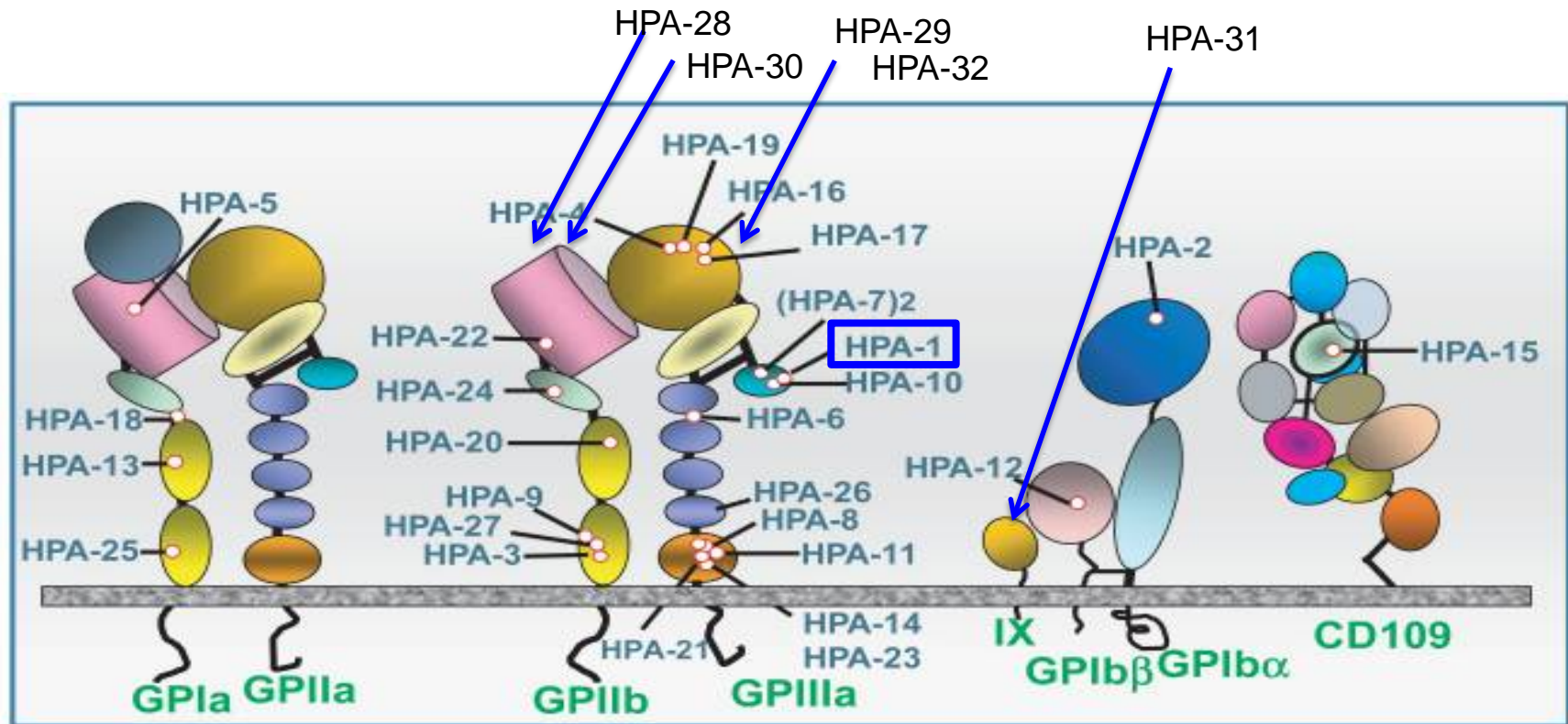
Disclosures of : R. PETERMANN

Employment	No conflict of interest to disclose
Research support	No conflict of interest to disclose
Scientific advisory board	No conflict of interest to disclose
Consultancy	No conflict of interest to disclose
Speakers bureau	No conflict of interest to disclose
Major stockholder	No conflict of interest to disclose
Patents	No conflict of interest to disclose
Honoraria	No conflict of interest to disclose
Travel support	No conflict of interest to disclose
Other	No conflict of interest to disclose

Introduction

Système HPA (Human Platelet Antigen)

Modification de la nomenclature Human Platelet Antigens :
polymorphisme HPA www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/table2



[Peterson JA](#), [McFarland JG](#), [Curtis BR](#), [Aster RH](#). Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. Br J Haematol. Apr 2013; 161(1): 3–14 (Schéma modifié)

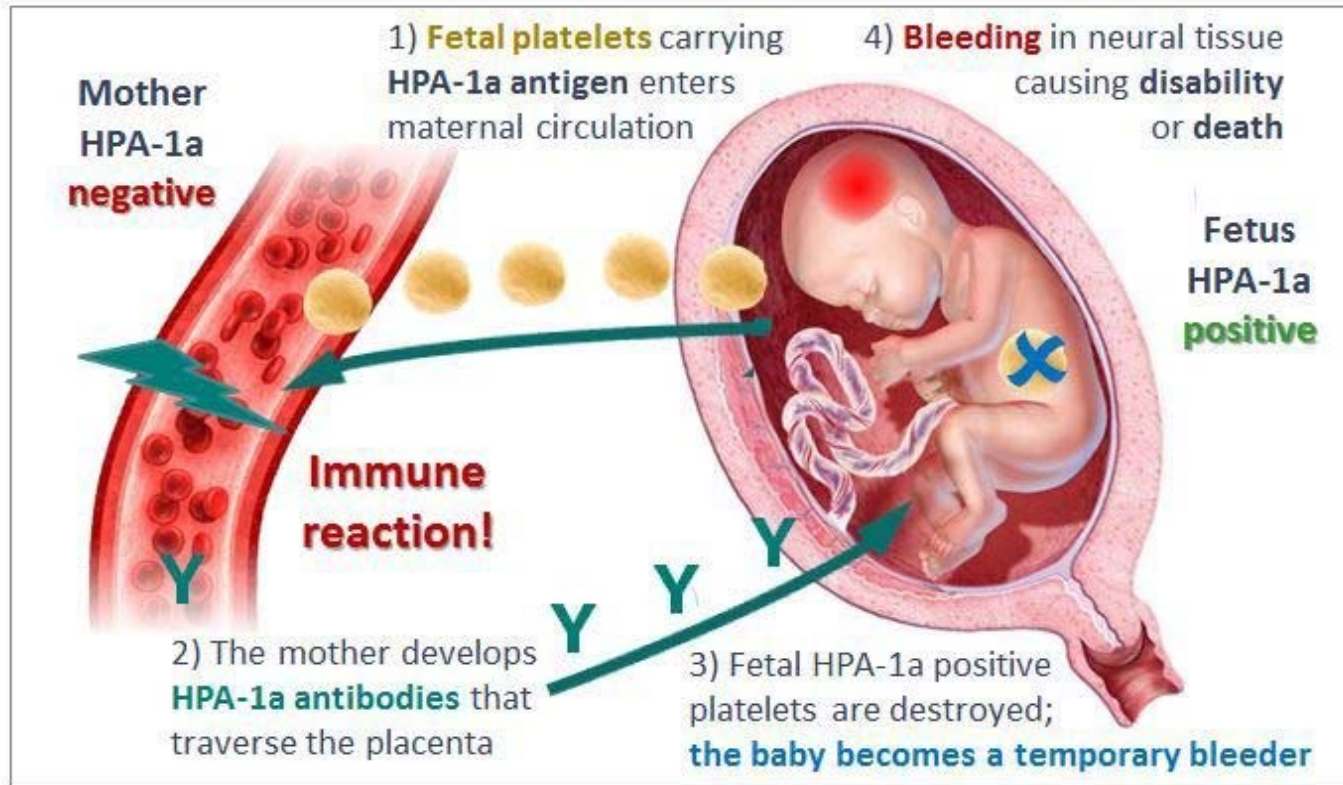
Chez les caucasiens :

