Place de la PCR digitale dans le dépistage non invasif des aneuploïdies à partir de l'ADN fœtal circulant

Dr Laïla El Khattabi
Service de Cytogénétique, Hôpital Cochin, Paris

Risques & grossesse DHU

Hôpitaux Universitaires Paris Centre
COCHIN BROCA HÔTEL-DIEU

institut cochin CENTRE DE RECHERCHE

DPNT21 en France aujourd'hui

Phase 1 : DEPISTAGE (MSM)

~ 80 % grossesses (~650000)

Grossesses à risque élevé : ~ 3 % (2012)

Phase 2: DIAGNOSTIC (caryotype fœtal)

~ 5,6 % T21 (2012)

VPP 1/18

~ 1 % pertes foetales

OPEN ACCESS Freely available online PLoS one

Noninvasive Prenatal Diagnosis of Fetal Trisomy 21 by Allelic Ratio Analysis Using Targeted Massively Parallel Sequencing of Maternal Plasma DNA

Gary J. W. Liao[1,2], K. C. Allen Chan[1,2], Peiyong Jiang[1,2], Hao Sun[1,2], Tak Y. Leung[3], Rossa W. K. Chiu[1,2], Y. M. Dennis Lo[1,2]*

Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma

Rossa W. K. Chiu[a,b], K. C. Allen Chan[a,b], Yuan Gao[c,d], Virginia Y. M. Lau[a,b], Wenli Zheng[a,b], Tak Y. Leung[e], Chris H. F. Foo[f], Bin Xie[c], Nancy B. Y. Tsui[a,b], Fiona M. F. Lun[a,b], Benny C. Y. Zee[f], Tze K. Lau[e], Charles R. Cantor[g,1], and Y. M. Dennis Lo[a,b,1]

Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y

K. H. Nicolaides[1,2]*, A. Syngelaki[1], M. Gil[1], V. Atanasova[1] and D. Markova[1]

DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study

Glenn E. Palomaki, PhD[1], Cosmin Deciu, MS[2], Edward M. Kloza, MS[1], Geralyn M. Lambert-Messerlian, PhD[1], James E. Haddow, MD[1], Louis M. Neveux, BA[1], Mathias Ehrich, MD[3], Dirk van den Boom, PhD[3], Allan T. Bombard MD, MBA[2-4], Wayne W. Grody, MD, PhD[5-7], Stanley F. Nelson, MD[5,7,8] and Jacob A. Canick, PhD[1]

OPEN ACCESS Freely available online PLoS one

Prenatal Detection of Aneuploidy and Imbalanced Chromosomal Arrangements by Massively Parallel Sequencing

Shan Dan[1*,9], Fang Chen[2,9], Kwong Wai Choy[3,9], Fuman Jiang[2], Jingrong Lin[2], Zhaoling Xuan[2], Wei Wang[2], Shengpei Chen[2], Xuchao Li[2], Hui Jiang[2], Tak Yeung Leung[3], Tze Kin Lau[3], Yue Su[1], Weiyuan Zhang[1], Xiuqing Zhang[2*]

OPEN ACCESS Freely available online PLoS one

Noninvasive Prenatal Diagnosis of Fetal Trisomy 21 by Allelic Ratio Analysis Using Targeted Massively Parallel Sequencing of Maternal Plasma DNA

Gary J. W. Liao[1,2], K. C. Allen Chan[1,2], Peiyong Jiang[1,2], Hao Sun[1,2], Tak Y. Leung[3], Rossa W. K. Chiu[1,2], Y. M. Dennis Lo[1,2]*

Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma

Rossa W. K. Chiu[a,b], K. C. Allen Chan[a,b], Yuan Gao[c,d], Virginia Y. M. Lau[a,b], Wenli Zheng[a,b], Tak Y. Leung[e], Chris H. F. Foo[f], Bin Xie[c], Nancy B. Y. Tsui[a,b], Fiona M. F. Lun[a,b], Benny C. Y. Zee[f], Tze K. Lau[e], Charles R. Cantor[g,1], and Y. M. Dennis Lo[a,b,1]

Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y

K. H. Nicolaides[1,2]*, A. Syngelaki[1], M. Gil[1], V. Atanasova[1] and D. Markova[1]

DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study

Glenn E. Palomaki, PhD[1], Cosmin Deciu, MS[2], Edward M. Kloza, MS[1], Geralyn M. Lambert-Messerlian, PhD[1], James E. Haddow, MD[1], Louis M. Neveux, BA[1], Mathias Ehrich, MD[3], Dirk van den Boom, PhD[3], Allan T. Bombard MD, MBA[2-4], Wayne W. Grody, MD, PhD[5-7], Stanley F. Nelson, MD[5,7,8] and Jacob A. Canick, PhD[1]

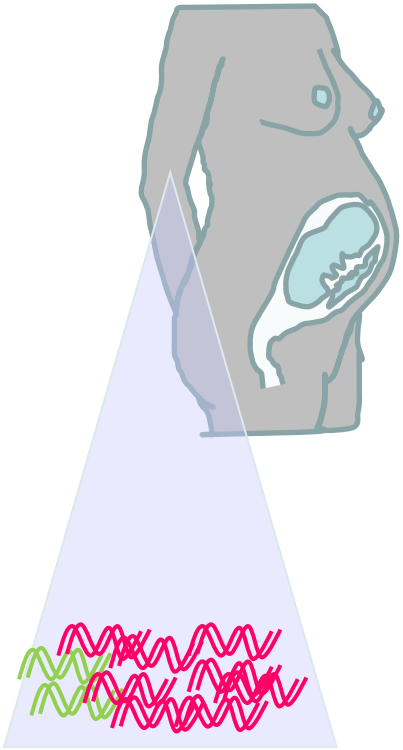
OPEN ACCESS Freely available online PLoS one

Prenatal Detection of Aneuploidy and Imbalanced Chromosomal Arrangements by Massively Parallel Sequencing

Shan Dan[1*9], Fang Chen[2,9], Kwong Wai Choy[3,9], Fuman Jiang[2], Jingrong Lin[2], Zhaoling Xuan[2], Wei Wang[2], Shengpei Chen[2], Xuchao Li[2], Hui Jiang[2], Tak Yeung Leung[3], Tze Kin Lau[3], Yue Su[1], Weiyuan Zhang[1], Xiuqing Zhang[2*]

ADN foetal circulant (ADNf)

- Lo et al., Lancet 1997

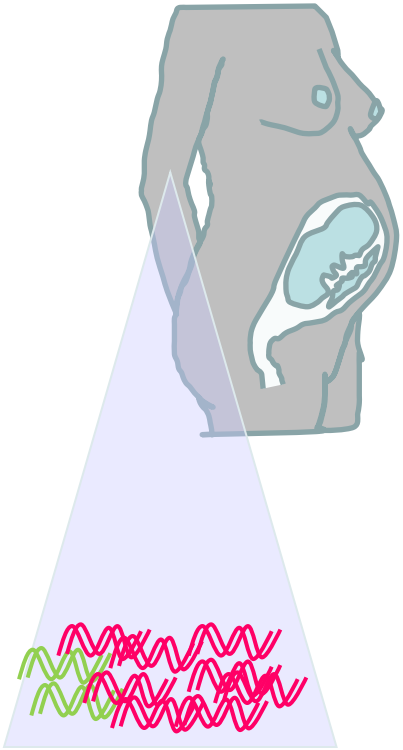


- Origine **trophoblastique**
- Dès **6 SA**
- t½ **16.3 min**

- Très faibles quantités
- Fragmenté **~ 143 pb**
- **3 – 19 %** de l'ADN circulant (Terme, Poids, Pré-éclampsie…)
- **Génome** fœtal représenté en **totalité**

ADN foetal circulant (ADNf)

- Lo et al., Lancet 1997



- Origine **trophoblastique**
- Dès **6 SA**
- t½ **16.3 min**

- Très faibles quantités
- Fragmenté **~ 143 pb**
- **3 – 19 %** de l'ADN circulant (Terme, Poids, Pré-éclampsie…)
- **Génome** fœtal représenté en **totalité**

Limites

- **Fx neg :** triploïdie, faibles mosaïques
- **Fx pos :** vanishing twins, clone mat aneuploïde, mosaïques confinées au placenta
- **Non rendus :** 2,7-9,9%

10 ans entre la découverte de l’ADNf et le DPNIT21 !

