



# **Retour d'expérience de la plateforme APHP de DPNI**

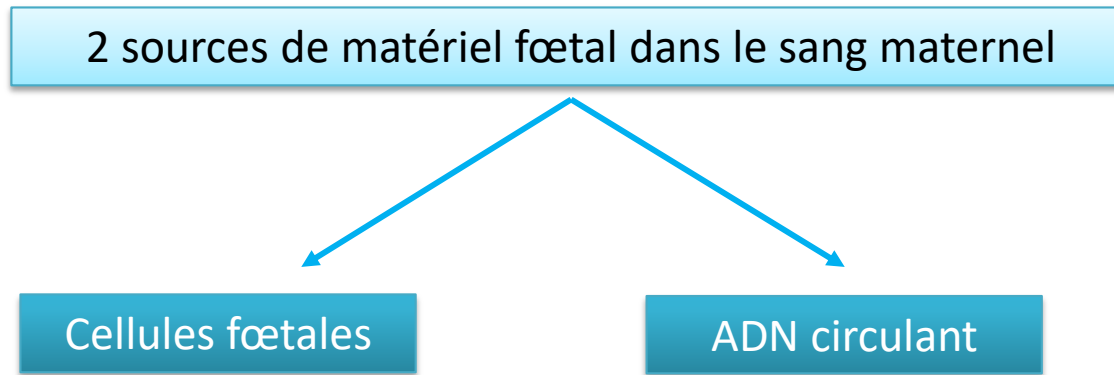
Aurélie MENARD et Isabelle JEGOUX

Service de Cytogénétique, Hôpital Cochin

# Agenda

- Matériel foetal
- Stratégie de dépistage
- Approches DPNI
- Principes
- Plateforme de COCHIN
- Bilan
- Evolutions

# Présence de matériel foetal dans le sang maternel

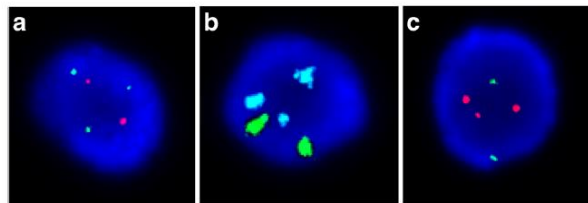


# Présence de matériel foetal dans le sang maternel

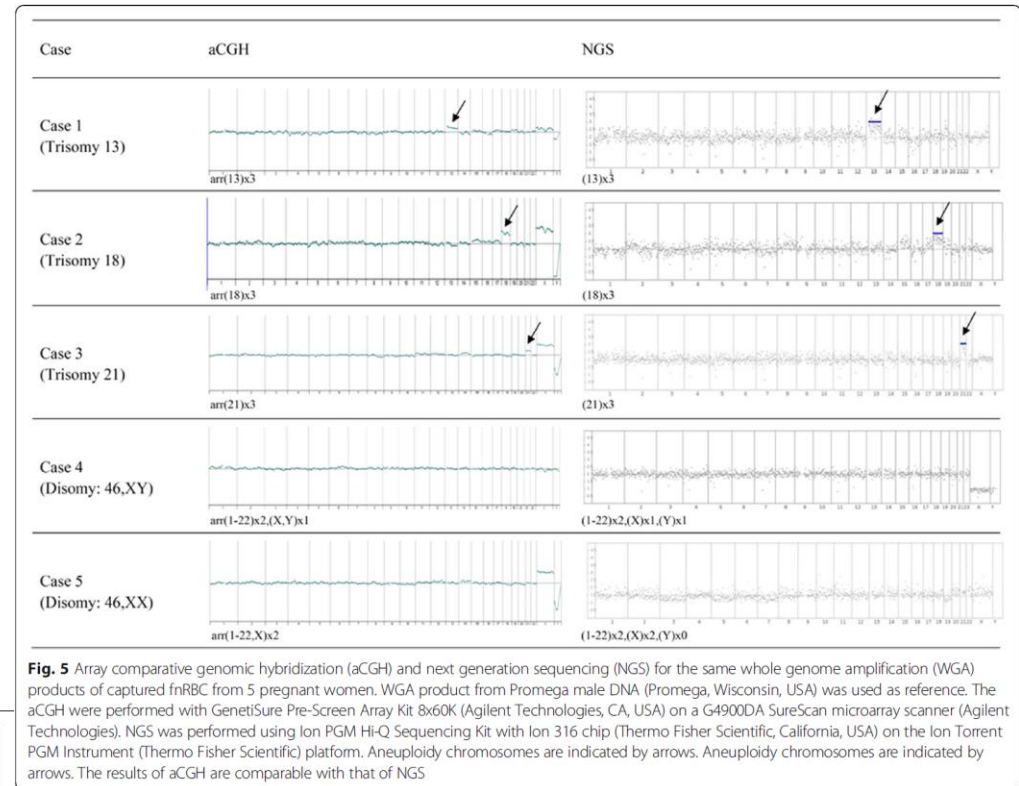
Cellules fœtales

Génome entier mais:

- difficiles à séparer des cellules maternelles
- proportion faible:  $1/10^5$ - $10^9$



**Fig. 4** Fluorescent in situ hybridization (FISH) for the captured fRBC from 3 pregnant women with aneuploid fetus of **a** trisomy 13, **b** trisomy 18, and **c** trisomy 21. In **a** and **c**, chromosome 13 was identified by a panel of probes (RB1, D13S1195, D13S1155, D13S915) in green and chromosome 21 was identified by a panel of probes (D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444, D21S341) in orange. In **b**, chromosome 18 was identified by a probe (D18Z1) in aqua and chromosome X was identified by a probe (DXZ1) in green



