

*COLLÈGE NATIONAL  
DES GYNÉCOLOGUES ET OBSTÉTRICIEUS FRANÇAIS  
Président : Professeur J. Lansac*

**Extrait des  
Mises à jour  
en Gynécologie  
et Obstétrique**

—

**Tome XXXIII  
publié le 9.12.2009**



*TRENTE-TROISIÈMES JOURNÉES NATIONALES  
Paris, 2009*

# Le diagnostic prénatal non invasif

J.M. COSTA \*  
(Cergy-Pontoise)

## Résumé

*Dans son approche conventionnelle, le diagnostic prénatal repose sur l'analyse d'un matériel biologique fœtal obtenu par les actes invasifs que sont la choriocentèse (villosités choriales), l'amniocentèse (liquide amniotique) ou la cordocentèse (sang fœtal). Pour l'essentiel cependant, il s'agit d'établir le caryotype fœtal à la recherche d'anomalies chromosomiques à partir d'un prélèvement de liquide amniotique dont le risque de perte fœtale associée est de l'ordre de 1 %. C'est ce risque de perte fœtale qui a incité depuis longtemps à la recherche de moyens non invasifs de diagnostic prénatal.*

*L'analyse des cellules fœtales dans la circulation sanguine maternelle n'est toujours pas d'actualité car elle se heurte à de nombreux problèmes techniques. En revanche, dix ans après sa découverte, l'analyse de l'ADN fœtal circulant dans le plasma/sérum maternel fait partie intégrante des outils du diagnostic prénatal même si les applications sont limitées au génotypage rhésus D et à la détermination du sexe fœtal. Toutefois, le potentiel de cette approche au diagnostic prénatal des aneuploïdies fœtales et des maladies génétiques monogéniques fait l'objet d'une intense recherche actuellement.*

*Mots clés : diagnostic prénatal non invasif, ADN fœtal circulant, sexe fœtal, génotypage rhésus, trisomie 21, maladies monogéniques*

\* Laboratoire Cerba - Zi Les Béthunes - Rue de l'Équerre - 95066 Cergy-Pontoise cedex 09  
E-mail: jmcosta@lab-cerba.com

*Abstract*

*In its conventional approach, prenatal diagnosis is based on analysis of fetal material obtained by invasive procedures such as chorionic villus sampling, amniocentesis or fetal blood sampling. In most cases, prenatal diagnosis is performed to establish fetal karyotype in order to determine if the fetus is affected by chromosomal abnormalities. However amniocentesis, the main worldwide invasive procedure, is at risk for fetal miscarriage, that risk being estimated to be around 1%. Therefore, many laboratories have attempted to develop non-invasive prenatal diagnostic procedures to avoid such fetal loss.*

*Analyzing circulating fetal cells in the maternal blood is still unresolved for routine use because of several technical problems. On the contrary, cell-free fetal DNA circulating in maternal plasma/serum has rapidly become a useful tool for prenatal diagnosis. Even if today this approach is limited to fetal sex determination and rhesus D genotyping, large investigations are currently in progress in order to develop non-invasive prenatal diagnosis for monogenic disorders or fetal chromosomal abnormalities such as trisomy 21 based on circulating fetal nucleic acids.*

D'après les dernières données disponibles auprès de l'Agence de la biomédecine ([http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2007/som/som\\_general\\_proc.htm](http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2007/som/som_general_proc.htm)), plus de 92 000 gestes invasifs de diagnostic prénatal ont été effectués en France pour l'année 2006 dans le cadre de la détection d'une anomalie chromosomique fœtale. Avec environ 830 000 naissances vivantes pour cette même année, ce sont donc plus de 11 % des femmes enceintes qui ont été concernées. Les indications de marqueurs sériques maternels du 2<sup>e</sup> trimestre et un âge maternel supérieur à 38 ans représentent à elles seules plus de 75 % des cas. Si ces deux indications ont permis d'identifier 824 fœtus atteints de trisomie 21, elles ont généré dans le même temps environ 700 pertes fœtales (si l'on retient un taux de 1 % communément admis après amniocentèse).

Cette situation a conduit la Haute autorité de santé à émettre de nouvelles recommandations en santé publique afin d'améliorer la performance du dépistage prénatal de la trisomie 21, tout en insistant sur le fait que les femmes doivent être en mesure de comprendre les stratégies de dépistage existantes mais aussi la distinction entre risque et diagnostic de certitude. Il y a donc à l'évidence un double intérêt à développer une méthode non invasive de diagnostic de la trisomie 21 fœtale, à la fois pour éviter les pertes fœtales mais aussi plus propices à une information plus simple et plus claire auprès des patientes.

