



Plateforme APHP de Dépistage Prénatal Non Invasif des aneuploïdies fœtales sur ADN libre circulant

Dr Laïla EL KHATTABI

Service de Cytogénétique pré et post-natale, HUPC – Cochin

**Association des Biologistes Agréés pour le Dépistage de la trisomie 21
Assemblée Générale - Journée de Formation du 13 Juin 2018**

**Plateforme APHP de Dépistage Prénatal Non Invasif des aneuploïdies
fœtales sur ADN libre circulant**

APHP HUPC – Cochin

Service de Cytogénétique pré et postnatale / Plateforme NGS
Bâtiment Jean Dausset à Cochin

- AO APHP 2015 plateforme supra-GH
- Ouverture en Mai 2017
- Activité présente dans l'hôpital depuis Janvier 2016



**Plateforme APHP de Dépistage Prénatal Non Invasif des aneuploïdies
fœtales sur ADN libre circulant**

APHP HUPC – Cochin

Service de Cytogénétique pré et postnatale / Plateforme NGS

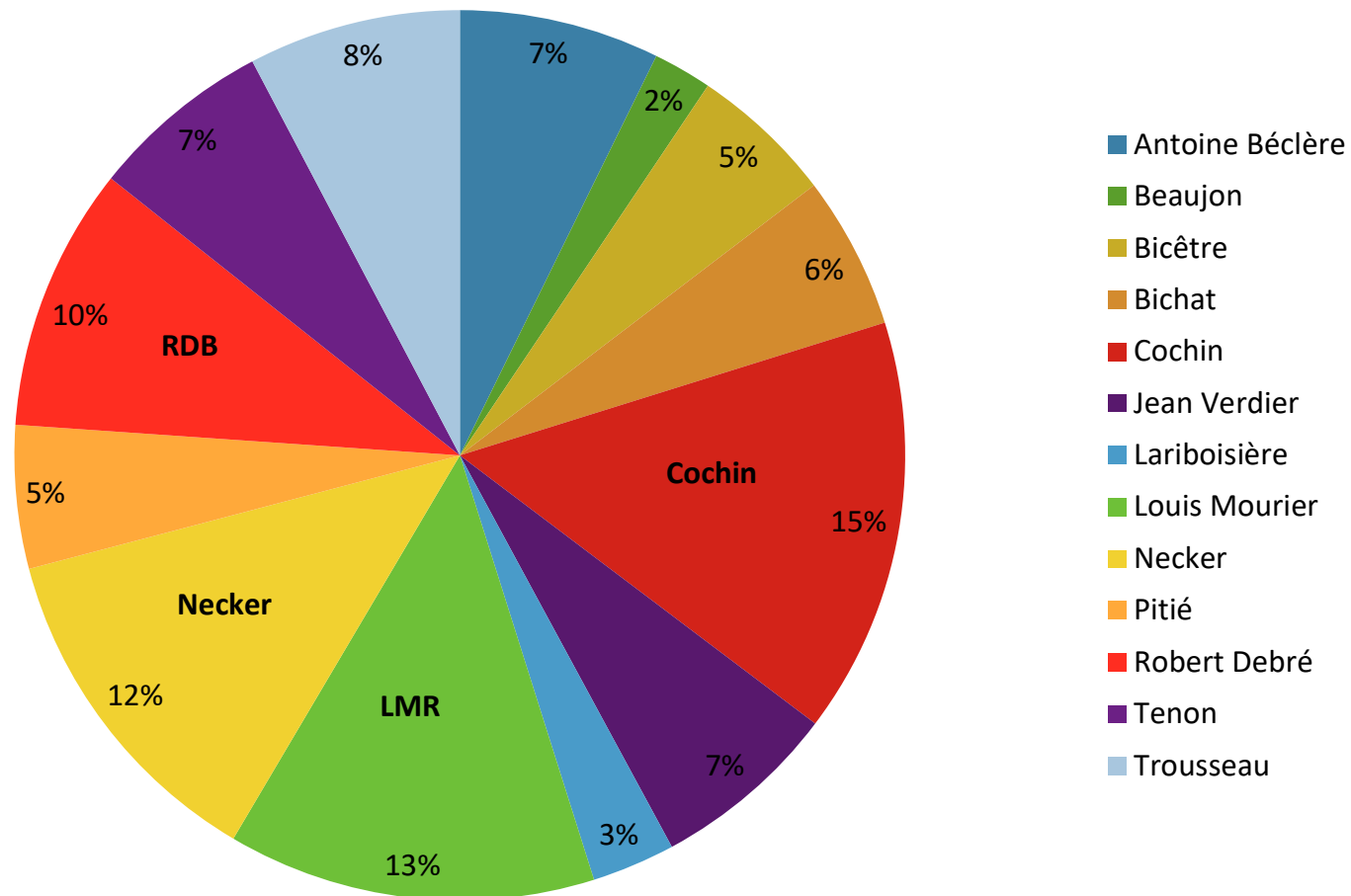
Bâtiment Jean Dausset à Cochin

DPNI pour les 13
Maternités de l'APHP



**Plateforme APHP de Dépistage Prénatal Non Invasif des aneuploïdies
fœtales sur ADN libre circulant**
APHP HUPC – Cochin
Service de Cytogénétique pré et postnatale / Plateforme NGS
Bâtiment Jean Dausset à Cochin

