



Génotypage foetal non invasif: outils moléculaires

Nelly Da Silva

Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale (CNRHP)
Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien - AP-HP - Paris

Nouveaux développements et mises au point
en Biologie Médicale et Pathologie

Jeudi 18 janvier 2018
Faculté de Médecine

CNRHP
GHU-Est Parisien

Pôle Mère-enfant
Site Trousseau- Pr J.M. Jouannic

Pôle biologie médicale et
pathologie-Dr M. Vaubourdolle

UF clinique
Site Trousseau
Responsable Dr Anne Cortey

UF de biologie et d'expertise
Site St-Antoine
Responsable Dr Agnès Mailloux

Conseils et aide au traitement
24h/24 et 7 j/7

Actes transfusionnels
in utero et ex utero
Maternité de référence

Lien étroit avec EFS

Secteur d'Urgence (24h/24)
Activité transférée au LBU de 20h à 8h
*Biologie Prévention Rhésus (détection HFM
Kleihauer)*
Ictère néonatal-suivi et bilan étiologique

Hospitalisation
Néonatale
Maternité de référence

Secteur Ante-natal- Spécialisé
Quantification des anticorps anti-érythrocytaires
: Dosage pondéral-titrage
Conseils de suivi

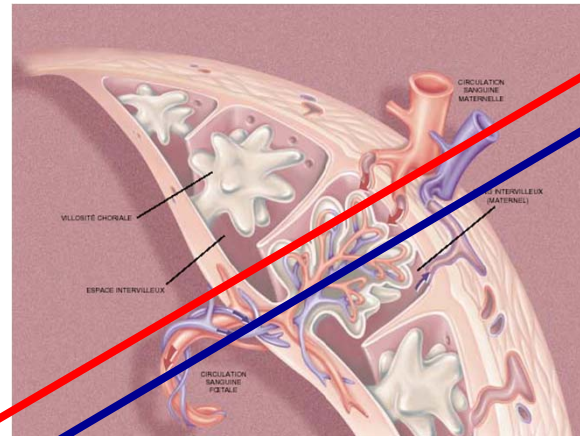
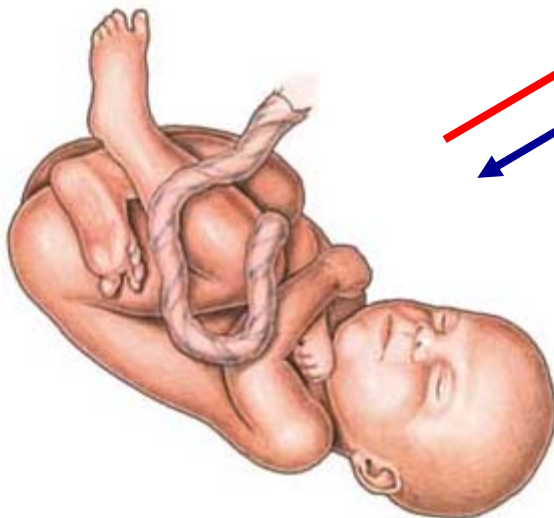
Consultation spécialisée
d'hémobiologie périnatale

Secteur Biologie Moléculaire
Activité de génotypage érythrocytaires
anténatal

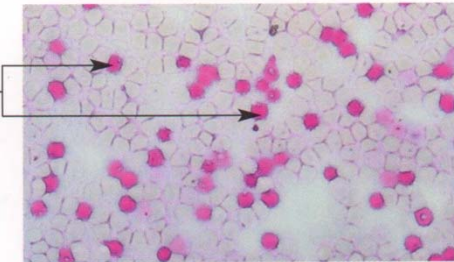
CNRHP Allo-immunisation érythrocytaire -mécanisme-

- ✓ Mère négative pour l'antigène
- ✓ Fœtus positif pour cet antigène

Hématies fœtales



Hématies fœtales



Synthèse d'Ig
maternelles
contre Ag
érythrocytaires

Passage
transplacentaire
des IgG

Hémolyse fœtale



- ✓ Anémie fœtale
- ✓ Anasarque
- ✓ Mort fœtale in utero
- ✓ Ictère nucléaire
- ✓ Séquelles neurologiques

Allo-immunisation érythrocytaire -prévention-

Prévention de l'allo-immunisation anti-RH1 (D) possible par injection d'IgRH d'origine humaine à toutes les femmes RH:-1 enceintes

- Prophylaxie systématique à 28SA (120 000 femmes RH:-1/ans)
- Prophylaxie ciblée: fausse couche
 amniocentèse
 traumatisme...



→génotypage foetal *RHD* non invasif permet une prophylaxie limitée aux seules femmes enceintes RH:-1 non allo-immunisées porteuses d'un foetus positif

Allo-immunisation érythrocytaire -épidémiologie au CNRHP-

CNRHP entre 2014 et 2016 : 22467 titrages et/ou dosages pondéraux pour 9491 femmes immunisées

Anticorps	anti-RH1 (D)	anti-RH3 (E)	anti-RH4 (c)	anti-KEL1
Fréquence	28%	16%	11%	4%

Anti-RH1, anti-KEL1, anti-RH4 et anti-RH3 peuvent conduire à un risque d'anémie fœtale sévère dès 18SA en fonction du taux d'anticorps

→ l'intégration du génotypage fœtal non invasif dans la prise en charge des femmes enceintes allo-immunisée pour ces 4 anticorps permet de légitimer une surveillance lourde aux seules patientes présentant un risque d'incompatibilité fœto-maternelle (porteuse d'un fœtus positif pour l'antigène)