Huang et al, 2017

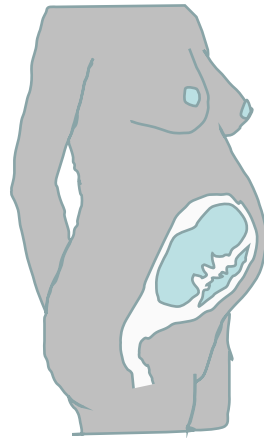
# ADN foetal circulant

- Découverte de l'ADN foetal libre circulant en 1997 + développement du NGS => Essor du DPNI, en particulier de la trisomie 21.
- Caractéristiques de l'ADNlc:
  - ADNf << ADNmat
  - Fraction foetale (FF) 3 – 19%
  - Fragmenté (<300pb)
  - D'origine trophoblastique (cellules en apoptose du cytotrophoblaste) .
  - Détectable à partir de la 6<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (SA) jusqu'à la fin de la grossesse
  - Augmentation régulière de la concentration totale et de la proportion foetale durant la grossesse
  - Disparition rapide quelques heures après l'accouchement ( $t_{1/2} = 15 \text{ min}$ )
  - Variabilité interindividuelle +++



# Deux applications majeures en prénatal

## Cytogénétique



- Dépistage aneuploidies (Trisomie 21++)
- Dépistage autres anomalies chromosomiques ?