Origine des prélèvements



Processus technique

VeriSeq NIPT Illumina, approche NGS

Pré-analytique

Analytique
« Wet Lab »

Analytique
« Dry Lab »



- Tubes cfDNA BCT Streck
- Conditions de conservation et
de centrifugation

Extraction de l'ADN
Librairies de séquençage
48-96 échantillons

Séquençage
48 échantillons

Analyse bioinformatique et
statistique

Patient 1

TTACCGACGGAGATCCGATCGGCTTACCATCGATCGGATCGGAT
TTACCGACGTGATTCCGTCATGCCAAGTGTTACCGTAGATCGATGCAG
TTACCGACGAAGTGCCGCTCCTAGCAGTATTACGTCGTATCCGACCGGATAA

Patient 2

AGTGACCTATGGCTCCAGGGTATAACCGAACTGCATCGTAGCAATGCCGTC
AGTGACCTTGTAAGTTAGCCGCTATCGATCGTTCAACGAATCGCCGATTCAA

Patient 3

TCGGATTCCGACCGTAGTAATGCCGATCGAGCTGATCGGAATGGCTTAGCTGA
TCGGATTCCGAGATCCGATCGGCTTACCATCGATCGGATCGGAT

•
•
•

etc

Analyse des données

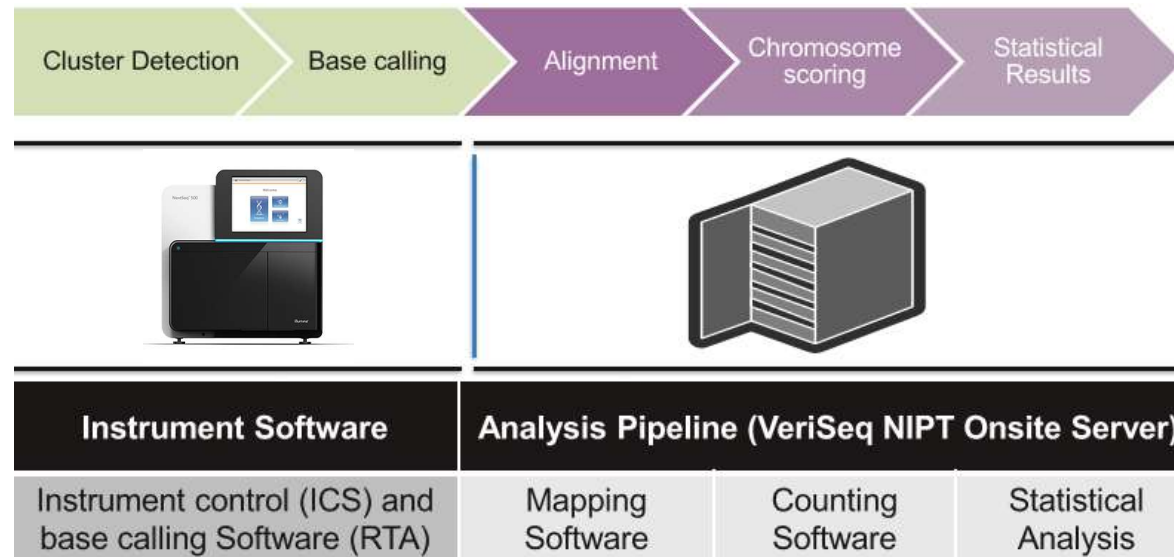


Image modifiée, source: Illumina

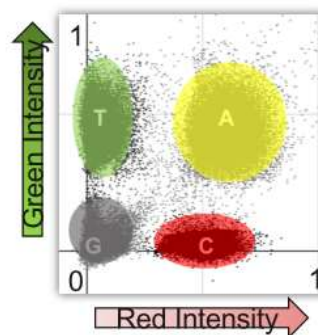
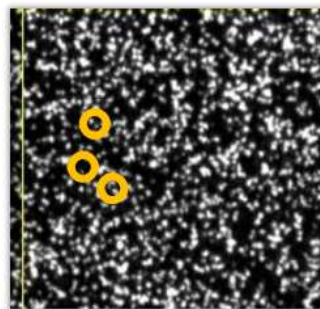
Analyse des données



Instrument Software

Instrument control (ICS) and
base calling Software (RTA)

Image modifiée, source: Illumina

[illegible]