10 ans entre la découverte de l'ADNf et le DPNIT21 !

- Recherche de séquences spécifiques (Y, RhD…)
  - **Paternelles**

10 ans entre la découverte de l'ADNf et le DPNIT21 !

- Recherche de séquences spécifiques
  - **Paternelles**

- Dosage chromosomique / Comptage moléculaire

↗ Chr 21 (2 – 7 %)

Nécessité de techniques très sensibles et précises

Le DPNIT21 aujourd’hui

- Next Generation Sequencing / Séquençage Massivement Parallèle

Le DPNIT21 aujourd'hui

- Next Generation Sequencing / Séquençage Massivement Parallèle
  - Entreprises privées +++ / Licences
    Sequenom, Ariosa, Natera …
  - En France
    Cerba (Licence) 800 eur
    STIC tjs en cours…

DANNI : Diagnostic Anténatal Non Invasif des maladies génétiques

- Maladies monogéniques/Aneuploïdies

DANNI : Diagnostic Anténatal Non Invasif des maladies génétiques

- Maladies monogéniques/Aneuploïdies
- Etude prospective multicentrique

DANNI : Diagnostic Anténatal Non Invasif des maladies génétiques

- Maladies monogéniques/Aneuploïdies
- Etude prospective multicentrique
- Population à haut risque

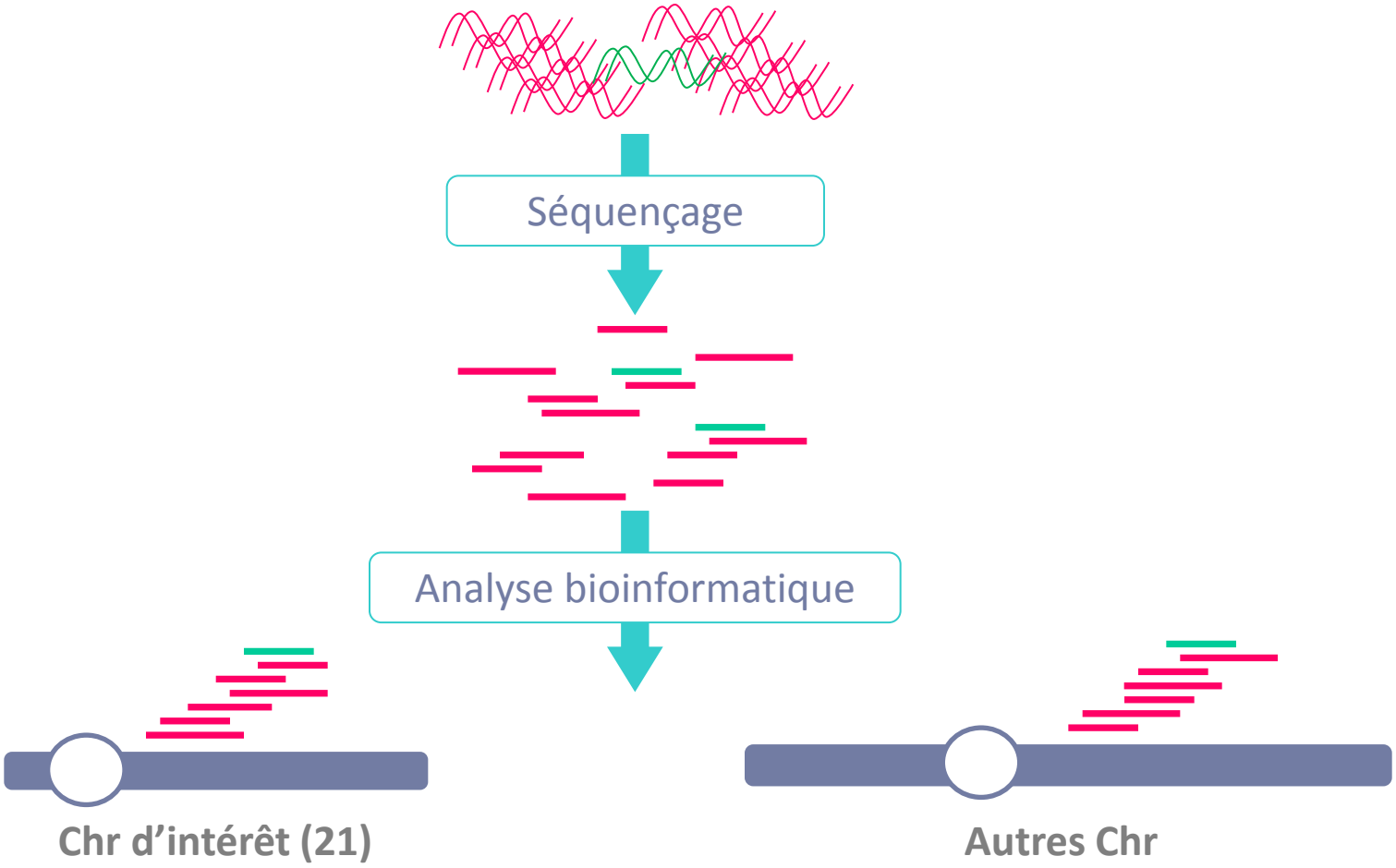
DANNI : Diagnostic Anténatal Non Invasif des maladies génétiques

- Maladies monogéniques/Aneuploïdies
- Etude prospective multicentrique
- Population à haut risque
- Objectif principal:

évaluer performances/coût des nouvelles technologies de comptage moléculaire dans le DPNIT21