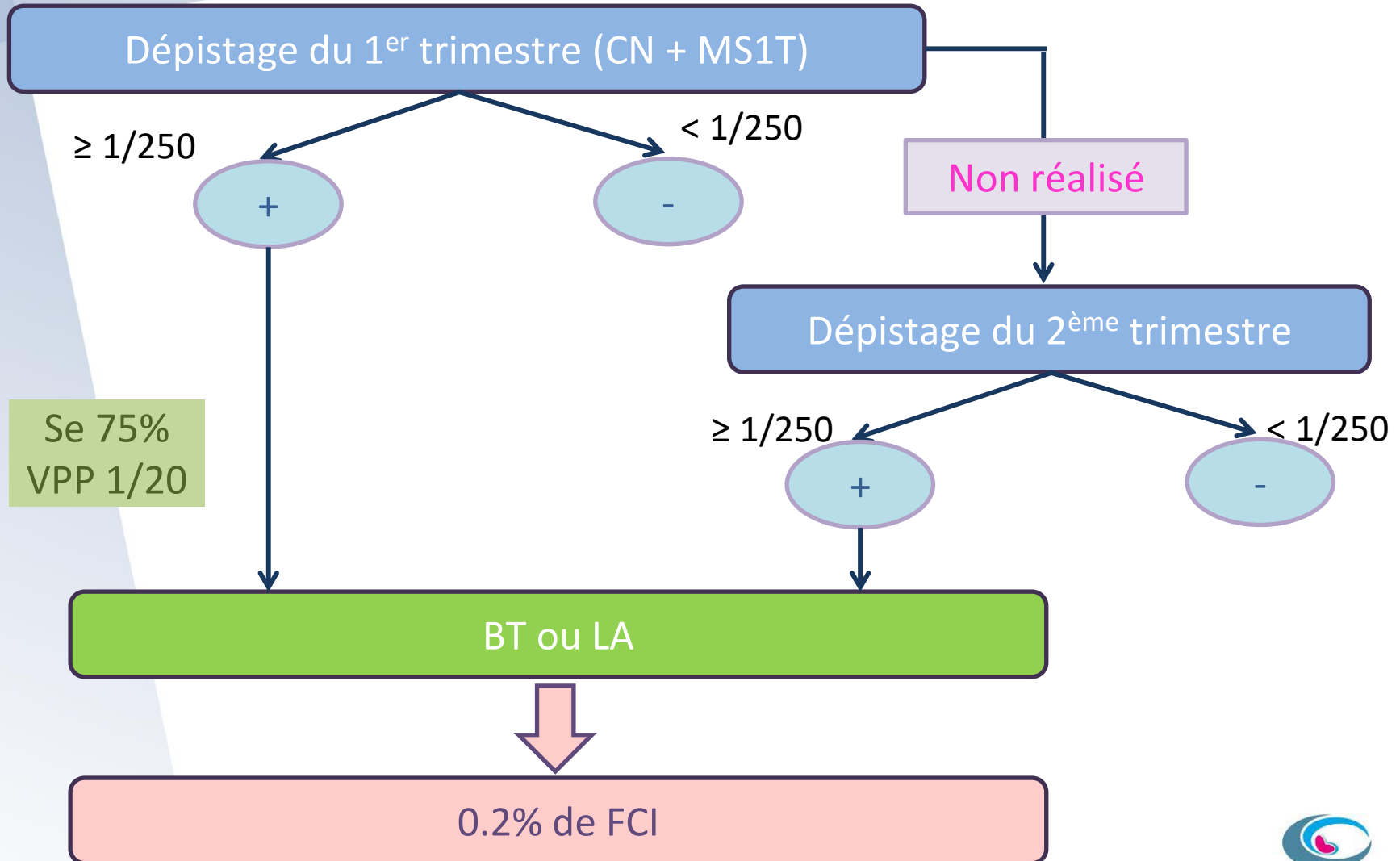
## Génétique moléculaire



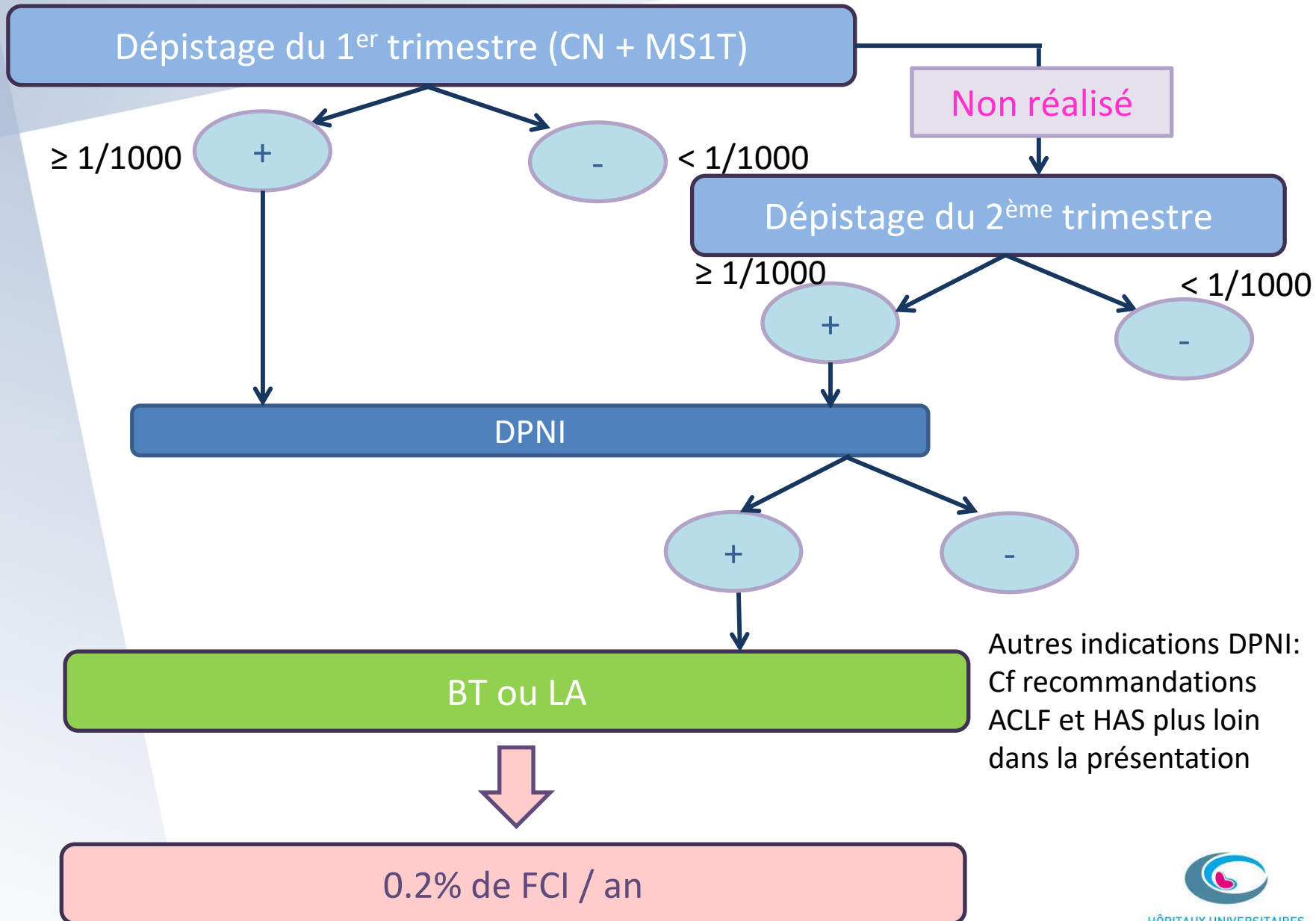
Genoma

- Diagnostic sexe foetal, Rhesus
- Maladies monogéniques

# Dépistage prénatal de la Trisomie 21 jusqu'à il y a quelques années



# Nouveau schéma de dépistage....



# DPNI T21

## Différentes approches possibles

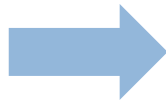
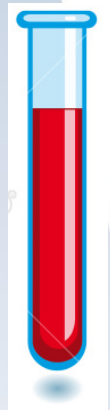
- Approche ciblée vs génome entier

|               | +                                                                                                                                | -                                                                                                       |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ciblée        | Moins coûteuse,<br>Plus d'échantillons par run,<br>Ciblée sur les chromosomes/régions d'intérêt,<br>Choix des régions à analyser | Le taux d'échec serait plus élevé<br>Passe à côté d'anomalies segmentaires non ciblées                  |
| Génome entier | Moins d'échecs,<br>Analyse pangénomique                                                                                          | Plus de difficultés d'interprétation (détection d'autres anomalies que celles initialement recherchées) |

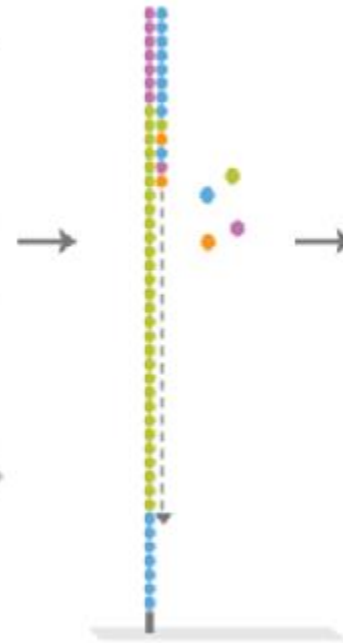
- Approche SNP (Single Nucleotid Polymorphism) vs non SNP