Séquence + qualité

Analyse des données

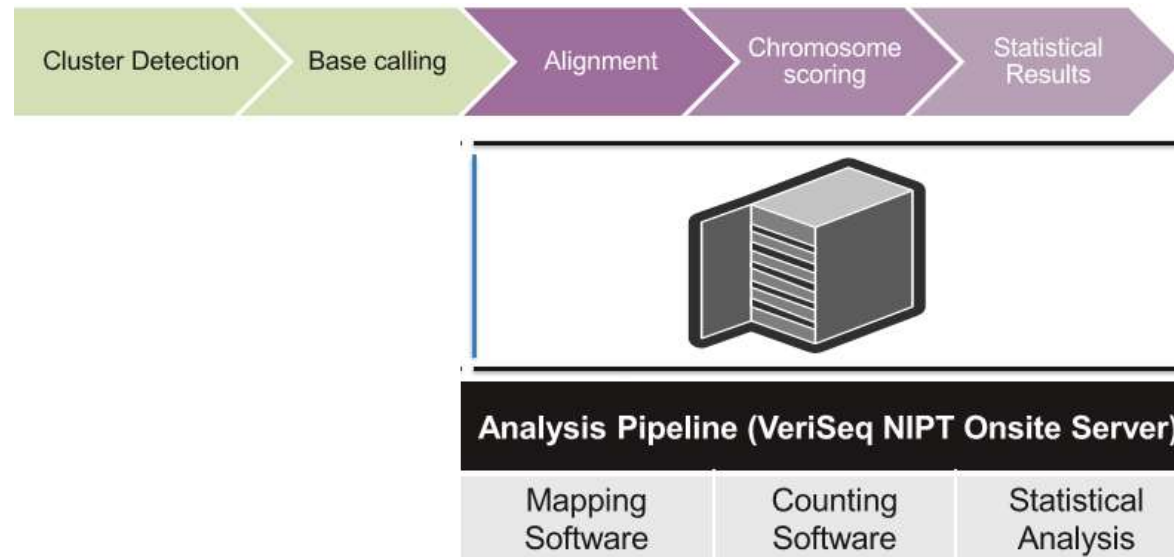


Image modifiée, source: Illumina

Alignement au génome de référence humain

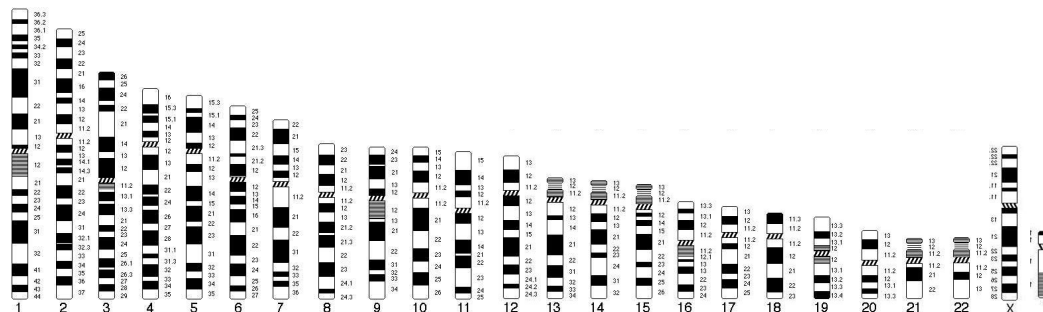
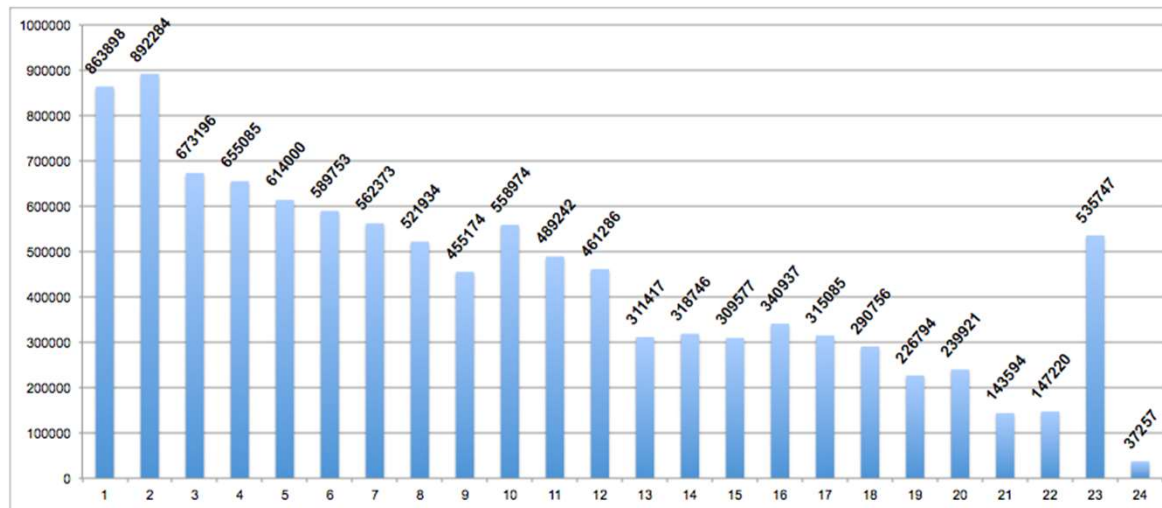
CATGGCTAAGACCCCTAGTGACCATCTGCTGTCCACCCTGGAGGAG	→	Chr16
TTCCTCTGGATTGGCGGTGATGCCTGGCAGCATGGAAATGCCAGT	→	Chr11
TCTGATGTTGTGAAAAAAGCTTACGCTTTGCCTCCACTCAAACCAG	→	Chr1
GCCCAGCCCATGATTCCCATATGCCC TGTAGTTTCTTTCACCTAT	→	Chr5
GCTGCGCCAGGGCCTCCTGGGCCAACGGCTGCCGCCCCGCCCCGTC	→	Chr7
AACGGGAGGGAGGCACAGGCGCTTGCTTGCAGGAGTCAGCTCTGCC	→	Chr8
AGGGAAGGTTGGCAGAGGGATCCATGTGACTGAGGCCGGAGCACGGCA	→	Chr21