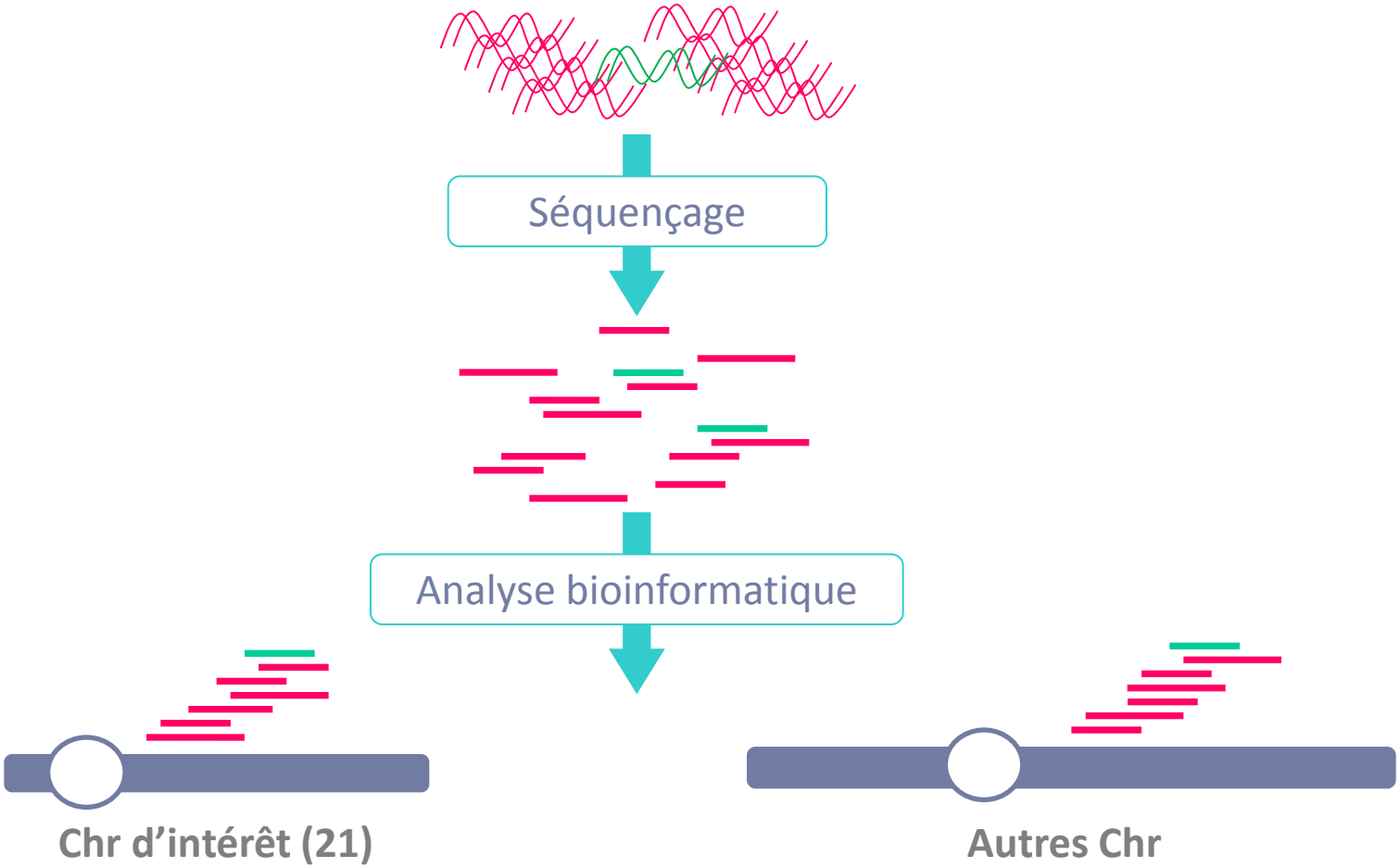
  - PCR digitale
  - NGS

DPNIT21 par NGS



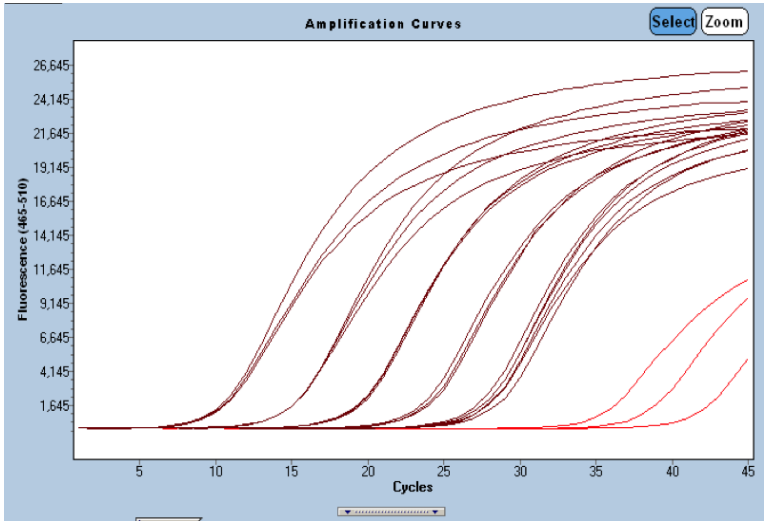
« % de Chr 21 » par rapport à d'autres chr

DPNIT21 par NGS



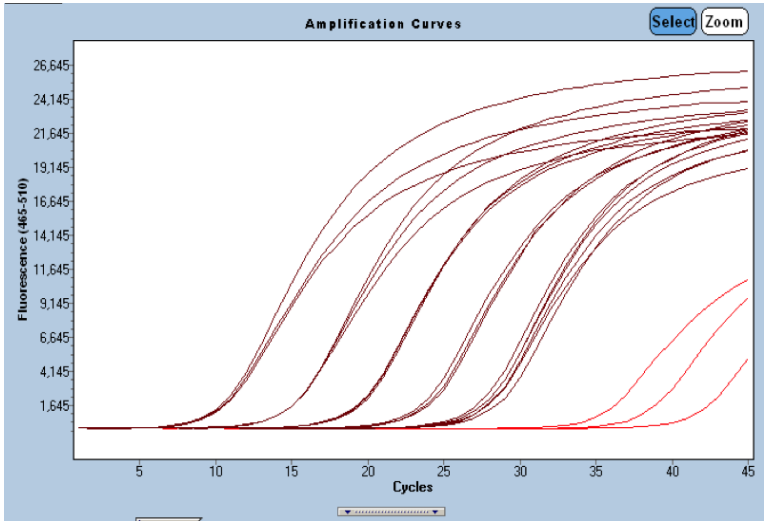
$$\text{Z score} = ((\%\ \text{de Chr } 21)_{ech} - \text{moy}_{ref})/\text{SD}_{ref}$$