Pendant de très nombreuses années, la seule voie envisagée et envisageable a reposé sur l'analyse des cellules fœtales circulant dans le sang maternel. Une très large étude multicentrique publiée en 2002 (étude NIFTY) a cependant sonné le glas, au moins provisoirement, de cette approche cellulaire. Avec un taux d'échec d'analyse de 17 % et un taux de détection de 74,4 % de fœtus porteurs d'une trisomie 21, il n'était pas concevable d'envisager une application clinique. Les efforts récents visant à utiliser de nouvelles procédures d'isolement (non immunologiques) de ces cellules fœtales (ISET, lectine) n'ont toujours pas prouvé leur faisabilité en matière d'analyse chromosomique du fœtus. Il est d'ailleurs peu probable que cette approche « cellulaire » soit gagnante. De nouvelles méthodes d'analyse des acides nucléiques fœtaux plasmatiques sont très prometteuses car plus propices à une analyse simple et automatisable, donc applicables à grande échelle.

Contrairement à l'approche cellulaire, l'analyse de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel, quelques années seulement après sa découverte, fait partie intégrante des outils du diagnostic prénatal même si ces tests sont encore réservés à de rares laboratoires spécialisés. Les applications cliniques sont clairement définies et validées même si elles restent encore très limitées : détermination du sexe fœtal (recherche de séquences Y absentes du génome maternel) [3] et d'autre part, le génotypage RHD fœtal (gène RHD absent du génome maternel chez les patientes RhD-négatif) [4, 5].

La possibilité de définir le génotype RHD fœtal de manière non invasive offre de nombreux avantages. Outre le fait qu'elle permet d'éviter une potentialisation de l'allo-immunisation engendrée par un geste invasif, elle est surtout intéressante chez des patientes à risque (RhD-négatif) mais ne devant pas subir a priori de geste invasif. Chez ces dernières, la connaissance de ce génotype RHD peut ainsi, en cas de fœtus RhD-négatif, alléger la surveillance de la grossesse (surveillance sérologique, injection d'anti-D...), et de réserver aux seules patientes RhD-négatif porteuses d'un fœtus RhD-positif l'exposition à un produit dérivé du sang (immunoglobuline anti-D). L'utilisation du génotypage RHD fœtal est ainsi proposée dans les dernières recommandations pour la pratique clinique émises par le Collège national des gynécologues et obstétriciens français dans le cadre de la prévention de l'allo-immunisation rhésus-D fœto-maternelle [6].

Les autres perspectives diagnostiques à partir de l'ADN fœtal circulant (notamment la détection de mutations ponctuelles) sont limitées du fait de l'impossibilité d'analyser les séquences génétiques d'origine maternelle puisque le fœtus partage pour moitié son génome avec sa mère. Par contre, des développements récents (utilisation de

spectrométrie de masse) pourraient permettre la détection ultrasensible et reproductible de mutations ponctuelles (ou SNPs) d'apparition *de novo* ou d'origine paternelle [7]. Une étude multicentrique est actuellement en cours afin de valider un diagnostic génétique non invasif de l'achondroplasie. L'isolement de l'ADN fœtal et son analyse spécifique à travers ses caractéristiques physico-chimiques (taille, méthylation...) sont également une voie prometteuse qui doit permettre dans un avenir proche de simplifier et d'augmenter la sensibilité des méthodes actuelles.

Ces deux dernières années ont vu en effet l'émergence fulgurante de nouvelles technologies et de nouveaux concepts. Les preuves de faisabilité d'un diagnostic non invasif de la trisomie 21 fœtale, soit à partir de l'ADN fœtal circulant, ou mieux encore à partir des ARN fœtaux plasmatiques, sont aussi nombreuses que variées et devraient conduire très prochainement à des études cliniques à grande échelle.

L'ADN fœtal circulant ne représente qu'une faible proportion (environ 5 %) de l'ADN plasmatique, majoritairement d'origine maternelle. Dhallan *et coll.* ont démontré la possibilité d'enrichir en ADN fœtal (à plus de 37 %) le plasma d'une femme enceinte par l'usage d'agents chimiques fixateurs des cellules sanguines maternelles, principale source de l'ADN plasmatique. Une telle proportion d'ADN fœtal leur a permis d'analyser de manière quantitative de nombreux polymorphismes de type SNP (single nucleotide polymorphism) situés sur les chromosomes d'intérêt. Le calcul de ratios d'allèles polymorphes est à la base du concept de dosage chromosomique relatif (RCD) qui permet ainsi d'estimer indirectement le nombre de chromosomes 21 du fœtus. Des méthodes alternatives d'enrichissement, plus robustes, fondées sur l'isolement préférentiel de l'ADN fœtal en raison de sa fragmentation (plus de 95 % de l'ADN fœtal circulant à une taille inférieure à 300 bp) sont actuellement en développement. La limitation essentielle de cette approche tient au fait qu'elle s'appuie sur la notion de polymorphisme génétique, et dépend donc du caractère informatif des marqueurs étudiés.