Analyse des données



Calcul du Score chromosomique

Comptage des séquences par chromosome



Analyse des données



Calcul du Score chromosomique

Ratio chromosomique

$$\text{RC} = \frac{\text{n séquences (reads) chr d'intérêt}}{\text{n séquences (reads) chrs de référence (propriété Illumina)}}$$

Z-score (« Normalized Chromosomal Value »)

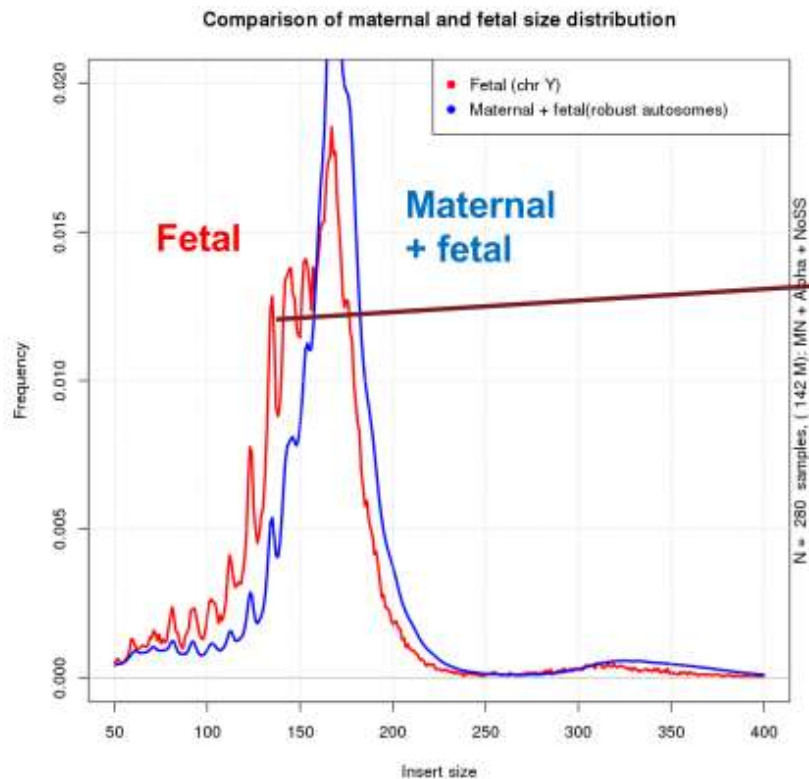
$$\text{NCV} = \frac{\text{RC}_{\text{patient}} - \text{moy RC}_{\text{pop euploide}}}{\text{Ecart-Type RC}_{\text{pop euploide}}}$$

Analyse des données



Calcul du Score chromosomique

Intégration de données de tailles de fragments



Higher portion of shorter fragments are fetal in origin

Analyse des données

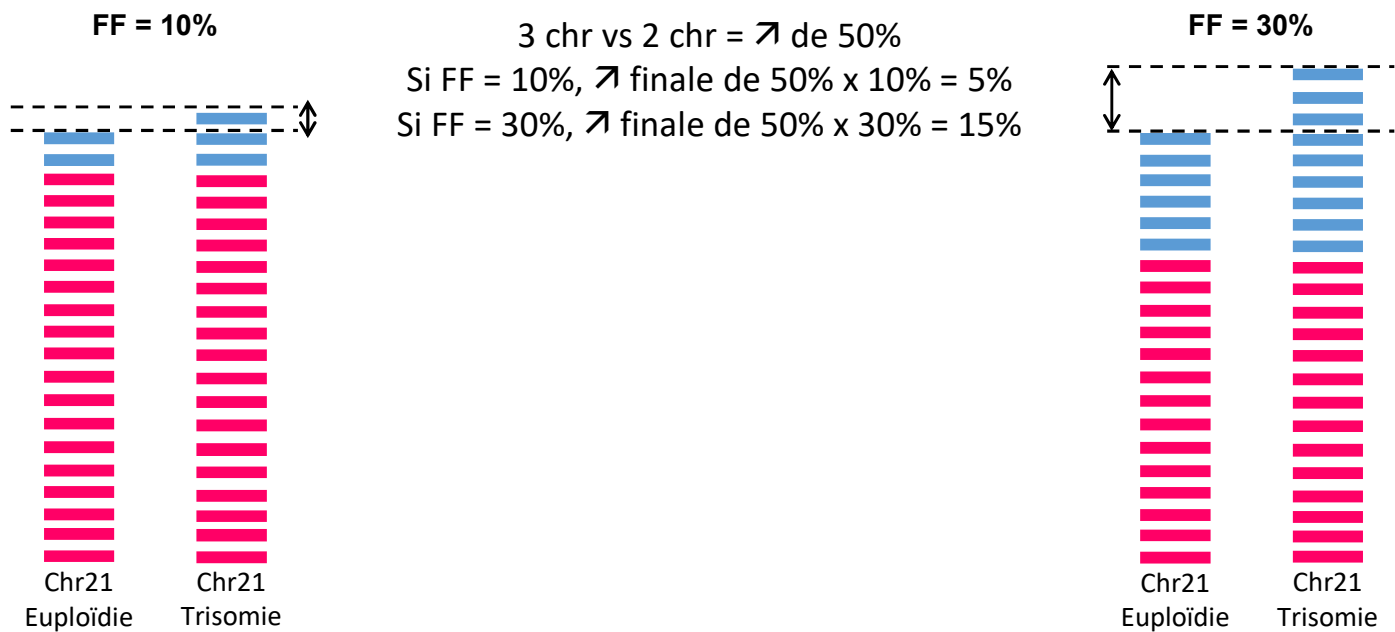


Calcul statistique

Intégration du calcul de la fraction fœtale

En cas de trisomie, corrélation positive entre la proportion d'ADNfc et le score chromosomique du chr trisomique