PCR digitale



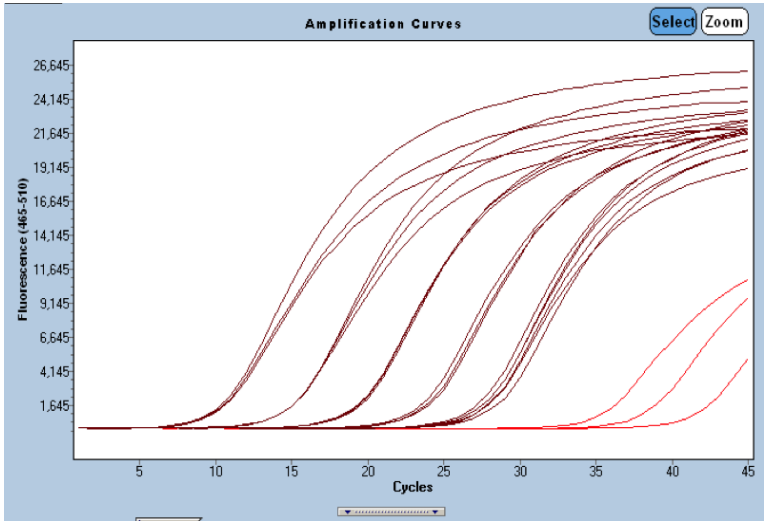
PCR digitale

PCR classique
Point final
Qualitative



PCR digitale

PCR classique
Point final
Qualitative

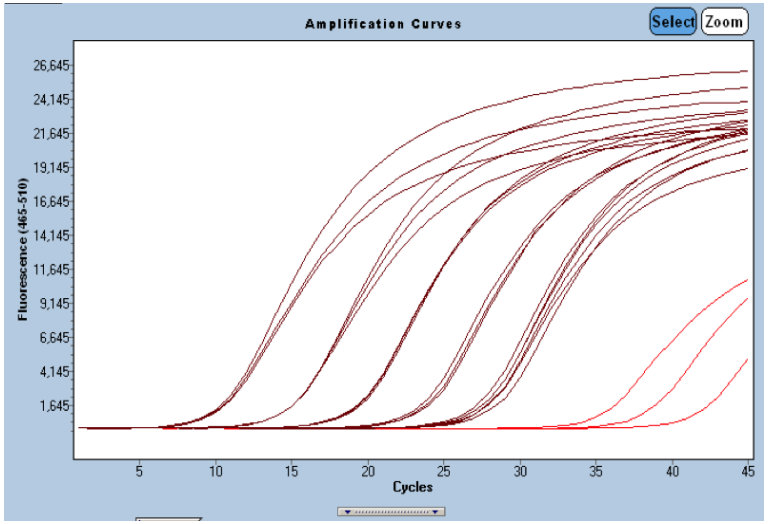


PCR en temps réel
quantitative

PCR digitale

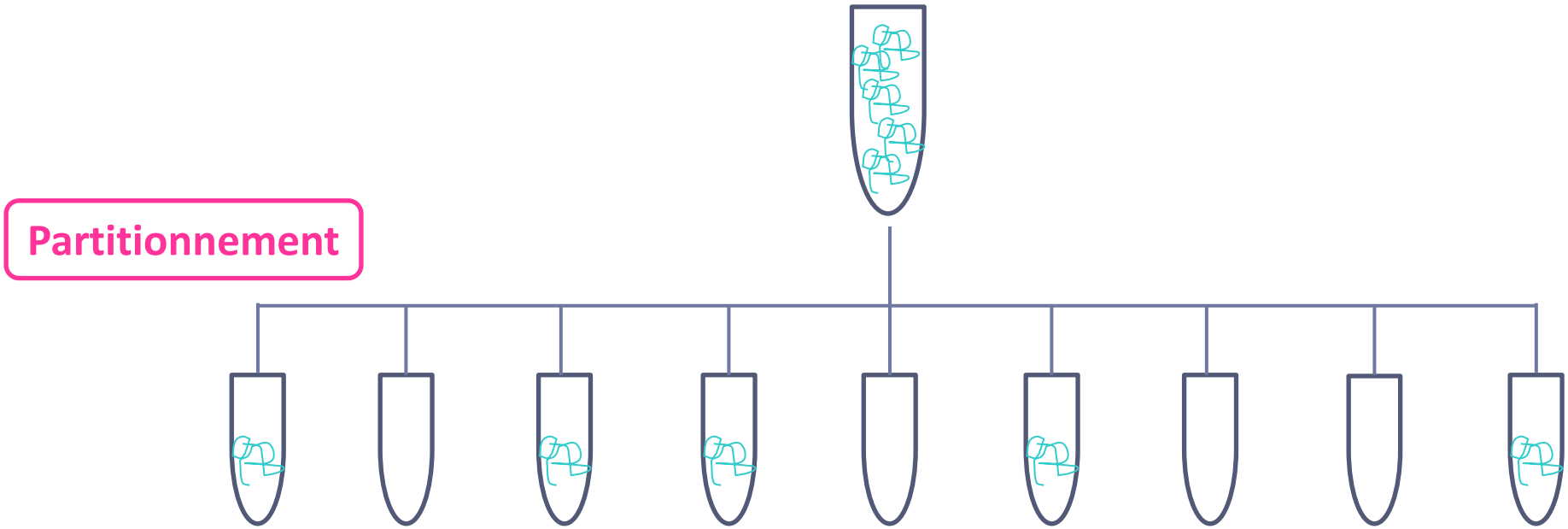
PCR digitale
Point final
quantitative

PCR classique
Point final
Qualitative

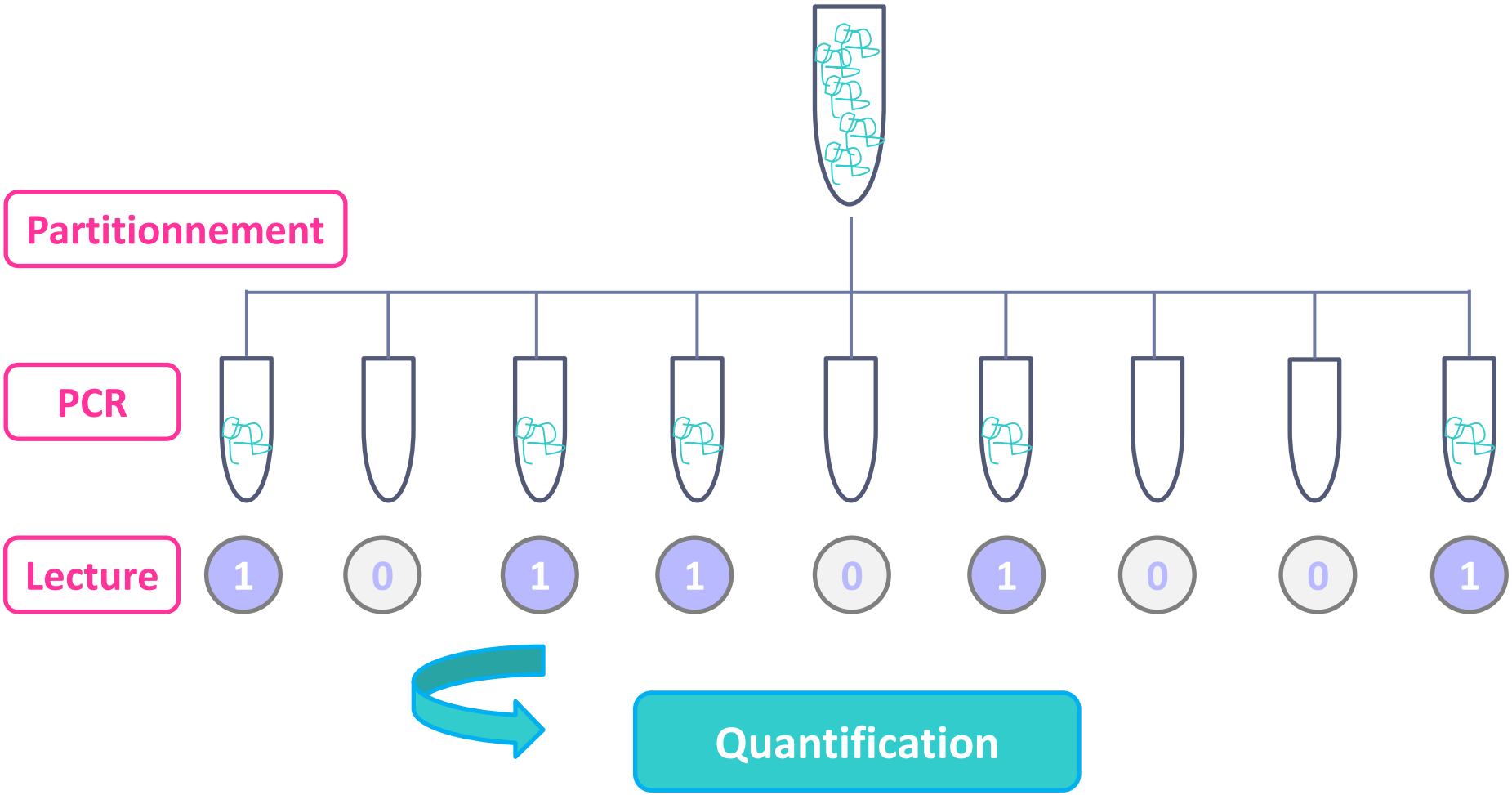


PCR en temps réel
quantitative