CNRHP 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 circulant fœtal mis en évidence à partir de 5 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)

Lo YMD *et al.*, 1998, Am. J. Hum. Genet., **62** : 768-75

Lo YMD *et al.*, 1999, Am. J. Hum. Genet., **64** : 218-224

Lo YMD *et al.*, 2004, Clinical Chemistry, **50** (1) : 88-92

Nelly Da Silva, CNRHP

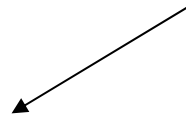
Le génotypage fœtal érythrocytaire non invasif

principe = déterminer les séquences fœtales dans le plasma maternel

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



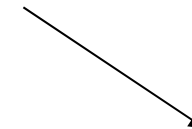
Identification
des séquences érythrocytaires
présentes chez le fœtus et
absentes chez la mère



Présence des séquences
FOETUS POSITIF



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



Absence des séquences
FOETUS NEGATIF
(diagnostique par défaut)

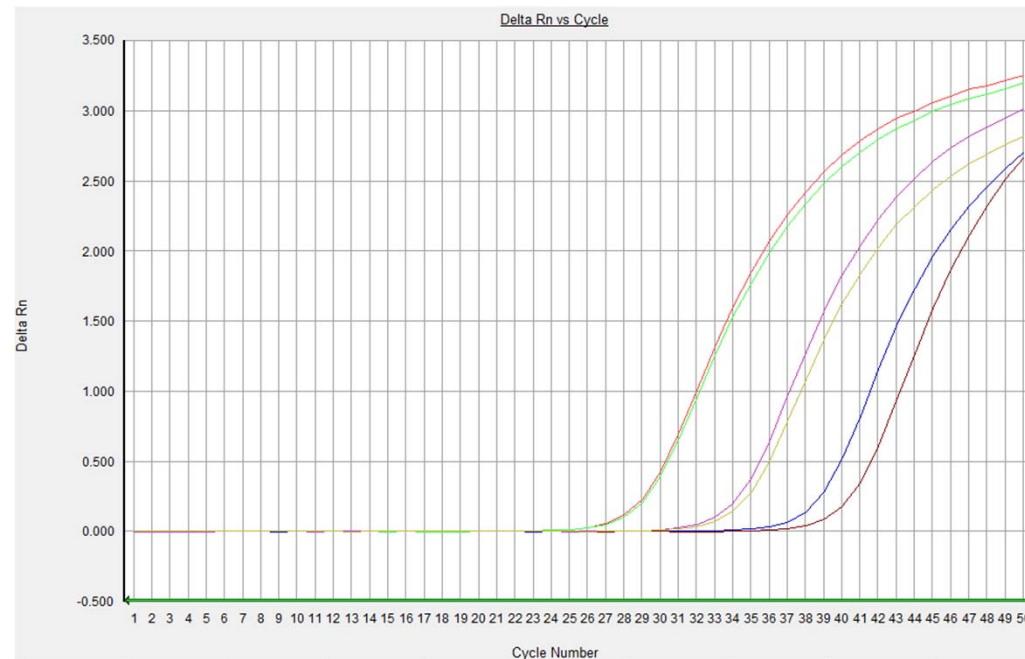


Absence de risque d'allo-immunisation
Compatibilité fœto-maternelle

Le génotypage fœtal érythrocytaire non invasif

-PCR en temps réel au CNRHP- 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:

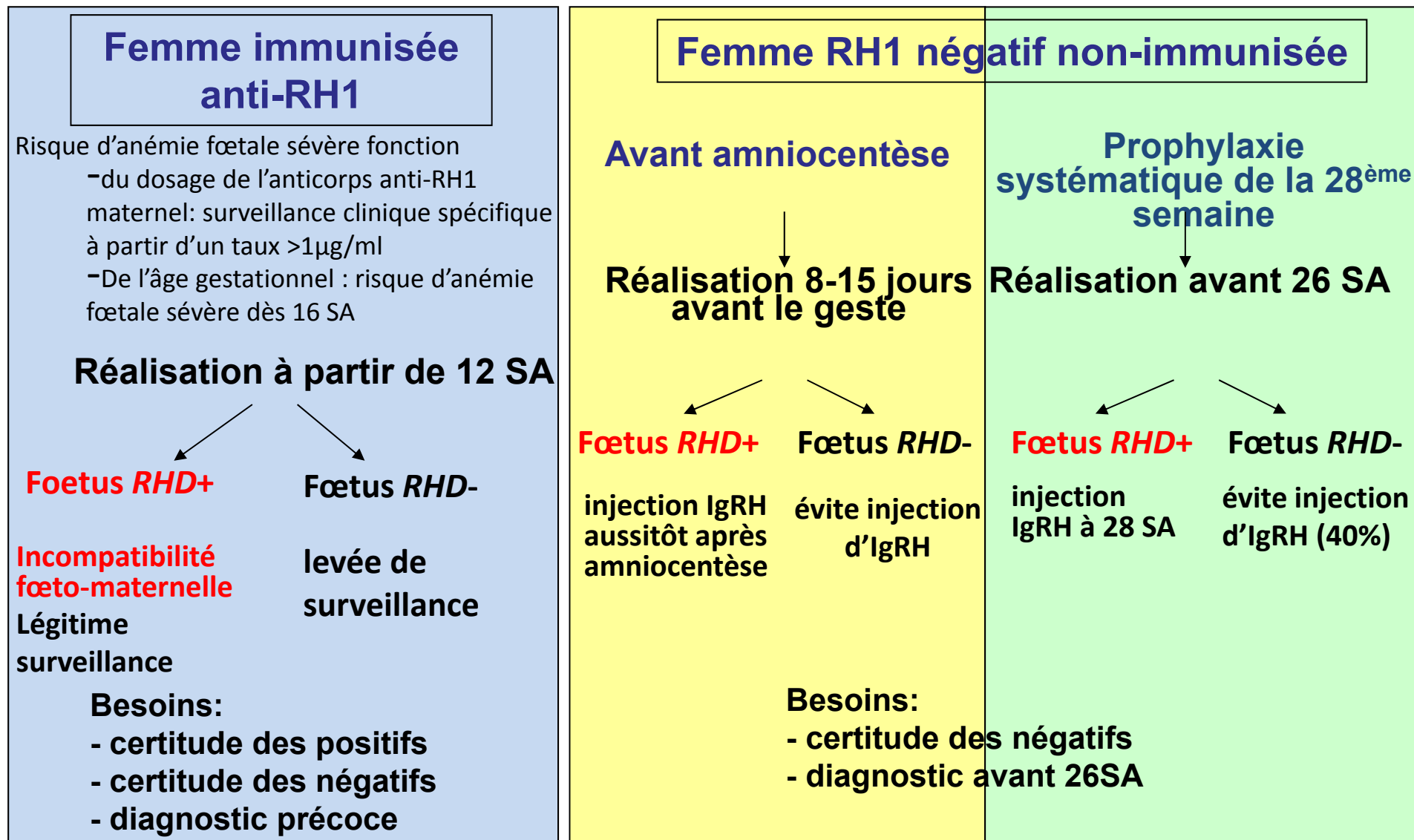
absence de signal = fœtus négatif

signal tardif $Ct > 35$ = fœtus positif

signal précoce $Ct < 30$ = signal maternel

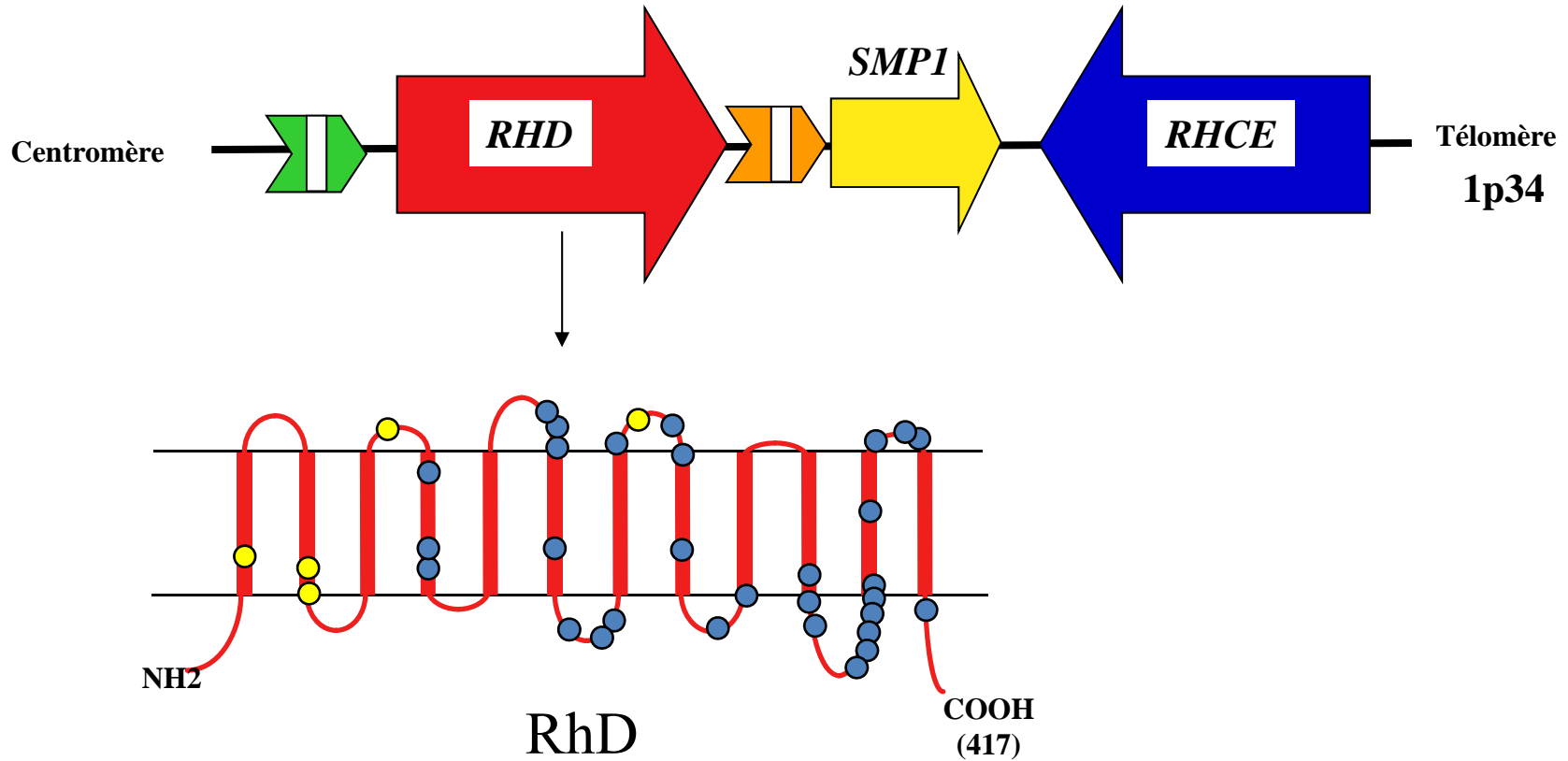
CNRHP Génotypage foetal RHD non invasif

-indications-



Génotypage foetal *RHD* non invasif

-séquences fœtales recherchées-
RH1 : gène *RHD*



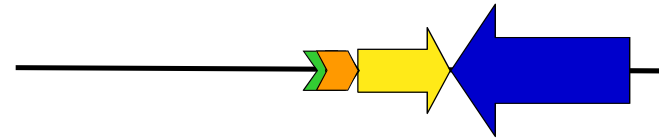
Antigène RhD : mosaïque d'épitopes présent sur toute la molécule
→ les séquences *RHD* fœtales à rechercher sont presque toutes les séquences *RHD* codantes (Exons 4-5-6-7)

Génotypage foetal *RHD* non invasif

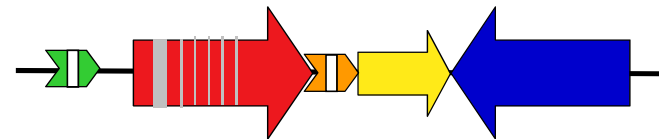
-séquences fœtales recherchées-
RH1 : gène *RHD*

RH:-1 maternel

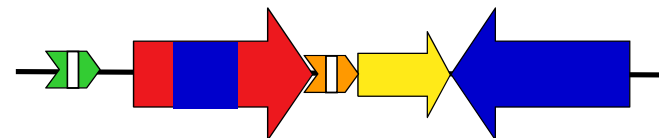
RHd
>99% des caucasiens RH:-1
33% des africains noirs RH:-1



RHdψ
66% des africains noirs RH:-1



D-CE(4-7)-D
33% des africains noirs RH:-1



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

1 Prélèvement de sang total

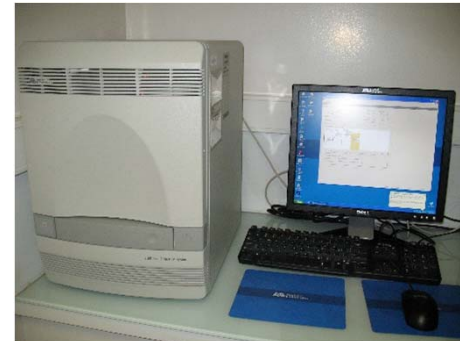
- sang collecté sur EDTA (2x7ml)
- patiente enceinte d'au moins 12SA
(tolérance à 11SA)
- reçu et congelé dans les 72h
(tolérance 5 jours)



2 Extraction d'ADN automatisée EasyMag (Biomerieux)



3 Amplification par PCR en temps réel ABI7300





Le génotypage fœtal *RHD* non invasif -méthode au CNRHP- accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 depuis septembre 2012