Plus la fraction fœtale sera élevée, plus le score sera élevé

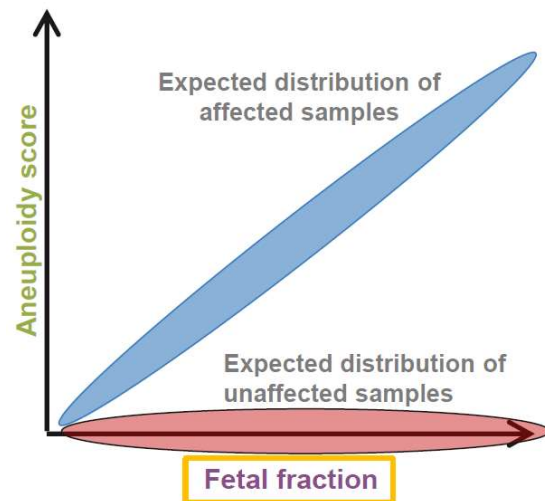


Analyse des données



Calcul statistique

Intégration du calcul de la fraction fœtale



$$LLR = \frac{A \text{ (considering } Q)}{B}$$

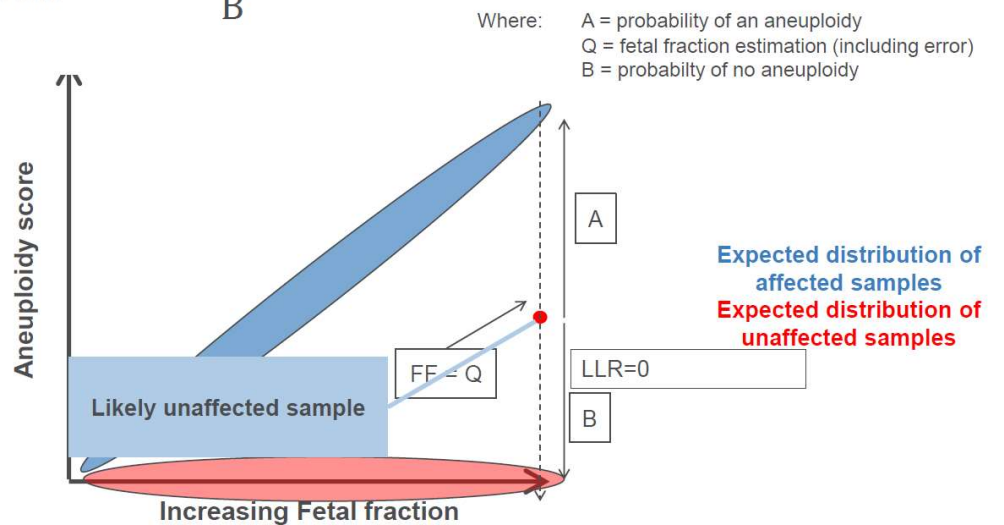
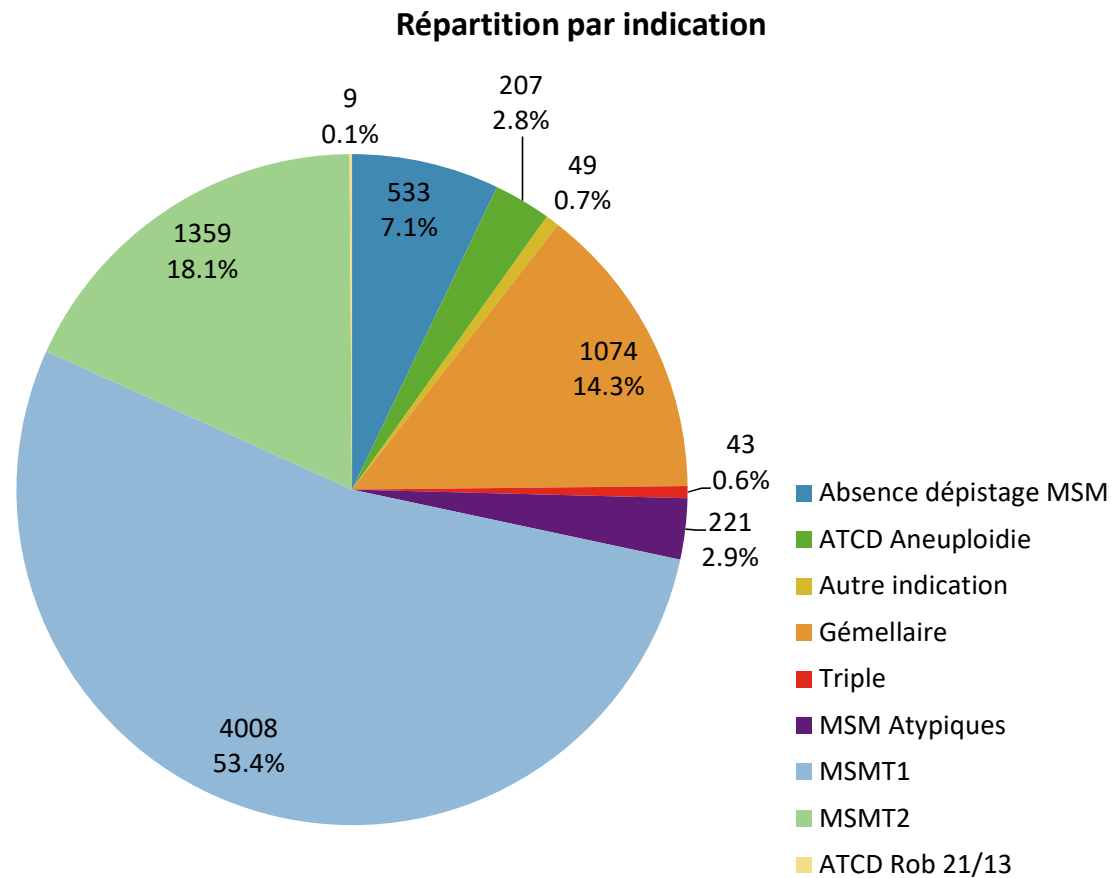