HPA-1 (β_3) impliqué dans 80% des TNAI (cas les plus sévères)



Introduction

FNAIT: Fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia



<http://www.labo-roeselare.be/NL/Nieuws/28>

Incidence:

1 cas sur 1000 naissances → TNAI (10-30% HIC)

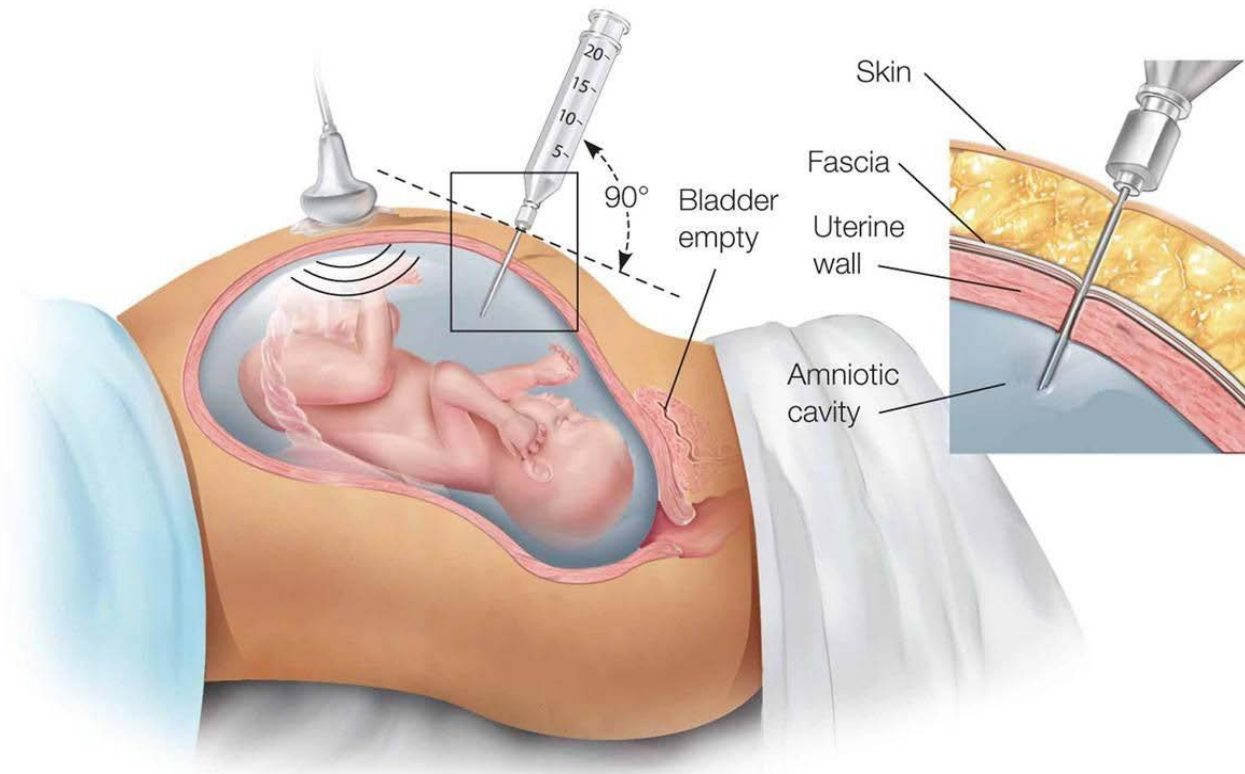
↙ Décès (1-10%)

↘ Séquelles neurologiques (10-30%)



Introduction

Diagnostic prénatal -> Génotypage plaquettaire foetal



<http://www.pregnancyhealth.net/nuchal-translucency-nt-ultrasound-scan-screening/>

Geste invasif -> risque de saignement et de fausse-couche estimé à 1%
-> risque d'augmentation du titre d'Ac et potentiellement de la sévérité de la TNAI



Réaliser un diagnostic prénatal par une méthode non invasive

Matériels

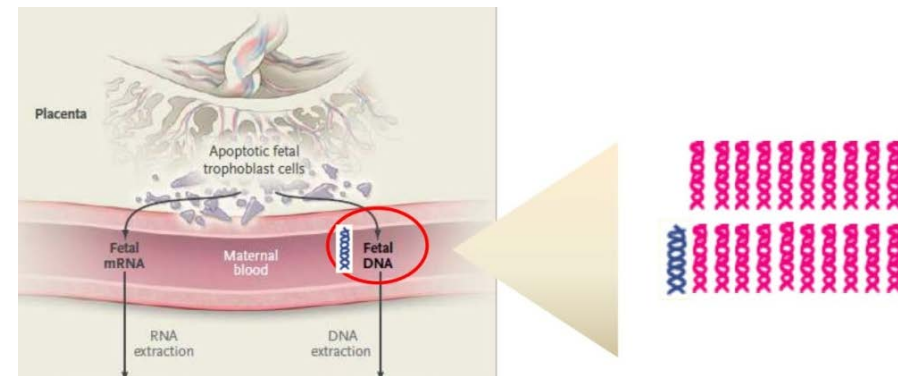
1. Cellules fœtales d'origine érythroblastique, trophoblastique ou lymphocytaire (*Bianchi et al, 1997 et 2002*)
2. ADN fœtal libre dans la circulation maternelle (*Lo et al, 1997*) ++++

Origine: placenta

Présent à partir de la 5^{ème} SA

Taille: < 200pb

Proportion: 10-20% d'ADN total circulant



<https://expertadn.fr/le-test-genetique-non-invasif-de-la-trisomie-13-18-et-21-foetale/>

La fraction fœtale dépend de l'âge gestationnel

Noninvasive fetal genotyping of human antigen-1a

PG Scheffer,^{a,b} A Ait Soussan,^a OJHM Verhagen,^a GCML Page-Christiaens,^b D O
CE van der Schoot^a

© 2011 The Authors BJ

Safe fetal platelet genotyping: new developmen

Emilie Le Torielllec, Christophe Chenet, and Cecile Kaplan

Volume 53, August 2013 TRAN

Noninvasive fetal genotyping of human platelet a using targeted massively parallel sequencing

Sandra Wienzek-Lischka,¹ Annika Krautwurst,¹ Vanessa Fröhner,¹ Holger Hacke
Stefan Gattenlöhner,² Andreas Bräuninger,² Roland Axt-Fliedner,³ Jan Degenhardt
Christina Deisting,³ Sentot Santoso,¹ Ulrich J. Sachs,¹ and Gregor B

TRANS

Adv Exp Med Biol. 2016;924:67-70.