I- Test basé sur

1-l'amplification de l'ADN fœtal par l'utilisation du **Free DNA fetal kit RHD®** kit marqué CEIVD (European Community In Vitro Diagnostic) de Jacques Boy qui permet l'amplification de

-3 exons *RHD*: 5, 7 et 10

-1 ADN traceur (maïs) qui valide l'étape d'extraction

2-Amplification d'un exon *RHD* supplémentaire pour les patientes possédant un allèle *RHDψ*: l'exon ***RhD* exon 6**

3-Identification et caractérisation de certains allèles maternelles silencieux

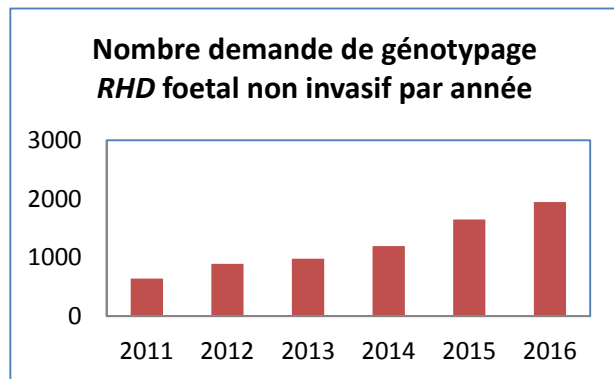
Finning et al, Transfusion, 2002

II-Pour prévenir le risque de faux négatif, tous les examens trouvés négatifs sont confirmés sur un second prélèvement ou sur liquide amniotique

CNRHP Le génotypage foetal RHD non invasif : -bilan sur 6 ans-

7282 femmes enceintes RH:-1 pour prévention

Agés gestationnels entre 12-38 SA



genotype fetal \ Allèle RHD maternel	RHD délété	RHDPsi	C(c)de	Autres RHD silencieux	Total
Fœtus +	4757	65	29		4851
Fœtus - confirmés +	23				23
Fœtus - non confirmés	684	13			697
Fœtus indéterminés	109	9	12	35	165
Fœtus - confirmés	1502	17			1519
Total	7075	104	41	35	7255

Injection IgRH

21% des grossesses sans risque d'allo-immunisation

sensibilité=98.4%
spécificité=95.3%
valeur prédictive positive=99,6%
Valeur prédictive négative=100%