Image modifiée, source: Illumina

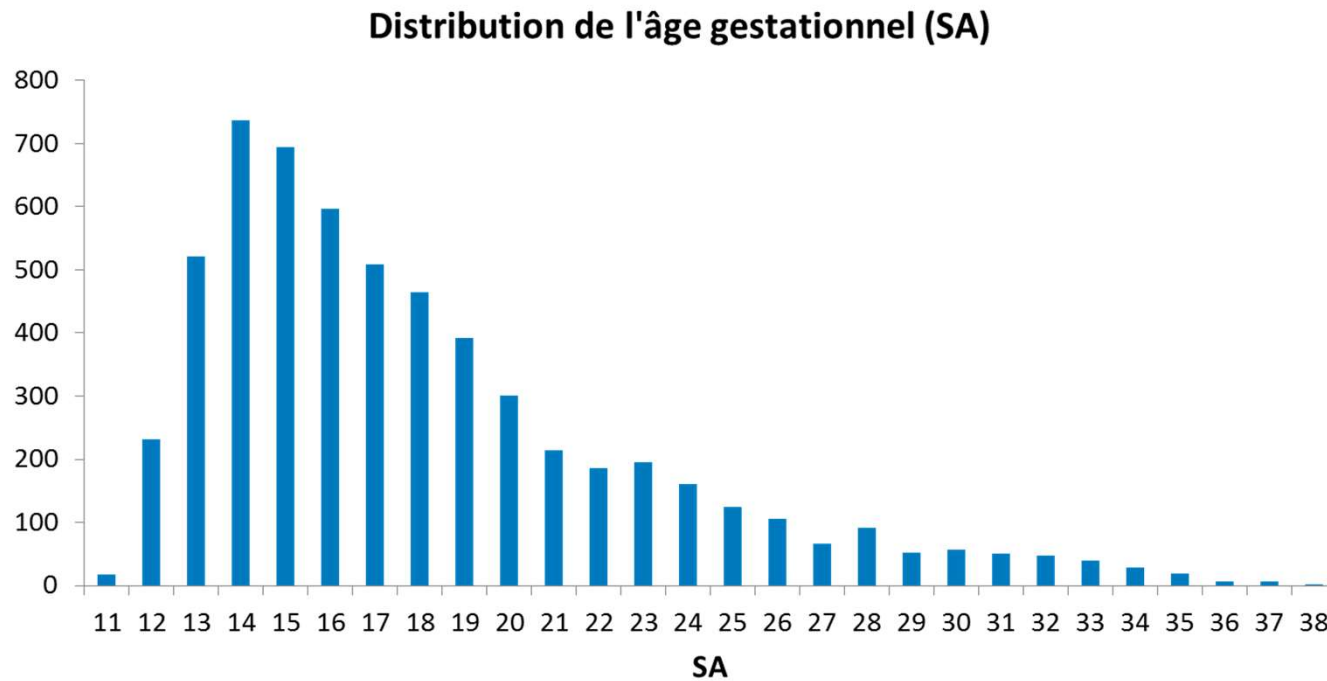
Données clinico-biologiques de la plateforme DPNI APHP

- 7503 échantillons analysés



Données clinico-biologiques de la plateforme DPNI APHP

- Age gestationnel moyen : 18 SA (11 - 38)
 - Singleton : 18,2 SA Multiple : 16,8 SA



Données clinico-biologiques de la plateforme DPNI APHP

- 1,4 % de trisomies (13, 18 et 21)
- Performances

	Sensibilité	Spécificité
T21	100% (IC95% = 89-100)	99% (98-100)
T13	100% (IC95% = 20-100)	99% (98-100)
T18	100% (IC95% = 20-100)	99% (98-100)

Données clinico-biologiques de la plateforme DPNI APHP

- 1,4 % de trisomies (13, 18 et 21)
- Performances

	Sensibilité	Spécificité
T21	100% (IC95% = 89-100)	99% (98-100)
T13	100% (IC95% = 20-100)	99% (98-100)
T18	100% (IC95% = 20-100)	99% (98-100)