Non-invasive Prenatal Diagnosis of Feto-Maternal Platelet Incomp Melting Analysis.

Ferro M¹, Macher HC², Nogueroles P³, Jimenez-Arriscado P¹, Molinero P¹, Guerrero JM¹, Rubio A¹.

PCR en temps réel (SSP)

Mais uniquement pour femmes HPA-1bb (n=34) et absence de marqueur d'ADN foetal (faux neg potentiels)

PCRs en temps réel (SSP+HRM) Mais uniquement dans le système HPA-1 et absence de marqueur d'ADN foetal (faux neg potentiels)

NGS
Mais femmes HPA-1bb (n=4) et technique longue et couteuse. Avantage : 8 SNP utilisés comme marqueurs d'ADN foetal

PCR en temps réel (HRM)
Mais uniquement dans le système HPA-1 (n=12)



1. Faible proportion de DNA foetal circulant plasmatique (*Lo et al, 1997*)
2. Variation de la proportion de DNA foetal en fonction
 - de la nature du prélèvement (tube EDTA vs tube Streck)
 - du délai de prise en charge du prélèvement (*Angert et al, 2003*)
3. Petite taille des fragments de DNA plasmatique < 200 pb (*Lo et al, 2010*)
4. Présence d'un contrôle interne sous la forme d'un marqueur foetal pour quantifier le DNA foetal (*Jiang et al, 2012*)
 - marqueur génétique (SNP par exemple)
 - marqueur épigénétique (promoteur du gène *RASSF1A*)

Objectif du laboratoire

Développer une (des) méthode (s) permettant un diagnostic **précoce**, **fiable** et **non invasif**

Méthode

1. Extraction d'ADN à partir de plasma de la mère (QIAamp Circulating Nucleic Acid, Qiagen)
2. Génotypage plaquettaire par Droplet Digital PCR (ddPCR)

HPA-1 (β_3)

HPA-3 (α_{IIb})

HPA-5 (α_2)

HPA-15 (CD109)

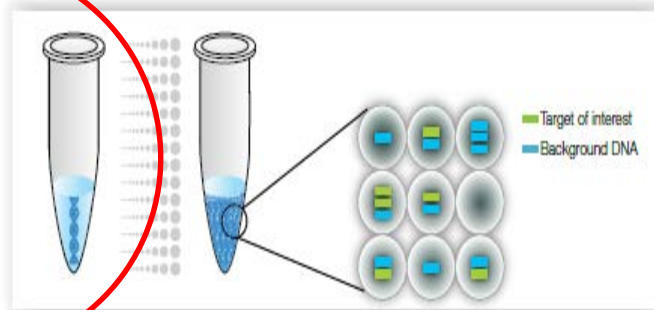


> 90 % des TNAI

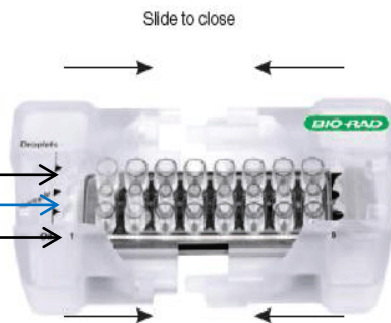


Droplet Digital PCR- Principe

PCR reaction
(20 μ L)



Droplets
Sample
Oil



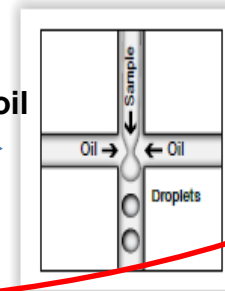
Droplet Generator QX200 (Bio-Rad)

✓ Generation of
20 000
droplets

✓ Random
DNA
repartition in
droplets

Emulsion oil

Emulsion oil



Droplet Digital PCR- Principe

PCR Amplification
after transfert of droplets
in a 96 well PCR plate

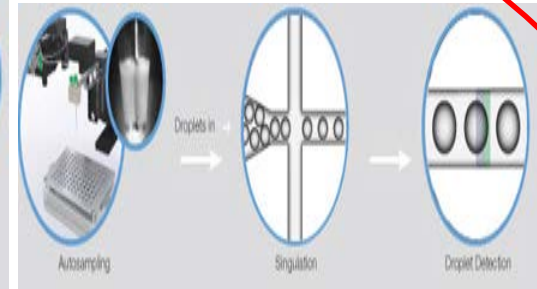
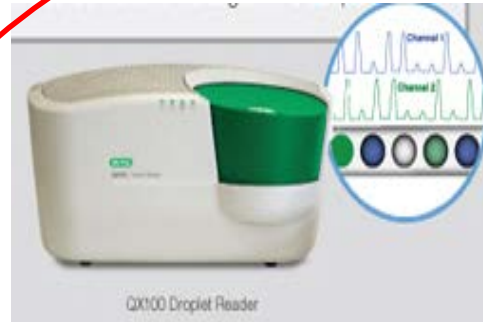
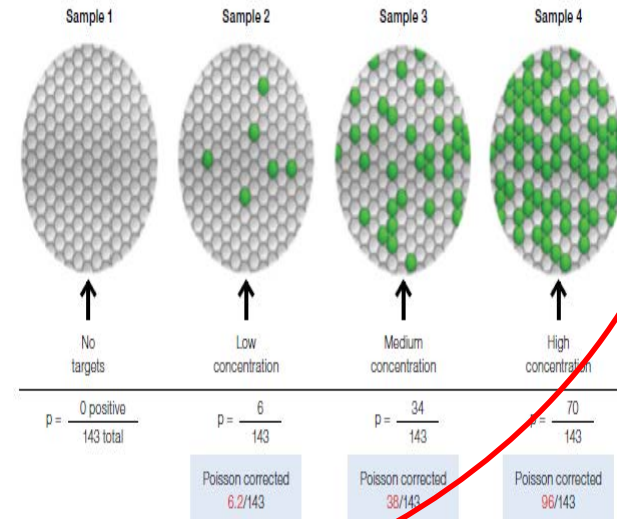
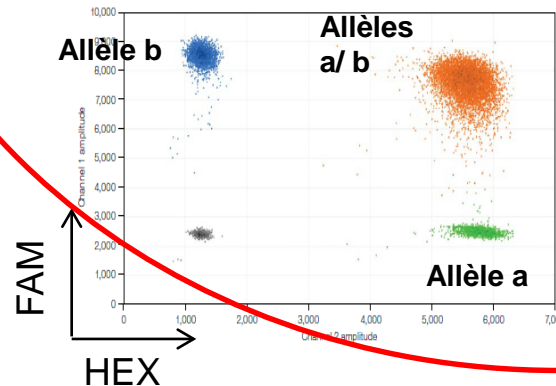
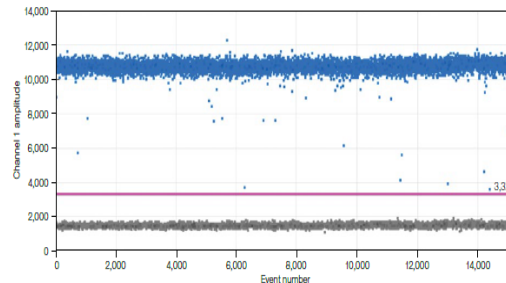