PCR digitale



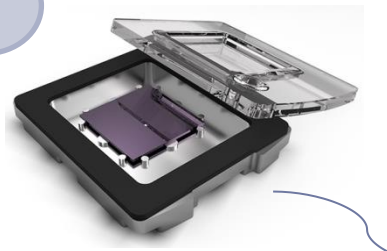
PCR digitale



PCR digitale

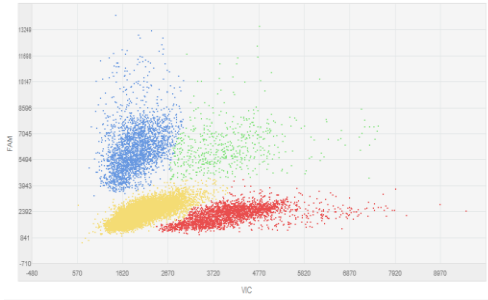
En micropuce

1



2

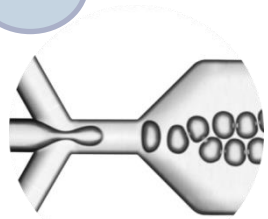
3



PCR digitale

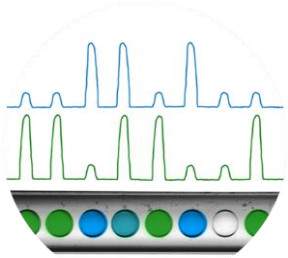
En émulsion

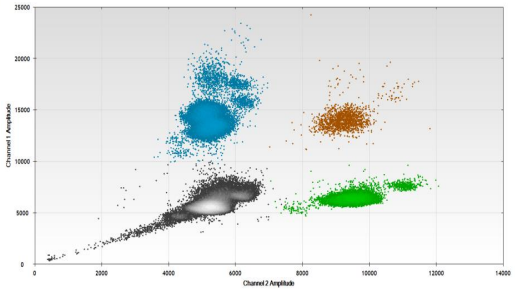
1



2

3





PCR digitale

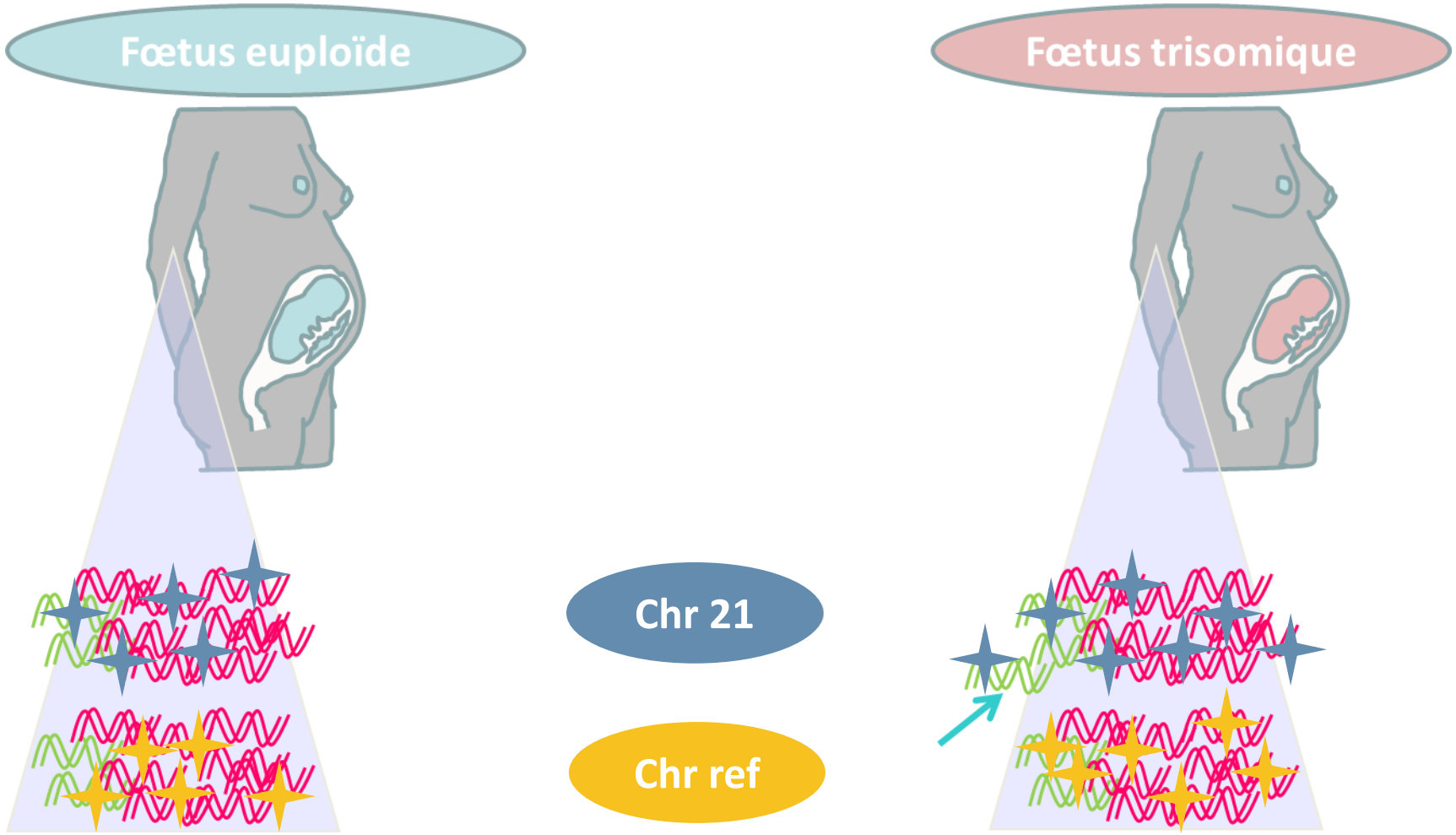
- Quantification absolue sans courbe standard
- ↘ interférences