Table 1. Cell-free DNA Test Performance Characteristics in Patients Who Receive an Interpretable Result* ⇐

			Age 25 years	Age 40 years
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	PPV (%)
Trisomy 21	99.3	99.8	33	87
Trisomy 18	97.4	99.8	13	68
Trisomy 13	91.6	99.9	9	57
Sex chromosome aneuploidy	91.0	99.6	†	

The American College of Obstetricians and Gynecologists - Committee on Genetics
Committee Opinion - Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy. 2015

Données clinico-biologiques de la plateforme DPNI APHP

- 1,4 % de trisomies (13, 18 et 21)

- Performances

	Sensibilité	Spécificité
T21	100% (IC95% = 89-100)	99% (98-100)
T13	100% (IC95% = 20-100)	99% (98-100)
T18	100% (IC95% = 20-100)	99% (98-100)

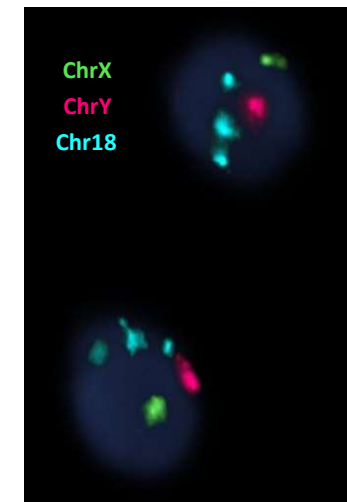
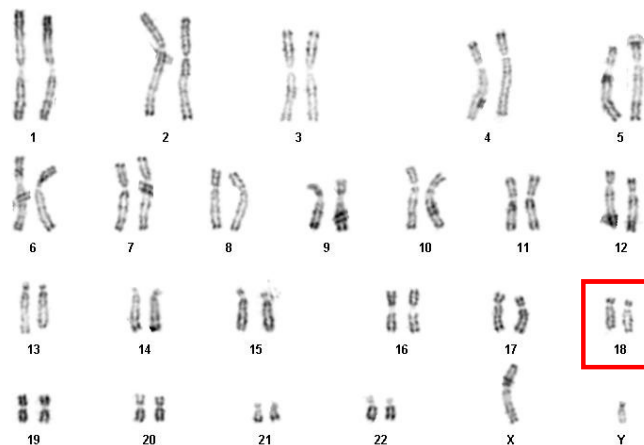
- FP :

- mosaïques confinées au placenta

Caryotype sur LA: 46, XY

FISH sur Placenta à terme : T18

DPNI T18



Données clinico-biologiques de la plateforme DPNI APHP

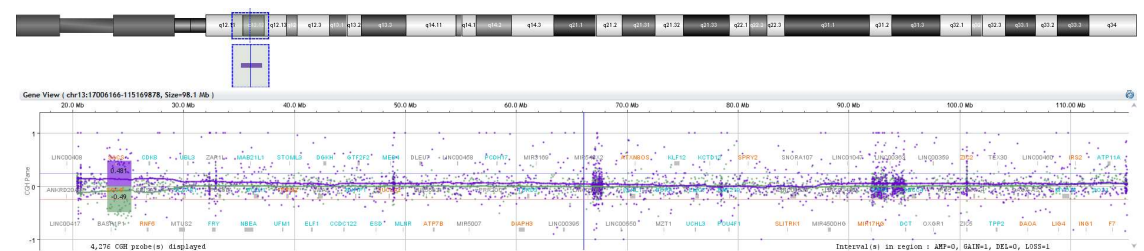
- 1,4 % de trisomies (13, 18 et 21)

- Performances

	Sensibilité	Spécificité
T21	100% (IC95% = 89-100)	99% (98-100)
T13	100% (IC95% = 20-100)	99% (98-100)
T18	100% (IC95% = 20-100)	99% (98-100)

- FP :
 - mosaïques confinées au placenta
 - CNV maternel

DPNI T13 → Caryotype sur LA : N → Etude de l'ADN maternel lymphocytaire par ACPA: Duplication de 2 Mb (13q12,12)



Données clinico-biologiques de la plateforme DPNI APHP

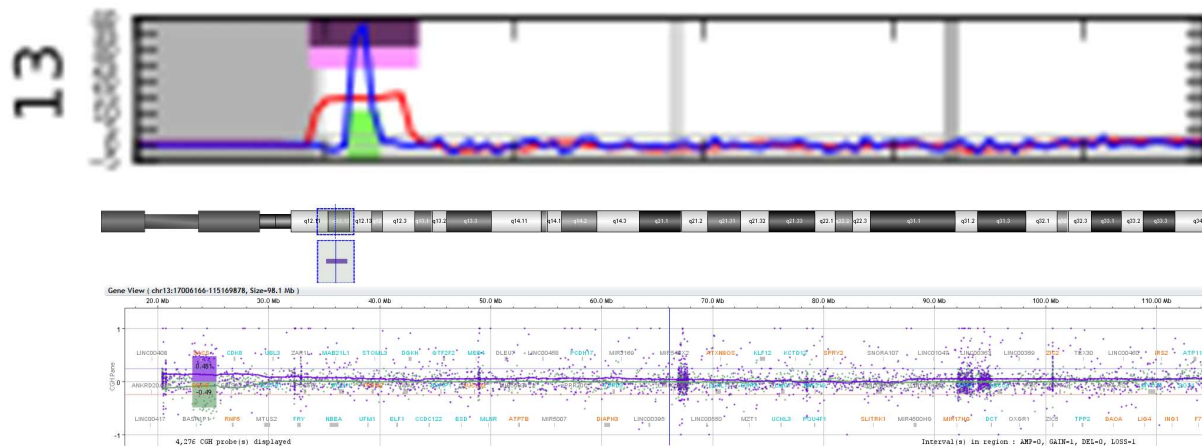
- 1,4 % de trisomies (13, 18 et 21)