# Principe technique

Isolation du plasma  
Extraction & Préparation ADNlc



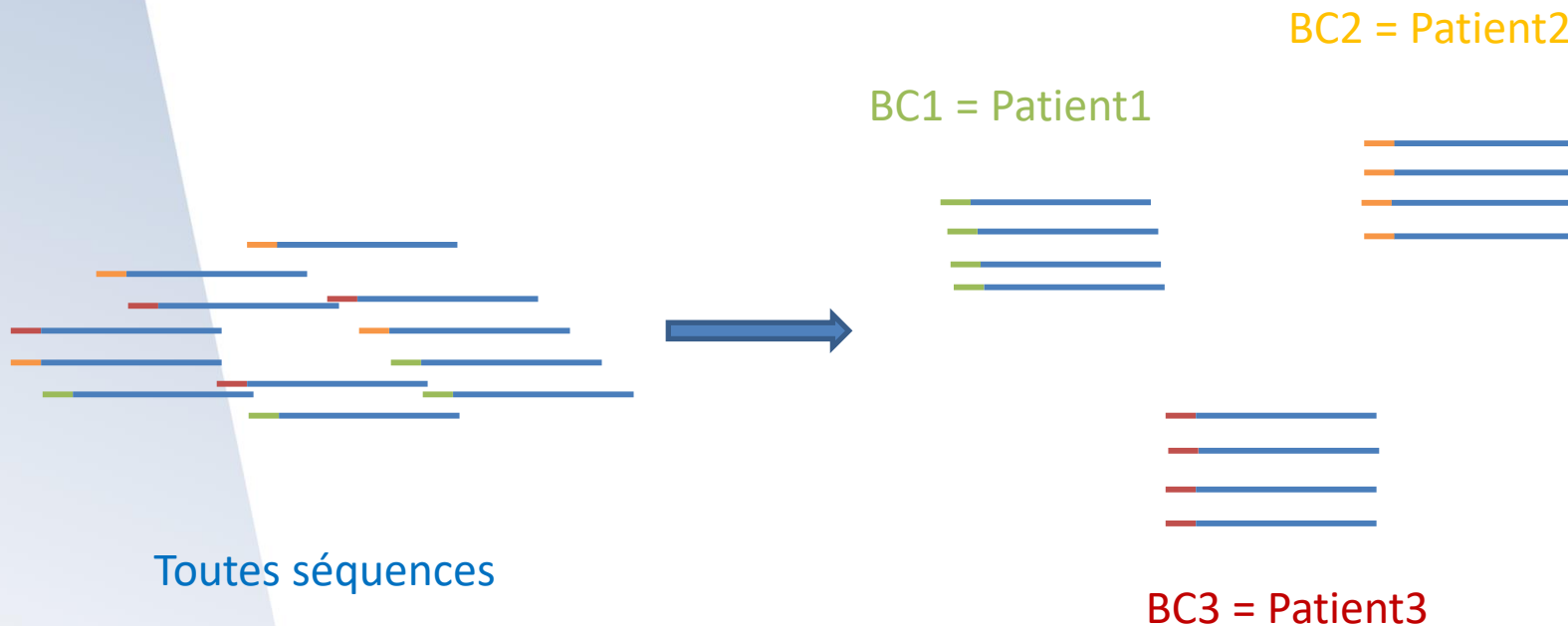
Séquençage



Technologie Illumina®

# Principe de l'analyse bioinformatique

## Démultiplexage



# Principes de l'analyse bioinformatique

## Alignement



Alignement

Compte:

CGATTTA ACT                      AGGTACCGAT  
                                         GACTTCCAGG  
...ACCACGATTTA ACTGGAGTAAAGACTTCCAGGTACCGATCTAGCCT...

← Genome humain →

**Millions de “compte” par échantillon**

# Principes de l'analyse bioinformatique

## Elimination des duplicats



Alignement

Compte:

CGATTTAAC T AGGTACCGAT  
CGATTTAAC T GACTTCCAGG  
...ACCACGATTTAAC TGGAGTAAAGACTTCCAGGTACCGATCTAGCCT...