CNRHP Le génotypage fœtal RHD non invasif : - bilan sur 6 ans -

1322 femmes enceintes allo-immunisées anti-RH1

Taux d'anticorps anti-RH
58% < 1µg/ml
42% ≥ 1µg/ml

Âges gestationnels
56% entre 12-18 SA

genotype fetal \ Allèle RHD maternel	RHD délété	RHDpsi	C(c)de	Autres RHD silencieux	Total
Fœtus +	957	65	25	-	1047
Fœtus - confirmés +	1	-	-	-	1
Fœtus - non confirmés	26	4	-	-	30
Fœtus indéterminés	13	7	1	20	41
Fœtus - confirmés	194	9	-	-	203
Total	1191	85	26	20	1322

Surveillance anténatale spécifique en fonction du taux d'anticorps

20% des grossesses sont compatibles

sensibilité=98.4%
spécificité=95.3%
valeur prédictive positive=99,6%
Valeur prédictive négative=100%

CNRHP **Génotypage foetal *KEL1* non invasif**

-indication-

**Femme immunisée
anti-KEL1**

Risque d'anémie foetale sévère fonction

- du titre de l'anticorps anti-KEL1 maternel: surveillance clinique spécifique démarrée à partir d'un titre supérieur au 1/32
- De l'âge gestationnel : risque d'anémie foetale sévère dès 16 SA

- Réalisation à partir de 13 SA
- Proposé lorsque titre en anti-KEL1 > au 1/32
- Conjoint hétérozygote KEL1/KEL2

Fœtus *KEL1* +

**Incompatibilité
fœto-maternelle
légitime
surveillance**

Fœtus *KEL1* -

levée de
surveillance

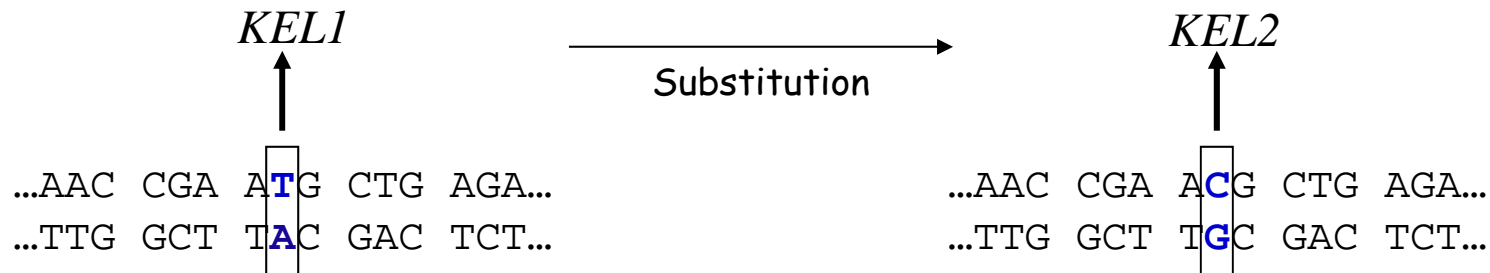
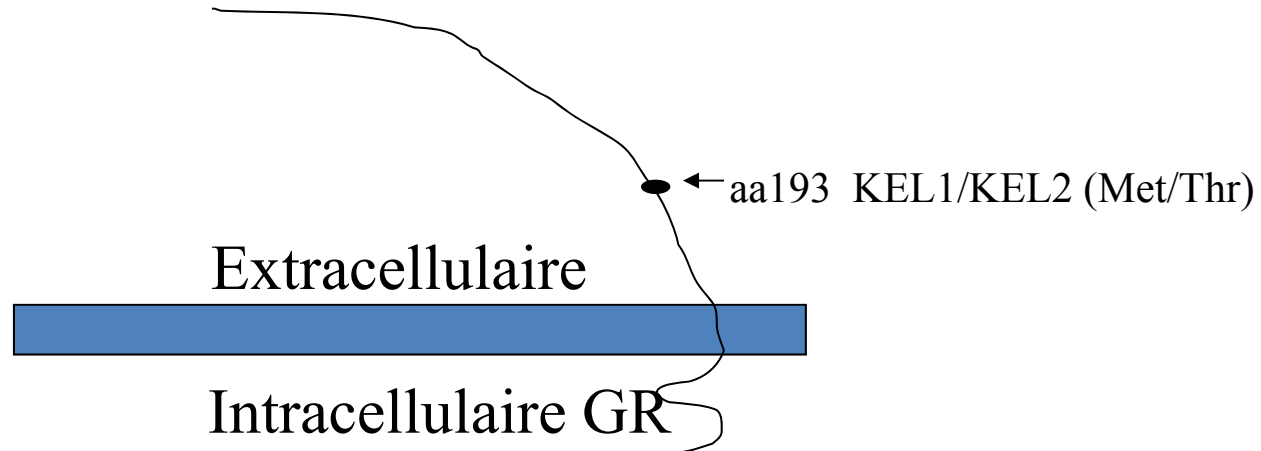
Besoins:

- certitude des positifs
- certitude des négatifs
- diagnostic précoce

Génotypage foetal *KEL1* non invasif

-séquence foetale recherchée-

KEL1 : polymorphisme ponctuelle gène *KEL*





Génotypage foetal *KEL1* non invasif

-méthode au CNRHP-

accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 depuis
septembre 2013

I-Teste basé sur

1-PCR allèle *KEL1* spécifique en temps réel (SyberGreen)
réalisé en **triplicate**

⇒ mise en évidence d'ADN foetal *KEL1*

2-PCR de l'exon 7 du gène *ABO* en temps réel (SyberGreen)
réalisé en **simplicite**