Plate reader

Data analysis

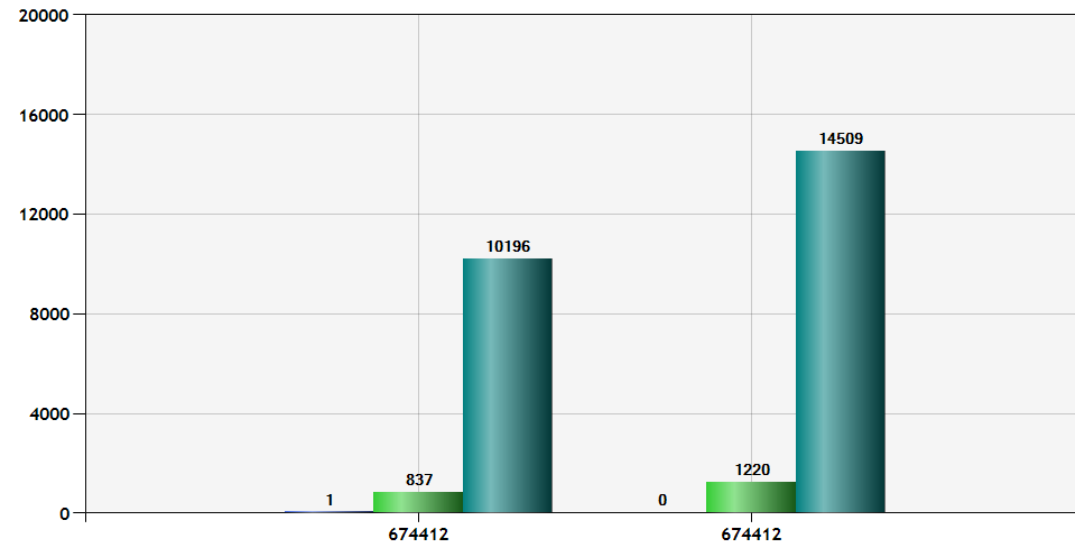
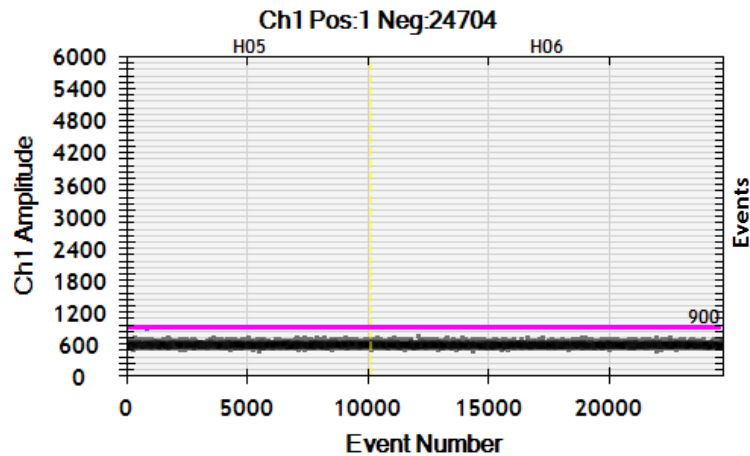


- **2011:** MFIU à 25 SA -> Incomp foëto-maternelle HPA-3 et HPA-5 (analyse placentaire)
Absence d'allo-anticorps antiplaquettaires (+ CM négatif)
- **2012:** Naissance d'une fille -> Incomp HPA-3 et HPA-15
Absence d'allo-anticorps antiplaquettaires (+ CM négatif)
- **2013:** Accouchement à 37 SA -> pas d'incomp plaquettaire
- **2016:** Nouvelle grossesse à 9SA -> Absence d'allo-anticorps antiplaquettaires
(+ CM négatif)

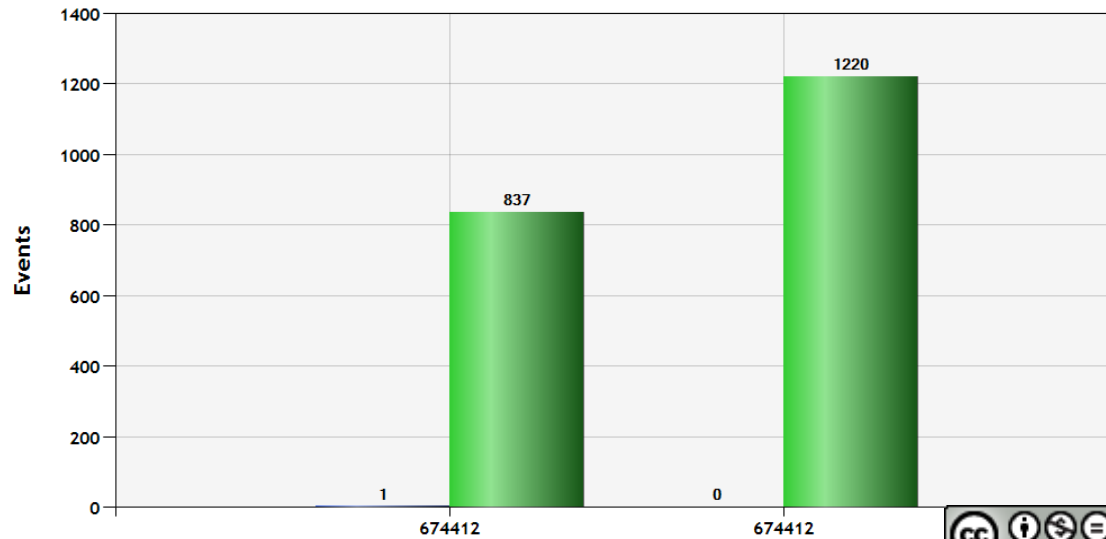
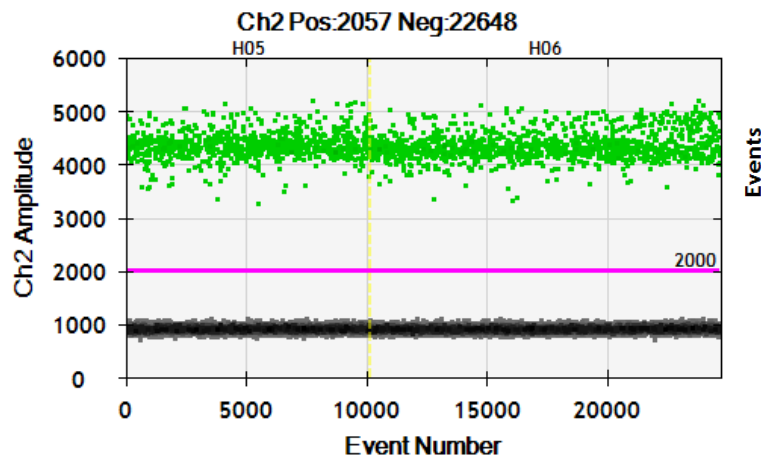
Génotypage plaquettaire des parents