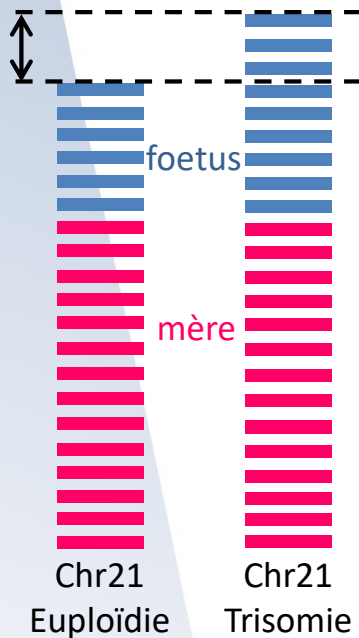
← Genome humain →

**Millions de “compte” par échantillon**

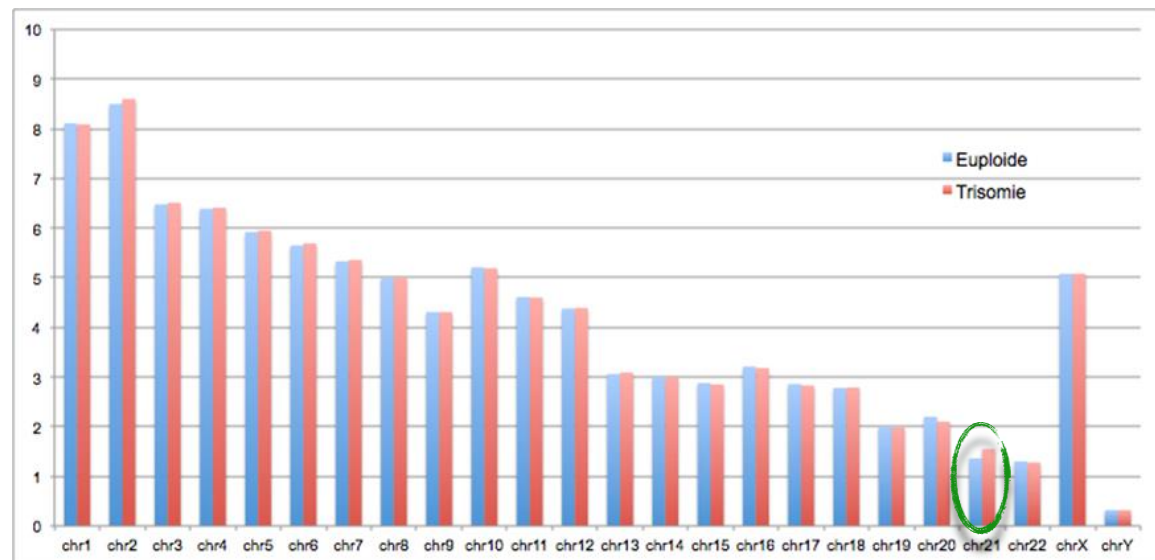
# Principe de l'analyse bioinformatique

## Algorithme de calcul

### Approche de comptage moléculaire (non SNP)



Surreprésentation des séquences du ch21 en cas de trisomie 21 par rapport aux situations d'euploïdie

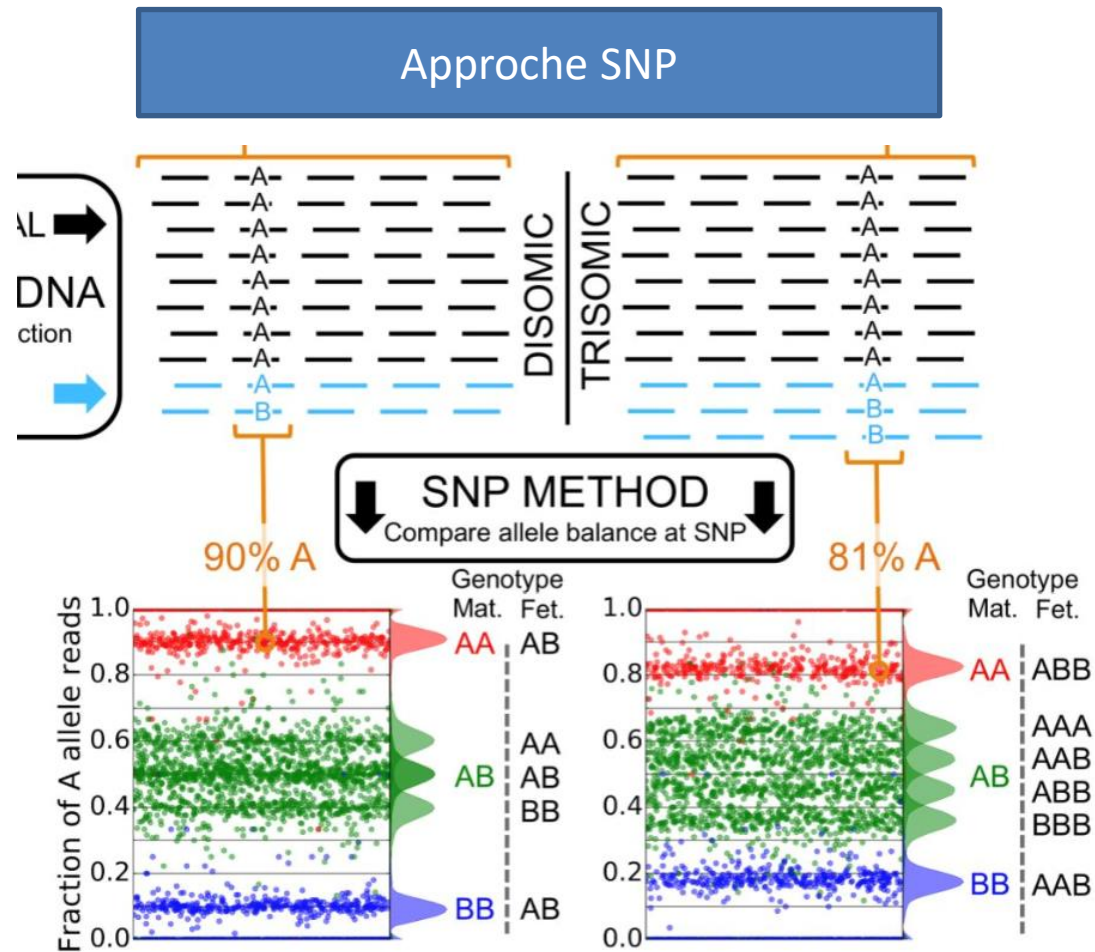


Comparaison du nombre de séquence du chromosome 21 par rapport :

- Au ratio d'autres chromosomes de référence
- À la séquence de référence d'un panel de grossesses normales.