↗ Sensibilité et précision de la Quantification

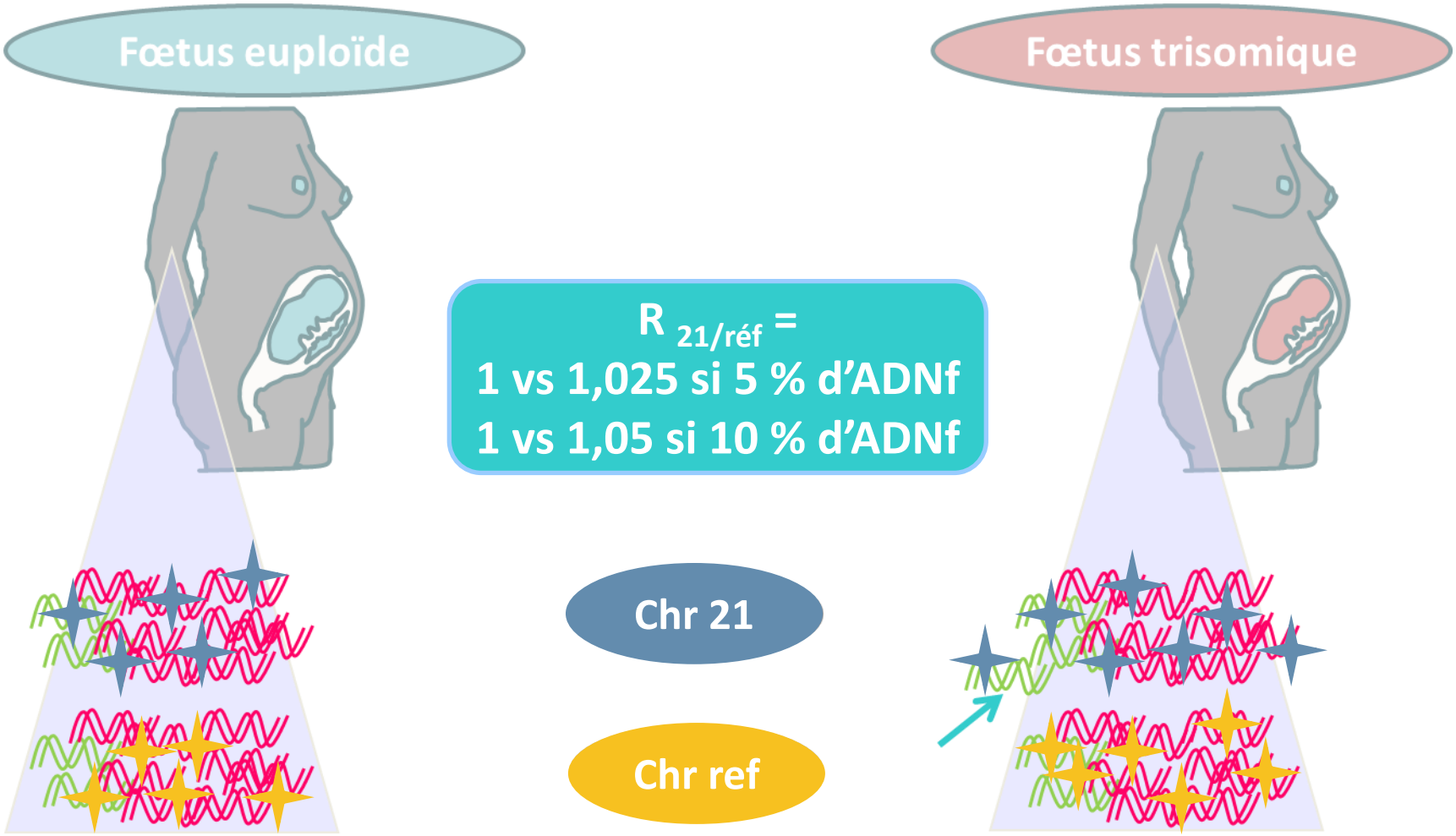
Applications

- Quantification absolue (*virologie, librairie avt NGS*)
- Quantification relative (*CNVs, mosaïques, DPNI aneuploïdies*)
- Détection d'évènements rares (*cancéro, DPNI gènes*)