Dossier	N°	Incompatibilité(s)	Géno ♀	Géno ♂
...	674412	HPA-1	a/a	a/a
		HPA-3	a/a	a/b
		HPA-5	a/a	a/b
		HPA-15	b/b	a/b

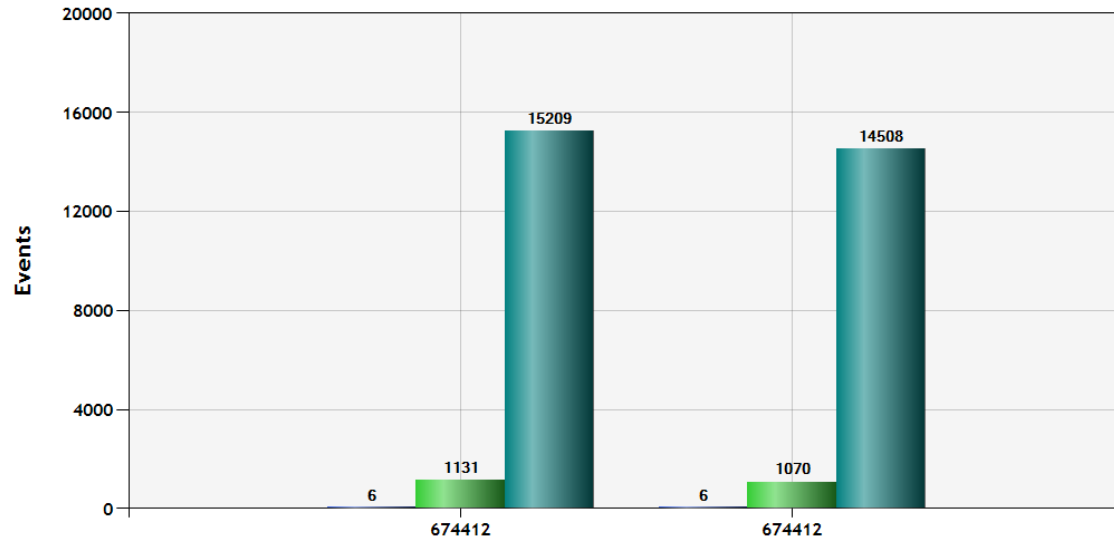
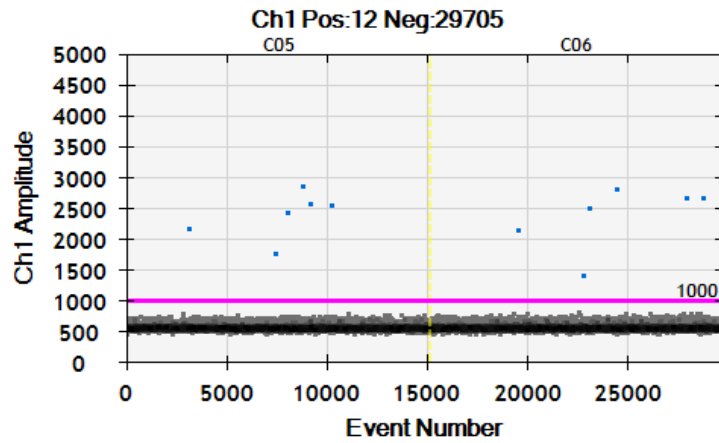
Allèle B



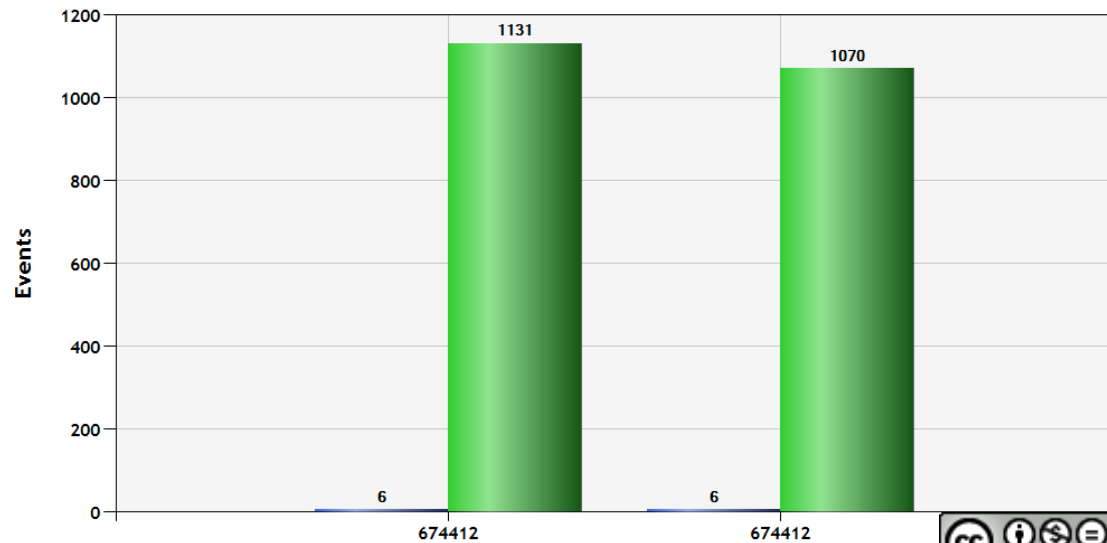
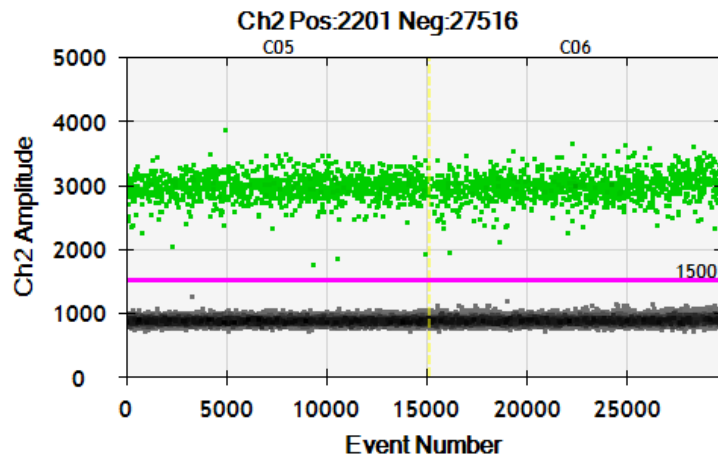
Allèle A