=> Score par chromosome

# Plateforme SNP



# **Plateforme APHP De Dépistage Prénatal Non Invasif de la Trisomie 21**

# Choix du type de Plateforme

- Illumina<sup>®</sup> : VeriseqNIPT
  - Méthode pangénomique, orientée au moment de l'analyse sur les K 13,18 et 21 avec un potentiel d'extension vers les autres chromosomes.
  - Méthode automatisée permettant une réponse adaptée à la demande de toutes les maternités de l'APHP.
  - Marquage CE-IVD

# Etapes de la plateforme

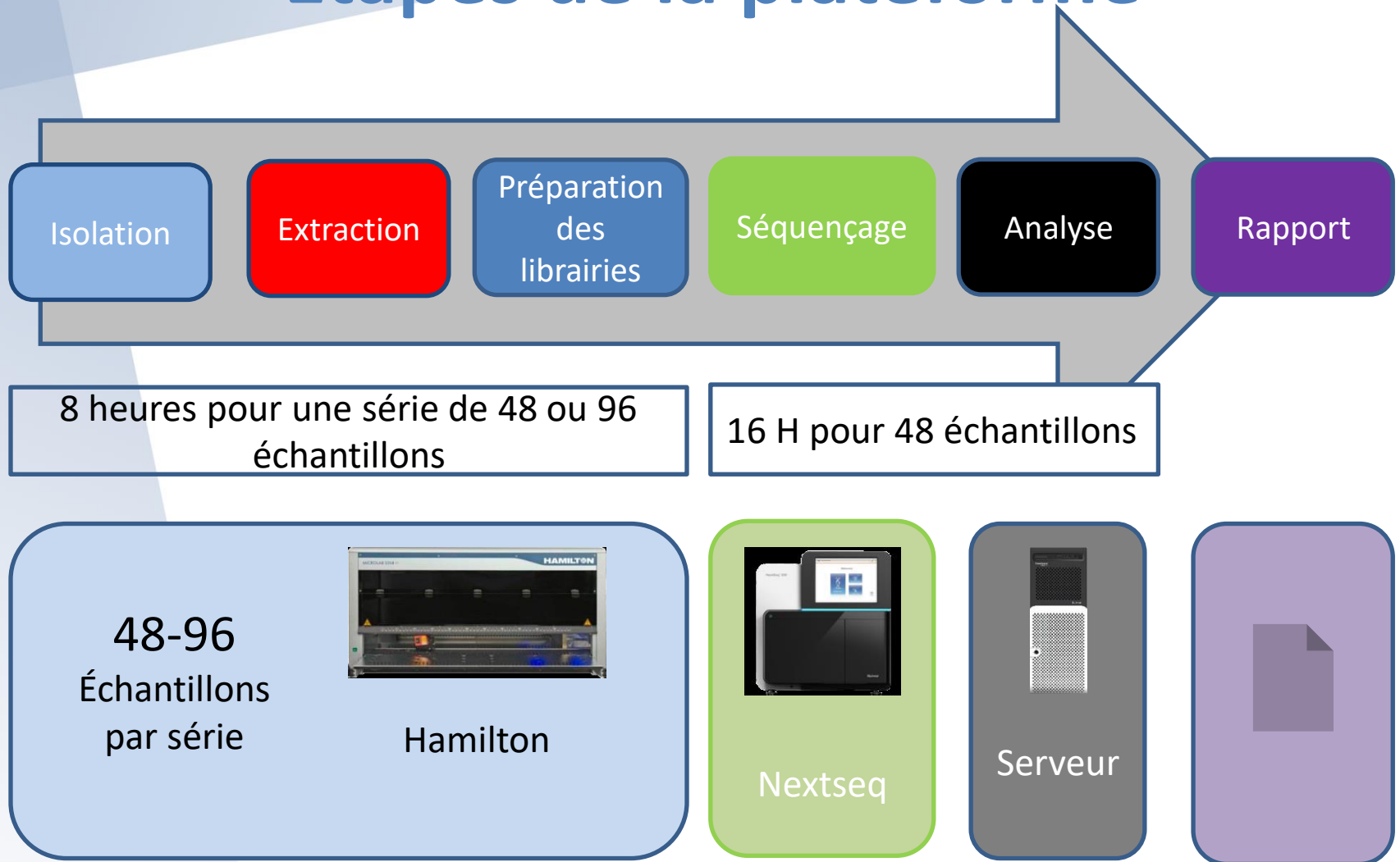


Image adaptée d'Illumina

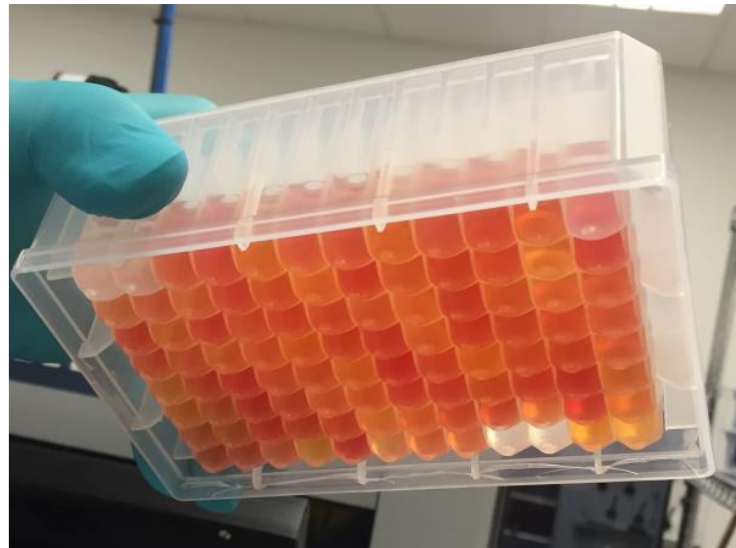
# A-Préparation des échantillons sur un robot pipeteur (Star /HAMILTON®)