- Performances

	Sensibilité	Spécificité
T21	100% (IC95% = 89-100)	99% (98-100)
T13	100% (IC95% = 20-100)	99% (98-100)
T18	100% (IC95% = 20-100)	99% (98-100)

- FP :

- mosaïques confinées au placenta
- CNV maternel



Données clinico-biologiques de la plateforme DPNI APHP

- 1,4 % de trisomies (13, 18 et 21)

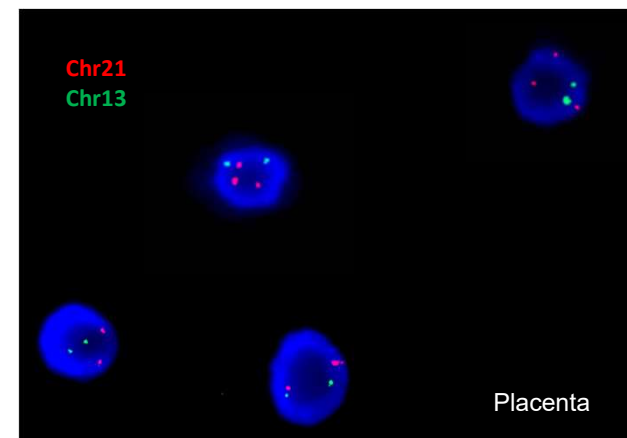
- Performances

	Sensibilité	Spécificité
T21	100% (IC95% = 89-100)	99% (98-100)
T13	100% (IC95% = 20-100)	99% (98-100)
T18	100% (IC95% = 20-100)	99% (98-100)

- FP

- FN: 1 seul cas T21 (mosaïque à 30%)

DPNI T13 → Caryotype sur LA : N → FISH sur Placenta post-IMG



Données clinico-biologiques de la plateforme DPNI APHP

- 1,7 % d'échec au 1^{er} prélèvement / 0,5 % au 2^e prélèvement

Fraction fœtale / Pb Biologique (Référence) / Pb technique (Séquence)

Données clinico-biologiques de la plateforme DPNI APHP

- 1,7 % d'échec au 1^{er} prélèvement / 0,5 % au 2^e prélèvement

Fraction fœtale / Pb Biologique (Référence) / Pb technique (Séquence)

- Plus élevé dans les grossesses multiples

	Singleton	Multiple
Echec 1er pvt	0,98 %	6,2 %

Données clinico-biologiques de la plateforme DPNI APHP

- 1,7 % d'échec au 1^{er} prélèvement / 0,5 % au 2^e prélèvement

Fraction fœtale / Pb Biologique (Référence) / Pb technique (Séquence)

- Plus élevé dans les grossesses multiples

	Singleton	Multiple
Echec 1er pvt	0,98 %	6,2 %

- 28 % Récurrence

	Singleton	Multiple
Echec 1er pvt	0,98 %	6,2 %
Récurrence	35,6 %	22,4 %
	↓	↓
	0,34 %	1,4 %
	Qualité de séquence +++	Fraction Fœtale +++

Discussion

- Performances comparables a celles de la literature

	Sensibilité	Spécificité
T21	100% (IC95% = 89-100)	99% (98-100)
T13	100% (IC95% = 20-100)	99% (98-100)
T18	100% (IC95% = 20-100)	99% (98-100)

Table 1. Cell-free DNA Test Performance Characteristics in Patients Who Receive an Interpretable Result* ⇐

			Age 25 years	Age 40 years
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	PPV (%)
Trisomy 21	99.3	99.8	33	87
Trisomy 18	97.4	99.8	13	68
Trisomy 13	91.6	99.9	9	57
Sex chromosome aneuploidy	91.0	99.6	-- [†]	--

The American College of Obstetricians and Gynecologists - Committee on Genetics
 Committee Opinion - Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy. 2015

Discussion

- Performances comparables a celles de la littérature
- Besoin d'analyse retrospective des résultats (importance de la verification par le DPN invasif, du suivi de grossesse, de l'investigation des causes des faux resultats...)
- Nécessité d'avancer rapidement sur la question du remboursement pour l'équité sociale
- Extension à d'autres anomalies:
 - Besoin de plus d'études
 - Réflexions au sein des sociétés savantes

La plateforme = Un travail d'équipe !

Service de Cytogénétique pré et postnatale

JM Dupont
L El Khattabi
A Lebbar
A Coussement
A Choiset
M Montagnon
N Le Du
Techniciennes
Secrétaires



Nos collègues en Génétique
et Biologie Moléculaires

Nos correspondants aux 13
Maternités (Obtétriciens, Sage-
femmes, infirmières, secrétaires,
etc)