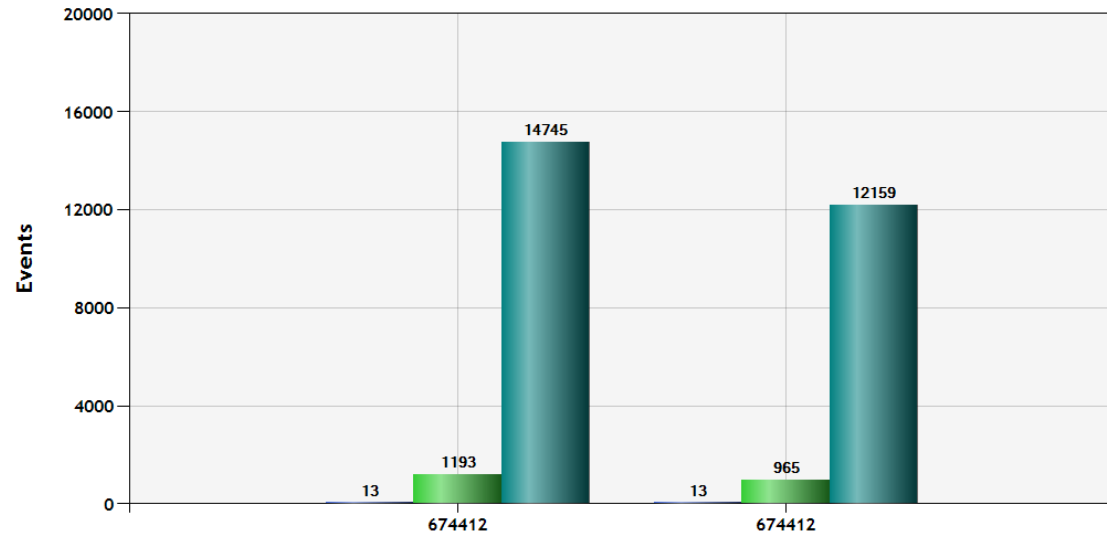
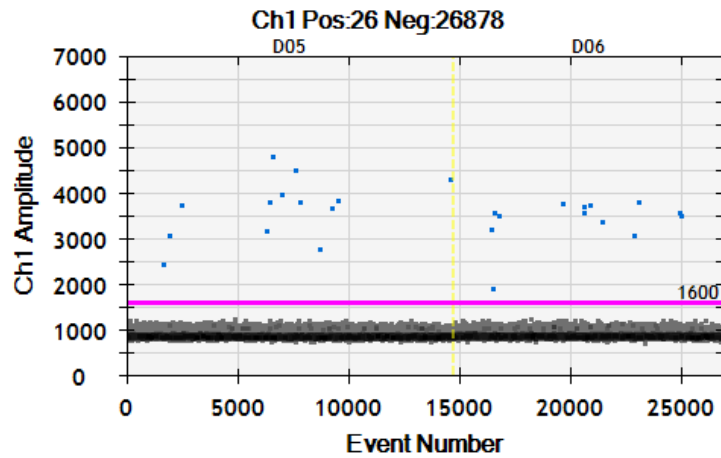
Allèle B



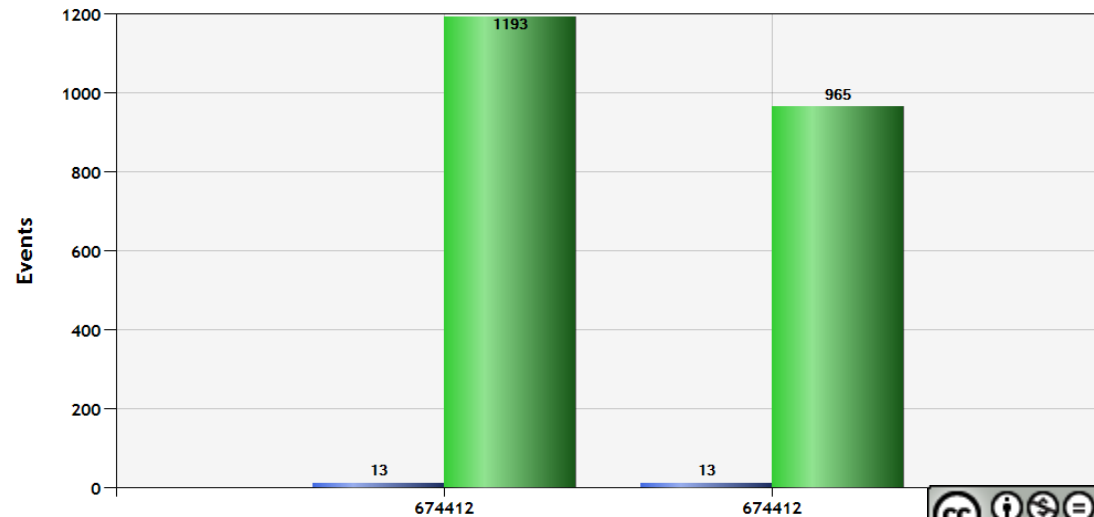
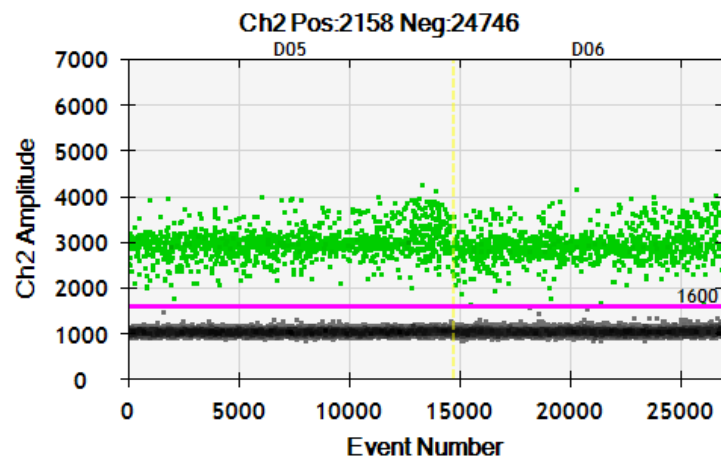
Allèle A