- Décantation de plasma
- Extraction
- Librairie
- Quantification
- Pool



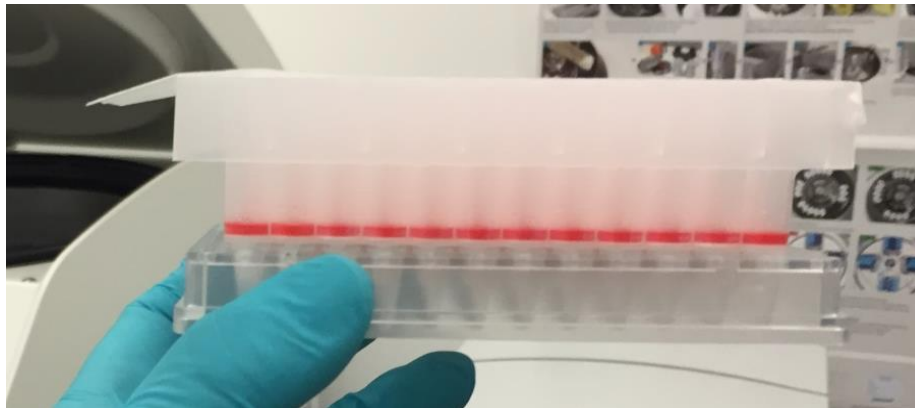
# A-Préparation des échantillons sur un robot pipeteur (Star /HAMILTON®)

## – Décantation de plasma



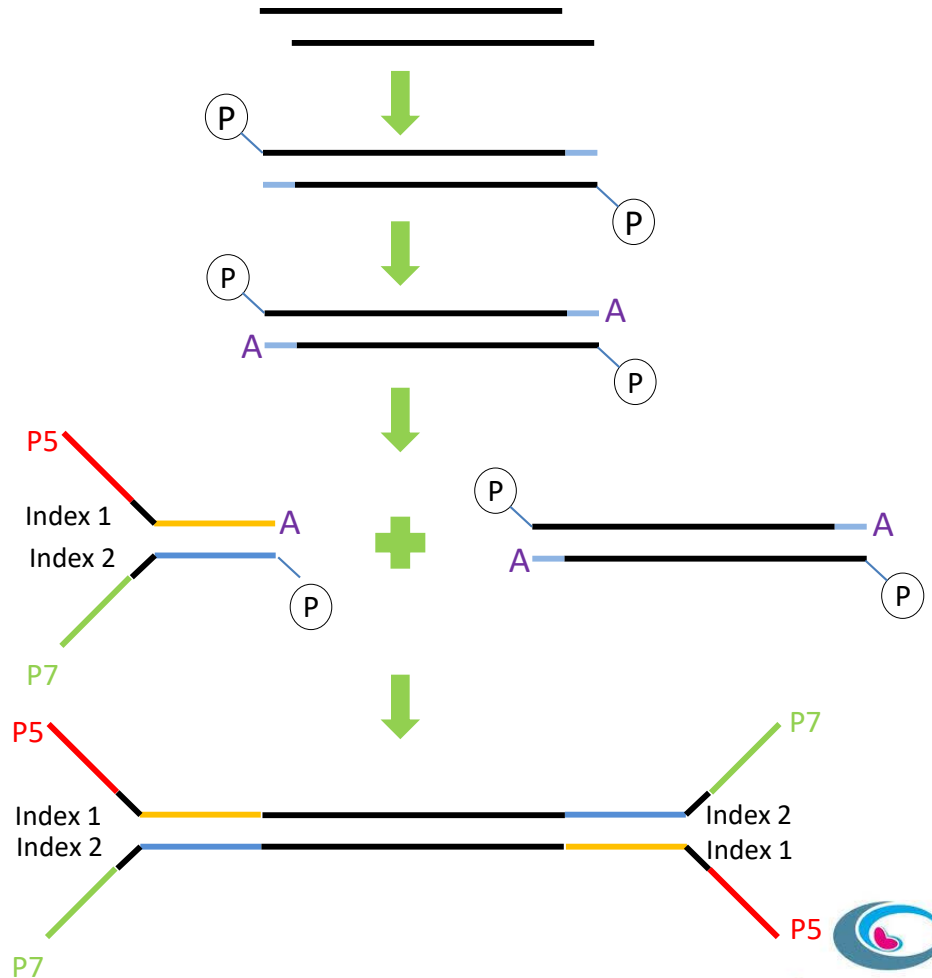
# A-Préparation des échantillons sur un robot pipeteur (Star /HAMILTON®)

- Décantation de plasma
- **Extraction**



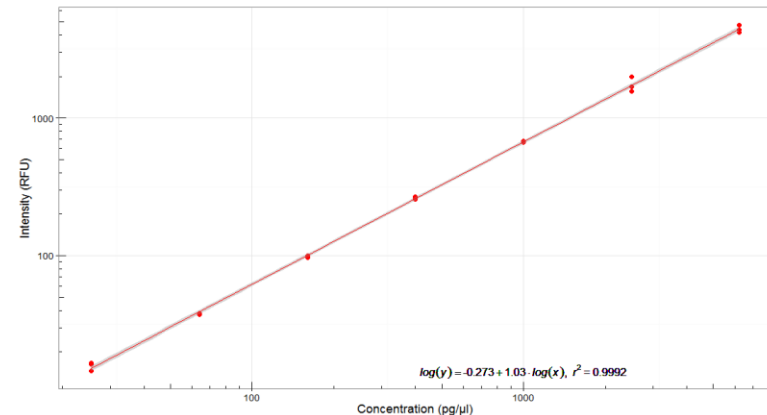
# A-Préparation des échantillons sur un robot pipeteur (Star /HAMILTON®)