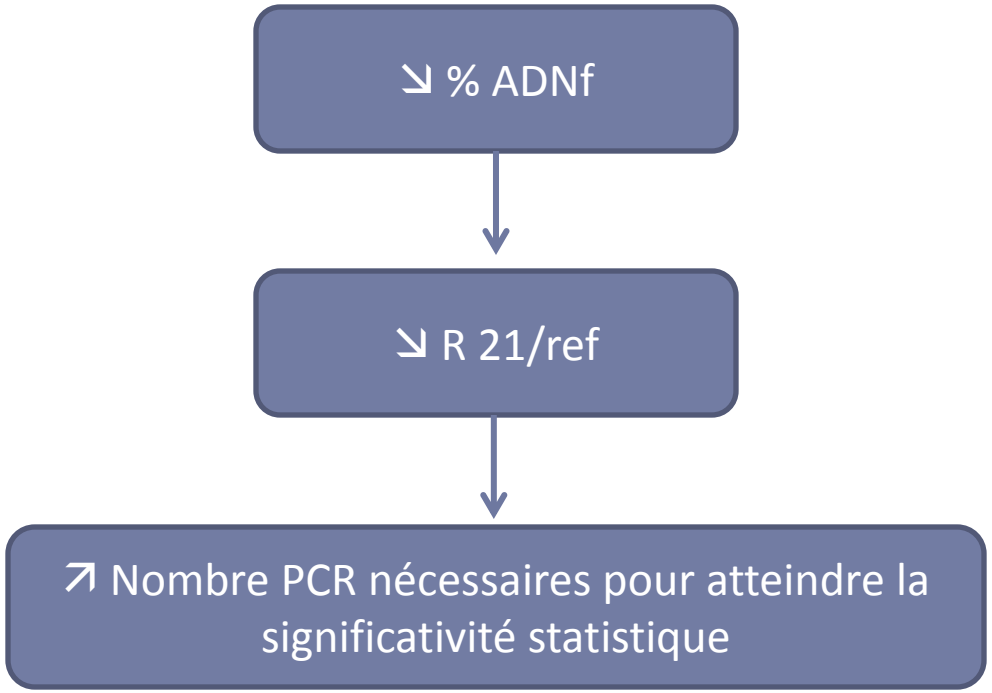
PCR digitale



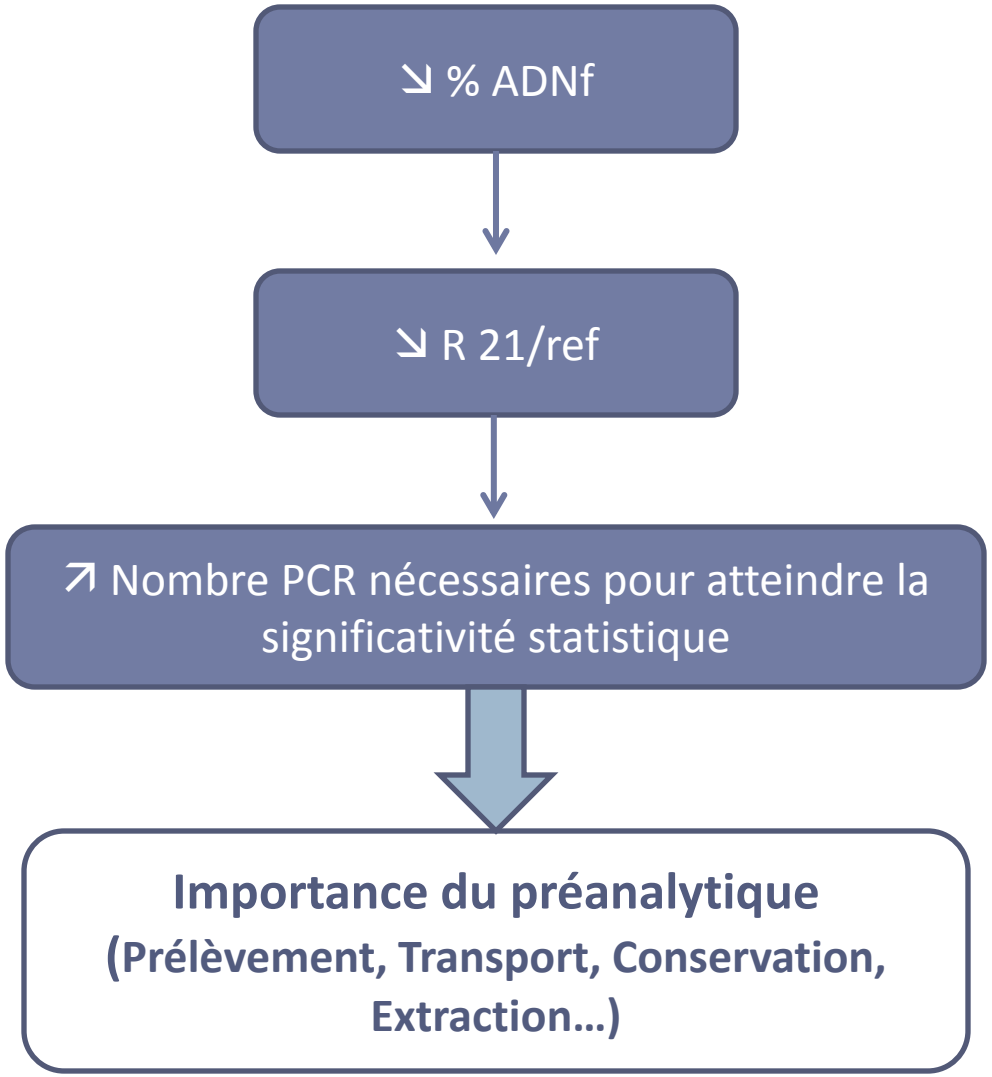
PCR digitale



PCR digitale

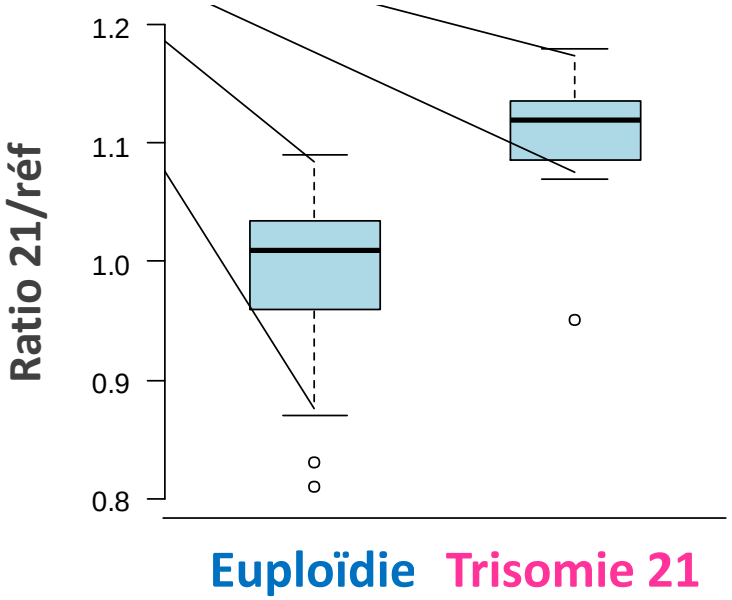


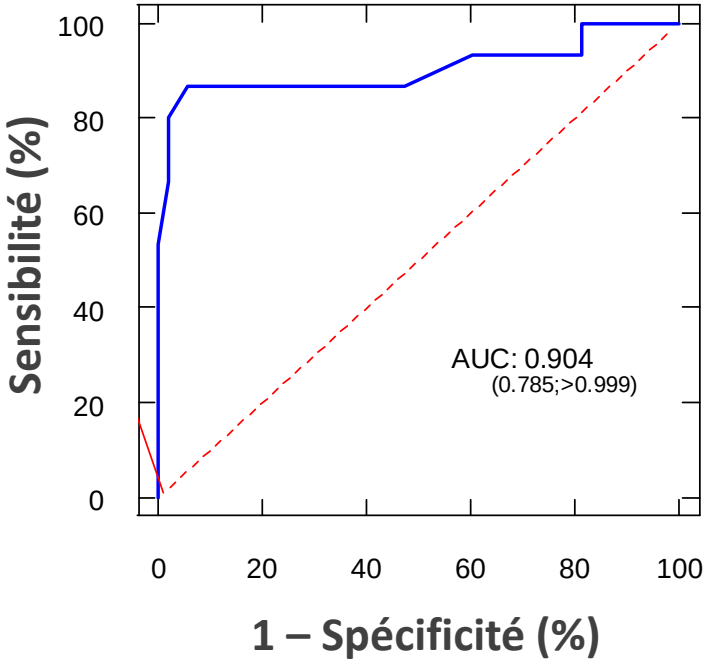
PCR digitale



PCR digitale - Principaux résultats de l'étude de faisabilité

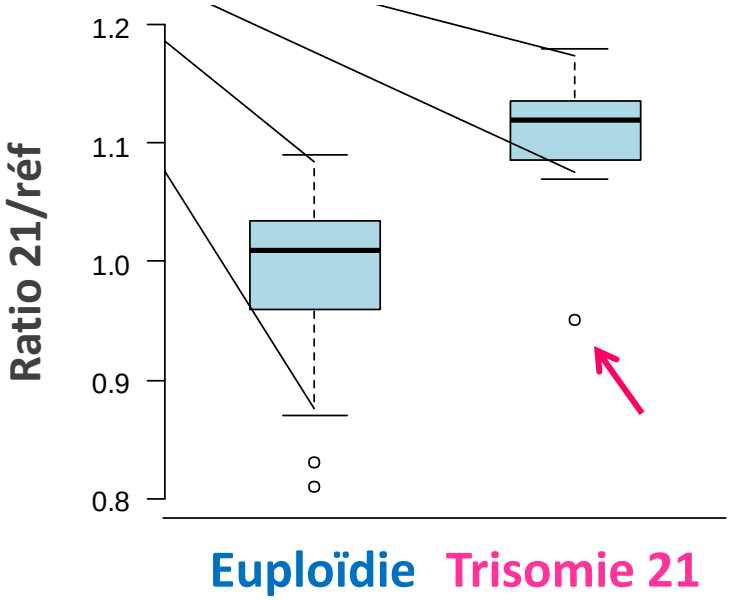
- n = 98, dont 19 T21

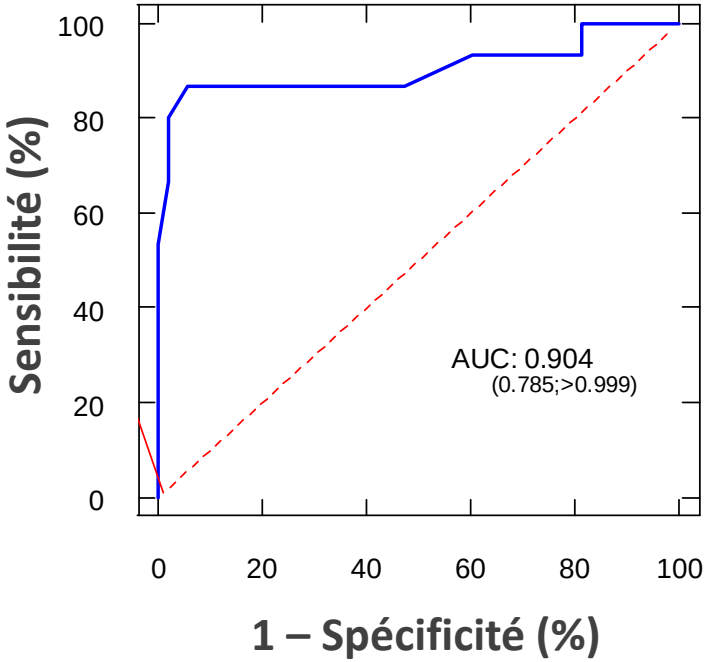




PCR digitale - Principaux résultats de l'étude de faisabilité

- n = 98, dont 19 T21





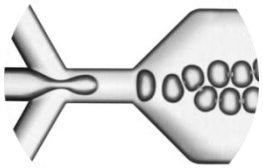
- Mise au point d'un contrôle interne de présence d'ADNf: 1ers résultats encourageants