Allèle B

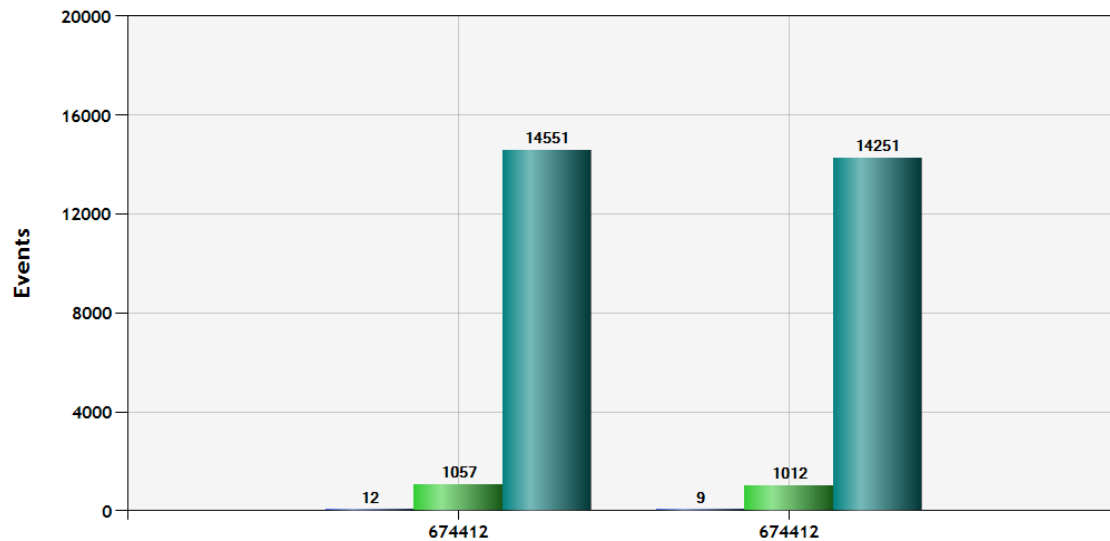
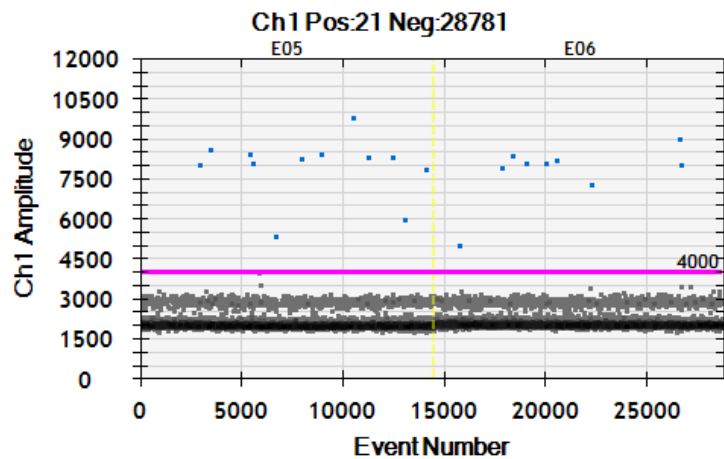


Allèle A

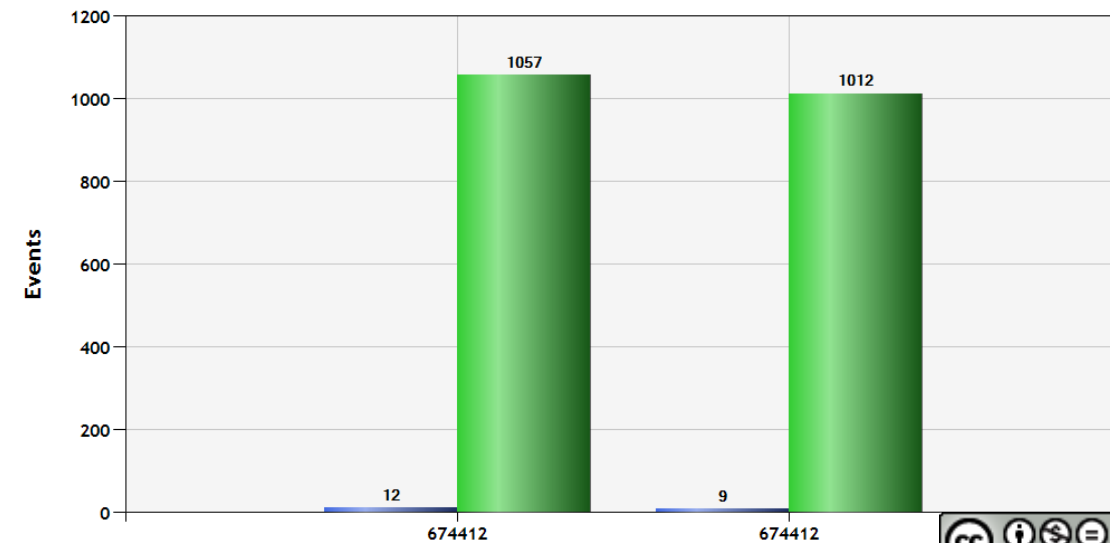
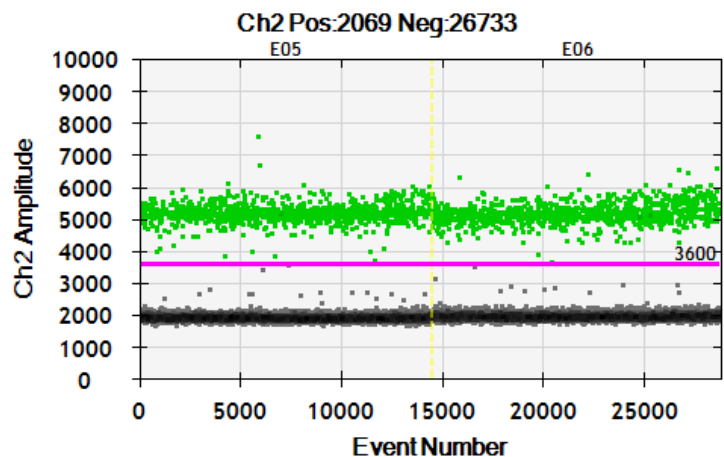


Conclusion :
Fœtus HPA-1aa -3ab -5ab -15ab

Allèle A



Allèle B



- BstU1

+ BstU1

RASSF1A

Gène **hyperméthylé** (fœtus)

RASSF1A fœtal non digéré

Gène **hypométhylé** (mère)

RASSF1A maternel digéré



Actine B (contrôle de digestion)

Actine B maternel et fœtal

Digestion



[Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis.](#)

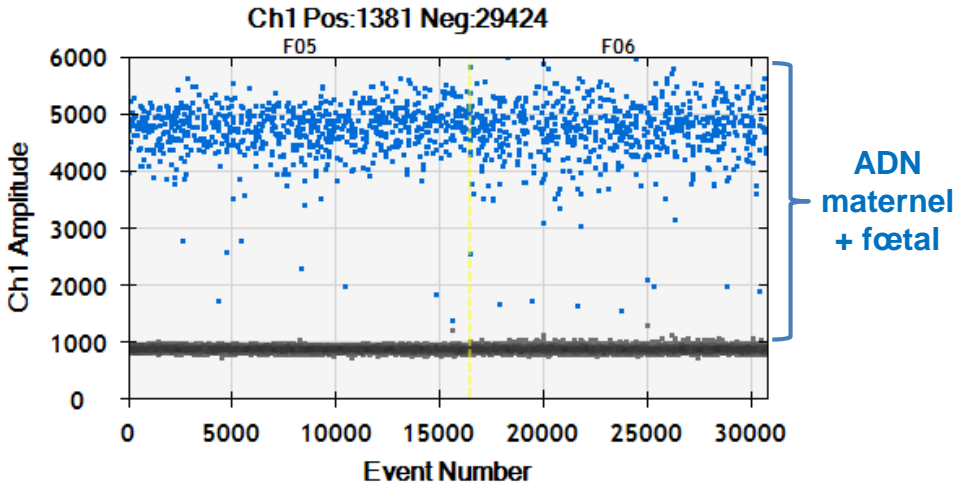
Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, Lau TK, Chim SS, Chung GT, Nicolaides KH, Lo YM. Clin Chem. 2006 Dec;52(12):2211-8.