Une autre possibilité de réaliser un dosage chromosomique relatif, indépendamment de tout polymorphisme génétique, serait de pouvoir quantifier chacune des molécules d'ADN circulantes dérivées des chromosomes 21 par rapport à un chromosome de référence. En théorie, un fœtus atteint de trisomie 21 contribuera à une quantité additionnelle de séquences dérivées du chromosome 21. Ainsi par exemple, le plasma d'une femme enceinte contenant 100 copies d'une telle séquence (dont 10 % d'ADN fœtal) verra son contenu passer à 105 copies si le fœtus est atteint d'une trisomie 21. Alors que les

méthodes actuelles (PCR en temps réel conventionnel) ne sont pas adaptées pour atteindre ce niveau de discrimination (1 *versus* 1,05), de nouveaux outils sont apparus très récemment. Il s'agit d'une part de la « digital PCR » qui exploite les caractéristiques statistiques de l'amplification génique d'ADN en dilutions limites et qui permet une estimation précise du nombre de molécules initiales. L'équipe de Dennis Lo a récemment démontré que l'établissement du RCD est envisageable par digital PCR dès lors que la proportion d'ADN fœtal est supérieure à 20 %.

Parallèlement à cette approche, de nouveaux procédés de séquençage dits « à très haut débit » offrent la possibilité d'une quantification « ultra-précise » par la production de millions de séquences en un seul temps. En comptant le nombre de séquences cibles après leur attribution à chacun des chromosomes grâce à des banques de données, la sur-représentation d'un chromosome dans le plasma maternel en relation avec un fœtus trisomique peut être détectée, y compris en l'absence d'enrichissement en ADN fœtal. La démonstration de la faisabilité de cette approche vient d'être apportée par deux études quasi simultanées des équipes de Stephen Quake et de Dennis Lo. Toutefois, les coûts exorbitants des matériels et consommables nécessaires à de telles analyses, combinés au faible débit et au temps d'analyse requis, n'en font pas à très court terme des alternatives crédibles.

L'approche la plus aboutie à ce jour reste donc celle initiée dès 2007 par Lo *et coll.*, fondée sur l'analyse des ARN fœtaux d'origine placentaire et circulant dans le plasma des femmes enceintes. En effet, l'analyse d'ARN non exprimés par les cellules sanguines maternelles lève le principal obstacle, à savoir la présence dans le plasma d'un matériel génétique d'origine maternelle. L'application du concept d'un dosage chromosomique relatif sur la base de ratios d'allèles polymorphes à ces molécules d'ARN a permis de réaliser avec succès le diagnostic de trisomie 21 fœtale. Les résultats préliminaires sont confirmés sur plus de 800 patientes à ce jour avec un taux de réussite important (1 faux positif, aucun faux négatif, valeur prédictive négative 99 %, valeur prédictive positive 100 % et spécificité > 99 %), même s'il n'est pas possible de conclure chez près de 10 % des patientes pour divers motifs. Ils permettent d'envisager à très court terme une application clinique de cette stratégie.

**Bibliographie**

- [1] Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, Dukes KA, Sullivan LM, Klinger KW, Bischoff FZ, Hahn S, Johnson KL, Lewis D, Wapner RJ, de la Cruz F. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn* 2002 Jul;22(7):609-15.
- [2] Dhallan R, Guo X, Emche S, Damewood M, Bayliss P, Cronin M, Barry J, Betz J, Franz K, Gold K, Vallecillo B, Varney J. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet* 2007 Feb 10;369(9560):474-81.
- [3] Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, Leung TY, Zee BC, Cantor CR, Chiu RW. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 Aug 7;104(32):13116-21.
- [4] Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Non-invasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 Oct 21;105(42):16266-71.
- [5] 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. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 Dec 23;105(51):20458-63.
- [6] Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, Gerovassili A, Jin Y, Nicolaides KH, Cantor CR, Ding C. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007 Feb;13(2):218-23.