PCR digitale – simplicité, rapidité

1

Génération des gouttelettes

1-2 h



2

PCR en pt final

2 h

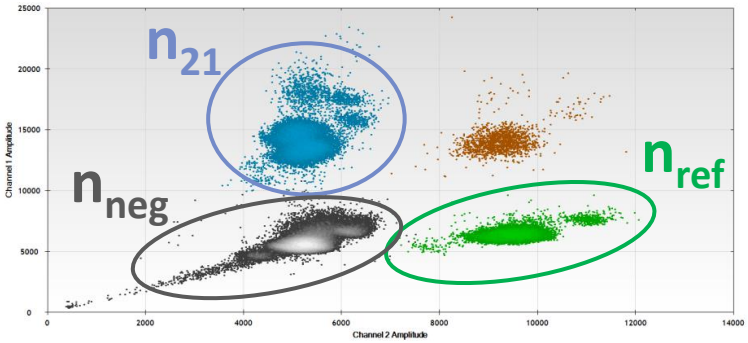
3

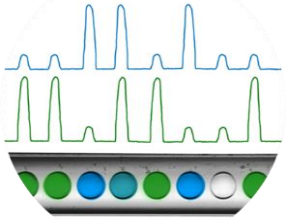
Lecture

15 min-3 h

4

Interprétation





Place de la dPCR dépend de celle du DPNIT21 dans le paysage du DPN classique

Scénario 1

Phase 1 : DEPISTAGE (MSM)

~ 80 % grossesses (~650000)

Grossesses à risque élevé : ~ 3 % (2012)

Phase 2: DEPISTAGE AVANCE (DPNIT21)

Phase 3: DIAGNOSTIC (caryotype fœtal)

↘↘ pertes foetales

Place de la dPCR dépend de celle du DPNIT21 dans le paysage du DPN classique

Scénario 2

Phase 1 : DEPISTAGE AVANCE (DPNIT21)

~ 80 % grossesses (~650000)

↓

Phase 2: DIAGNOSTIC (caryotype fœtal)

↓

↗ Performance du dépistage

Place de la dPCR dépend de celle du DPNIT21 dans le paysage du DPN classique

- Scénario 1 *vs* Scénario 2 :

  scénario 2 ++

  mais c’est une question de coût et d’organisation !

Place de la dPCR dépend de celle du DPNIT21 dans le paysage du DPN classique

- Scénario 1 *vs* Scénario 2 :

  scénario 2 ++

  mais c'est une question de coût et d'organisation !

  aujourd'hui, la PCRd semble plus adaptée au 2ème scénario mais :

  - résultats à confirmer sur une série plus large (en cours)
  - avancées technologiques et questions économiques et politiques à suivre de près…

Objectif à “très” long terme

- La vraie avancée serait le caryotype fœtal non-invasif

OPEN ACCESS Freely available online PLoS one

Prenatal Detection of Aneuploidy and Imbalanced Chromosomal Arrangements by Massively Parallel Sequencing

Shan Dan[1*], Fang Chen[2], Kwong Wai Choy[3], Fuman Jiang[2], Jingrong Lin[2], Zhaoling Xuan[2], Wei Wang[2], Shengpei Chen[2], Xuchao Li[2], Hui Jiang[2], Tak Yeung Leung[3], Tze Kin Lau[3], Yue Su[1], Weiyuan Zhang[1], Xiuqing Zhang[2*]

Array No.	Karyotype	arrayCGH	Segseq
A10071659	46,XY	deletion at 13q32.3q33.3(97091318~106466788)	deletion at chr13: 97075576~106516365(9.4 M)
A10021390	46,XY,der(5)t(5;18)(p13;q12.3)	deletion at 5p15.3~p13.2(183931~36816731); duplication at 18p12.3~q23(39086755~76067279)	deletion at chr5: 1~36861739(36.9 M); duplication at chr18: 38768509~76117152(37.3 M)
A10021383	46,XY,2q+	duplication at 2q36~q37.3(230369496~242444380)	duplication at chr2: 230288772~242427293(12.1 M)
A11091844	46,XX	deletion at 3q29(197216353~198770242)	deletion at chr3: 197372027~198831453(1.4 M)
A10071710	46,XY	deletion at 22q11.21(17289032~19636115)	deletion at chr22: 17396815~20248184(2.8 M)

Objectif à “très” long terme

- La vraie avancée serait le caryotype fœtal non-invasif

OPEN ACCESS Freely available online PLoS one

Prenatal Detection of Aneuploidy and Imbalanced Chromosomal Arrangements by Massively Parallel Sequencing

Shan Dan[1*], Fang Chen[2], Kwong Wai Choy[3], Fuman Jiang[2], Jingrong Lin[2], Zhaoling Xuan[2], Wei Wang[2], Shengpei Chen[2], Xuchao Li[2], Hui Jiang[2], Tak Yeung Leung[3], Tze Kin Lau[3], Yue Su[1], Weiyuan Zhang[1], Xiuqing Zhang[2*]

Array No.	Karyotype	arrayCGH	Segseq
A10071659	46,XY	deletion at 13q32.3q33.3(97091318~106466788)	deletion at chr13: 97075576~106516365(9.4 M)
A10021390	46,XY,der(5)t(5;18)(p13;q12.3)	deletion at 5p15.3~p13.2(183931~36816731); duplication at 18p12.3~q23(39086755~76067279)	deletion at chr5: 1~36861739(36.9 M); duplication at chr18: 38768509~76117152(37.3 M)
A10021383	46,XY,2q+	duplication at 2q36~q37.3(230369496~242444380)	duplication at chr2: 230288772~242427293(12.1 M)
A11091844	46,XX	deletion at 3q29(197216353~198770242)	deletion at chr3: 197372027~198831453(1.4 M)
A10071710	46,XY	deletion at 22q11.21(17289032~19636115)	deletion at chr22: 17396815~20248184(2.8 M)

Remerciements

Hôpitaux Universitaires Paris Centre – Site Cochin – Cytogénétique
Rakia Bhouri
Dominique Letessier
Armelle Luscan
Aurélie Coussement
Agnès Choiset
Jean-Michel Dupont

Hôpital Poissy St Germain en Laye – Fédération de Génétique
Christelle Le Sciellour
Valérie Serazin
Delphine Fauvert
François Vialard

Hôpital Poissy St Germain en Laye – Gynécologie
Patrick Rozenberg
Alexandra Brette
Berangère Duclos

Hôpitaux Universitaires Paris Centre – Site Cochin – Gynécologie
Vassilis Tsatsaris
Françoise Le Rhun
Camille Deput Rampon

Centre d'épidémiologie de l'Hôtel Dieu
Raphael Porcher

Plateforme NGS – INSERM – APHP – Hôpital Cochin
Juliette Nectoux
Franck Letourneur
Michel Vidaud