⇒ représentation de la **quantité d'ADN maternelle**

3-PCR d'un DNA traceur (*Mais*) en temps réel (TaqMan)

⇒ **validation** de l'étape d'extraction

II-Pour prévenir le risque d'erreur, tous les examens sont conclus sur 2
extractions et amplifications indépendantes et vérifiés sur un 2^{ème}
échantillon prélevé plus tard au cours de la grossesse

CNRHP Le génotypage foetal *KEL1* non invasif -technique au CNRHP-

- 1** Prélèvement de sang total
-collecté sur EDTA
-patiente enceinte d'au moins 13SA
(tolérance à 12SA)
-reçu et congelé dans les 48h
(tolérance 72h)



- 2** Extraction d'ADN automatisée EasyMag
(Biomerieux)



- 3** Amplification par PCR en temps réel
ABI7300



CNRHP Le génotypage foetal *KEL1* non invasif : -bilan sur 6 ans-

272 femmes enceintes allo-immunisées anti-*KEL1*

Titres d'anticorps anti-*KEL1*

22% < 32

78% ≥ 32

Âges gestationnels

62% entre 12-18 SA

	<i>KEL1</i>
Fœtus - confirmé	122
Fœtus - non confirmé	21
Fœtus + confirmé	85
Fœtus + non confirmé	32
Fœtus indéterminé	12

Surveillance anténatale
spécifique en fonction
du titre d'anticorps

47% des grossesses sont compatibles

sensibilité=96%
spécificité=69,2%
valeur prédictive positive=96%
Valeur prédictive négative=100%

CNRHP *Génotypage foetal RHc non invasif* -indication-

**Femme immunisée
anti-RH4 (anti-c)**

Risque d'anémie foetale sévère fonction

- du dosage de l'anticorps anti-Rhc maternel: surveillance clinique spécifique démarrée à partir d'un taux > à 500 UCHP/ml
- de l'âge gestationnel : risque d'anémie foetale sévère dès 18 SA

- Réalisation à partir de 13 SA
- Proposé quelque soit la concentration en anticorps car risque de réactivation
- Conjoint hétérozygote RH2/RH4 (45%)

Fœtus RHc +

**Incompatibilité
fœto-maternelle
légitime
surveillance**

Fœtus RHc-

**levée de
surveillance**

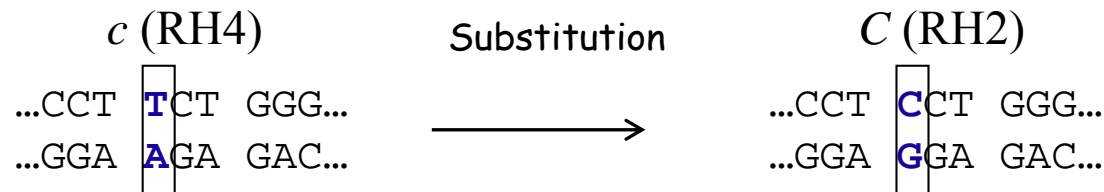
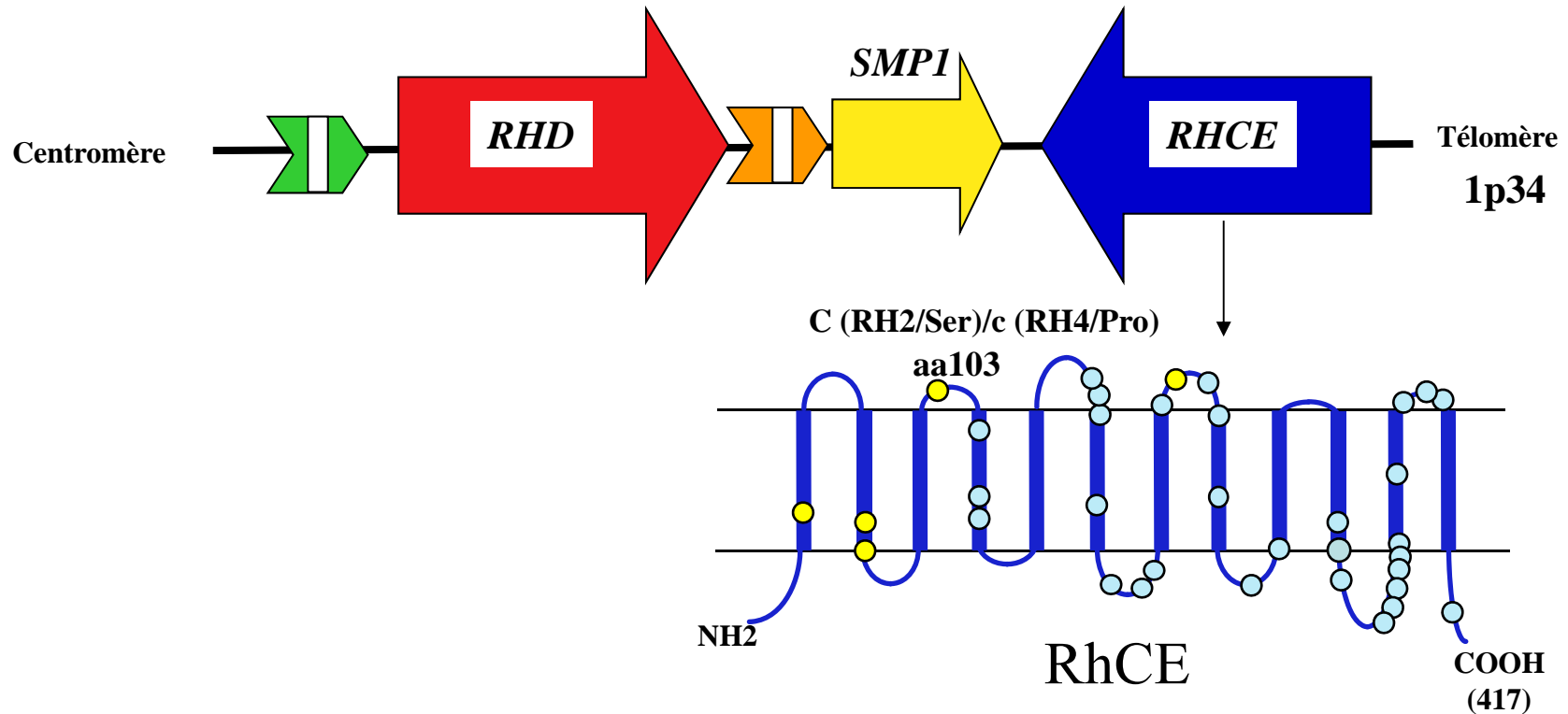
Besoins:

- certitude des positifs
- certitude des négatifs
- diagnostic précoce

Génotypage foetal *RHc* non invasif

-séquence foetale recherchée-

RH4 : polymorphisme ponctuelle gène *RHCE*



Génotypage foetal *RHc* non invasif : -méthode au CNRHP-

I-Teste basé sur

1-PCR allèle *RHc* spécifique en temps réel (TaqMan)
réalisé en triplicate

⇒ mise en évidence d'ADN foetal *RHc*

Finning et al, Transfusion, 2007

2-PCR d'un DNA traceur (*Mais*) en temps réel (TaqMan)

⇒ validation de l'étape d'extraction

II-Pour prévenir le risque d'erreur, tous les examens négatifs sont conclus sur 2 extractions et amplifications indépendantes et vérifiés sur un 2^{ème} échantillon prélevé plus tard au cours de la grossesse

CNRHP Le génotypage foetal RHC non invasif -technique au CNRHP-

1 Prélèvement de sang total

- collecté sur EDTA
- patiente enceinte d'au moins 13SA
(tolérance à 12SA)
- reçu et congelé dans les 72h
(tolérance 5 jours)



2 Extraction d'ADN manuelle

Kit QIAamp MinElute® Virus Vaccum Kit
(QIAGEN)



3 Amplification par PCR en temps réel ABI7300



CNRHP Le génotypage foetal RHc non invasif : -bilan sur 1 an-

68 femmes enceintes allo-immunisées anti-RH4

Titres d'anticorps anti-RH4

76% < 500 UCHP/ml

24% ≥ 500 UCHP/ml

Âges gestationnels

49% entre 12-18 SA

	<i>RHc</i>
Fœtus - confirmé	13
Fœtus + confirmé	55

Surveillance anténatale
spécifique en fonction
du titre d'anticorps

20% des grossesses sont compatibles

sensibilité=100%
spécificité=100%
valeur prédictive positive=100%
Valeur prédictive négative=100%

CNRHP *Génotypage foetal RHE non invasif* -indication-

**Femme immunisée
anti-RH3 (anti-E)**

Risque rare d'anémie foetale sévère et essentiellement au 3eme trimestre de la grossesse

- Réalisation à partir de 13 SA
- Proposé pour des taux importants en anticorps > à 500 UCHP/ml
- Conjoint hétérozygote RH3/RH5