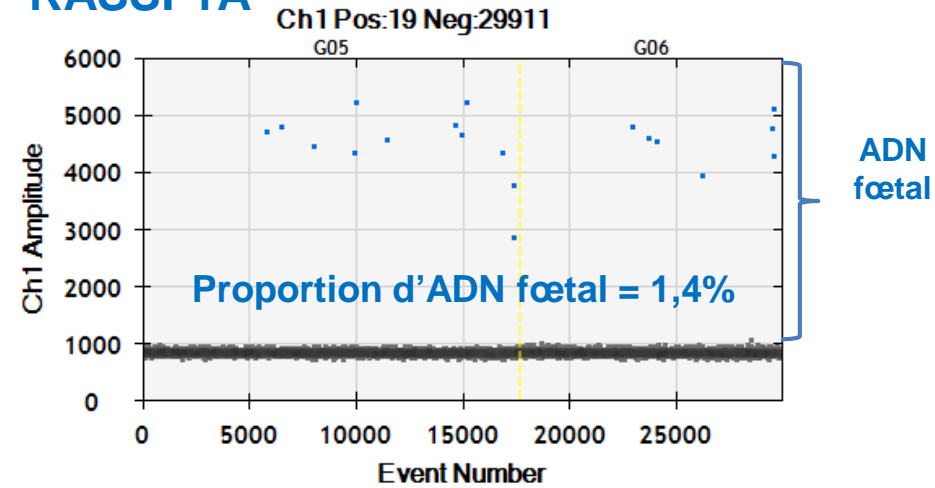
- BstU1

+ BstU1

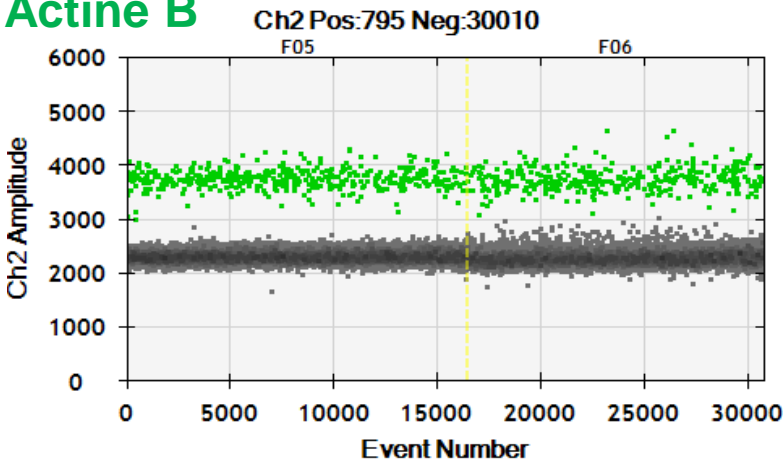
RASSF1A



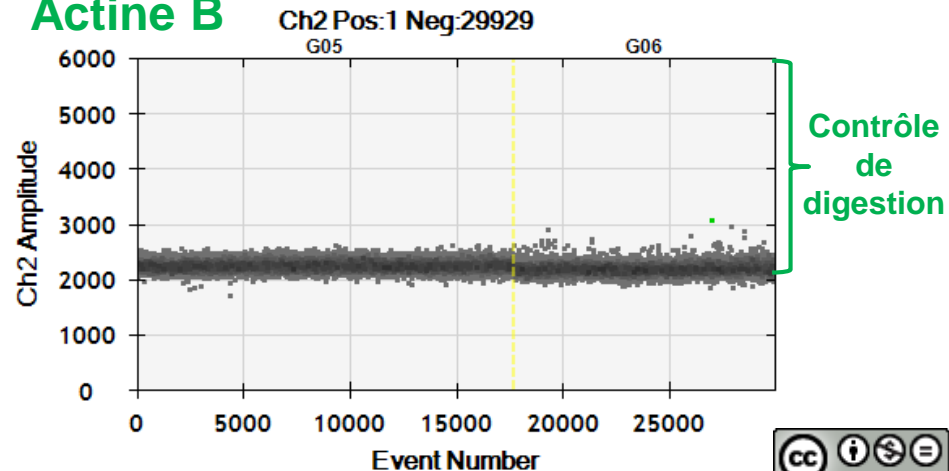
RASSF1A



Actine B



Actine B



Avantages de la ddPCR:

- ✓ Technique très sensible et fiable
- ✓ Diagnostic précoce du génotypage plaquettaire foetal (8 SA)
- ✓ Problèmes techniques rencontrés en PCR-SSP et en PCR-HRM (*Le Toriellec et al. Transfusion 2013*) évités
- ✓ Etude simultanée de différents systèmes HPA (HPA-1,-3,-5 et -15)
- ✓ Vérification en parallèle de la présence de DNA foetal dans le plasma maternel

Indications du DPNI dans la prise en charge de la grossesse : père hétérozygote dans un des systèmes HPA considérés permettant :

- ✓ Une meilleure évaluation du risque associé à la grossesse
- ✓ Une organisation facilitée à la naissance pour la mise à disposition de concentrés plaquettaires HPA compatibles
- ✓ Une prévention des complications des TNAI par la mise en place d'un traitement maternel antenatal
- ✓ Des interventions inutiles en l'absence d'incompatibilité telles que :
 - ❖ Administration d'IgIV
 - ❖ Suivi sérologique au cours de la grossesse
 - ❖ Césarienne

Remerciements

Institut National de la Transfusion Sanguine



INSTITUT NATIONAL DE LA TRANSFUSION SANGUINE



Frédéric Bianchi
Cécile Casale
Christophe Chenet
Nicolas Ferré
Nathalie Francelle
Terry Granchon-Riolzir
Vincent Jallu
Corinne Martageix

Yasmine Mammasse

Jeannine Quesne
Nathalie Seidner

BioRad

BIO-RAD

Martial Saumier

Centre de Recherche des Cordeliers

Plateforme de PCR digitale
Tessa Fredriksen



Association Recherche et Transfusion



**MERCI
POUR VOTRE ATTENTION**