Fœtus *RHE +*

**Incompatibilité
foeto-maternelle
légitime
surveillance**

Fœtus *RHE -*

**levée de
surveillance**

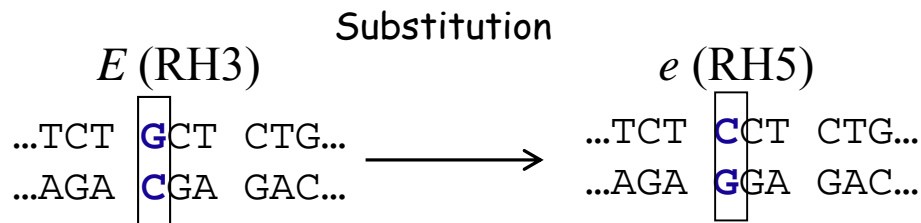
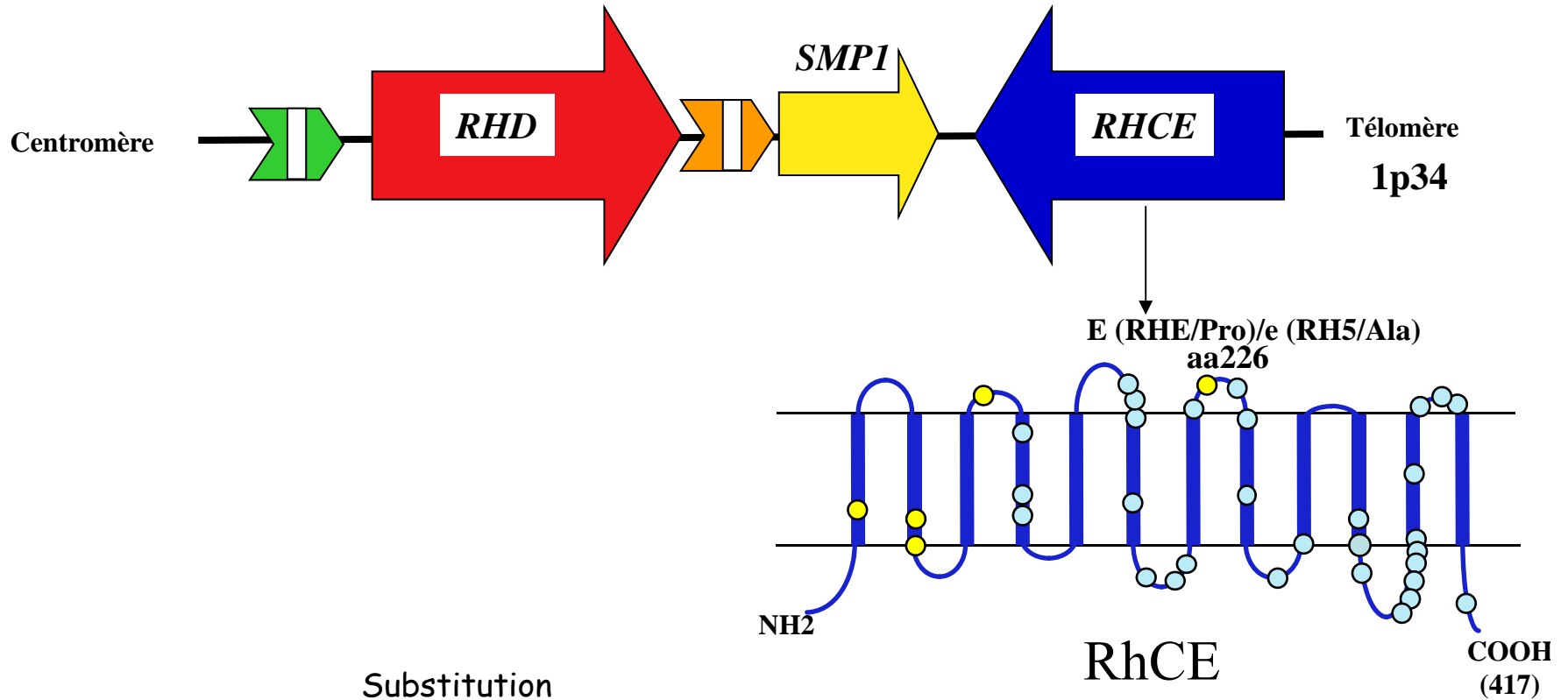
Besoins:

- certitude des positifs
- certitude des négatifs
- diagnostic précoce

Génotypage foetal *RHE* non invasif

-séquence foetale recherchée-

RH3 : polymorphisme ponctuelle gène *RHCE*



I-Teste basé sur

1-PCR allèle *RHE* spécifique en temps réel (TaqMan)
réalisé en triplicate

⇒ mise en évidence d'ADN foetal *RHE*

Finning et al, Transfusion, 2007

2-PCR d'un DNA traceur (*Mais*) en temps réel (TaqMan)

⇒ validation de l'étape d'extraction

II-Pour prévenir le risque d'erreur, tous les examens négatifs sont conclus sur 2 extractions et amplifications indépendantes et vérifiés sur un 2^{ème} échantillon prélevé plus tard au cours de la grossesse

CNRHP Le génotypage foetal RHE non invasif -technique au CNRHP-

1 Prélèvement de sang total

- collecté sur EDTA
- patiente enceinte d'au moins 13SA
(tolérance à 12SA)
- reçu et congelé dans les 72h
(tolérance 5 jours)

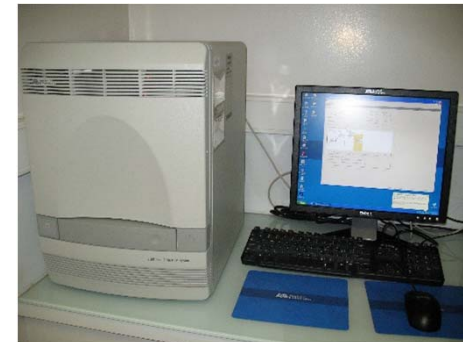


2 Extraction d'ADN manuelle

Kit QIAamp MinElute® Virus Vaccum Kit
(QIAGEN)



3 Amplification par PCR en temps réel ABI7300



CNRHP Le génotypage foetal RHE non invasif : - bilan sur 1 an -

26 femmes enceintes allo-immunisées anti-RHE

Titres d'anticorps anti-RHE

85% < 700 UCHP/ml

15% ≥ 700 UCHP/ml

Âges gestationnels

54% entre 12-18 SA

	<i>RHc</i>
Fœtus - confirmé	15
Fœtus + confirmé	11

Surveillance anténatale
spécifique en fonction
du titre d'anticorps

42% des grossesses sont compatibles

sensibilité=100%
spécificité=100%
valeur prédictive positive=100%
Valeur prédictive négative=100%

Conclusion et perspective

I-Le CNRHP dispose de tests non invasifs avec une VPN du test de 100% permettant de diagnostiquer les incompatibilités fœto-maternelles RH1, KEL1, RH4 et RH3 afin de guider le suivi anténatal chez les femmes immunisées

→ entre 2011-2016, **353 patientes ne présentaient aucun risque d'incompatibilité fœto-maternelles** et n'ont pas eu de surveillance anténatale spécifique

II-Développement d'une nouvelle technique de génotypage fœtal non invasif pour diagnostiquer les incompatibilités fœto-maternelles MNS1 (M) ou FY1 (Fy^a) qui sont aussi impliquées dans des anémies fœtales sévères rares.