- Décantation de plasma
- Extraction
- **Librairie**



# A-Préparation des échantillons sur un robot pipeteur (Star /HAMILTON®)

- Décantation de plasma
- Extraction
- Librairie
- **Quantification**



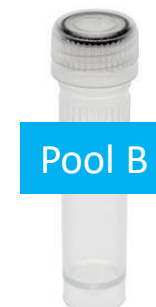
Contrôle qualité:  
-Slope: 0.95 –1.15

# A-Préparation des échantillons sur un robot pipeteur (Star /HAMILTON®)

- Décantation de plasma
- Extraction
- Librairie
- Quantification
- **Pool**

Check Pattern

|   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B  | A  | B  |
| B | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A  | B  | A  |
| C | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B  | A  | B  |
| D | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A  | B  | A  |
| E | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B  | A  | B  |
| F | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A  | B  | A  |
| G | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B  | A  | B  |
| H | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A  | B  | A  |



# B- Séquençage après amplification par création de clusters

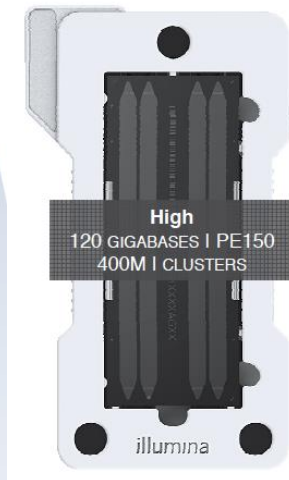
## NextSeq Illumina®



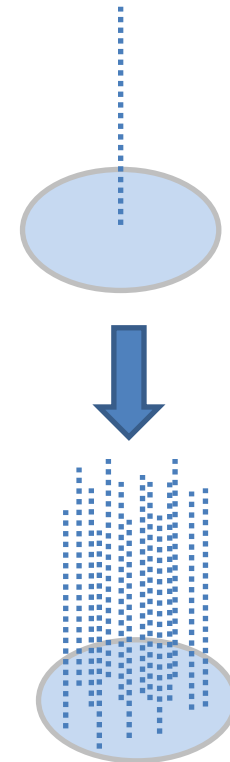
# Principe technique DPNI

## Séquençage sur Flowcell avec une étape d'amplification clusters

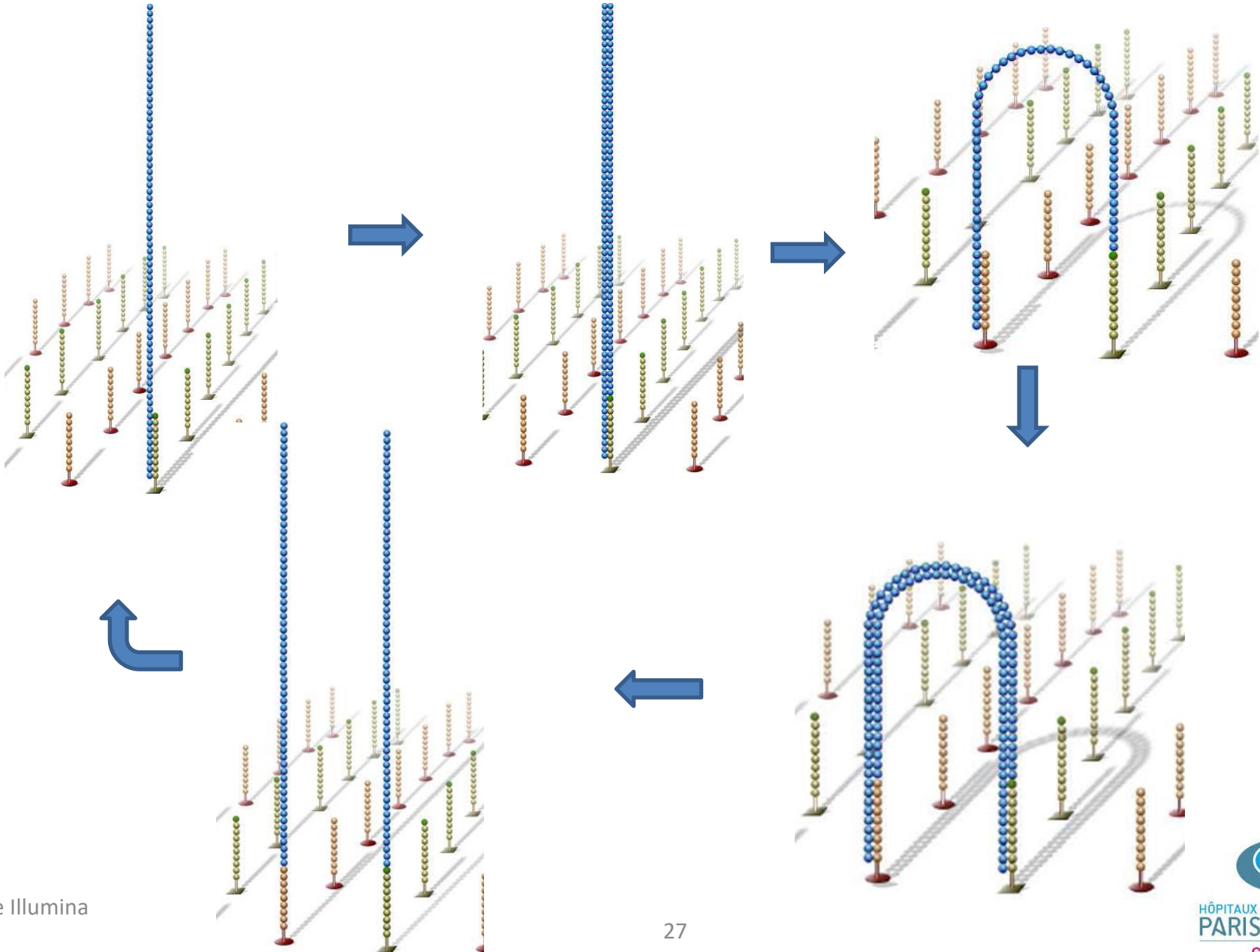
Qu'est ce une Flow cell ?



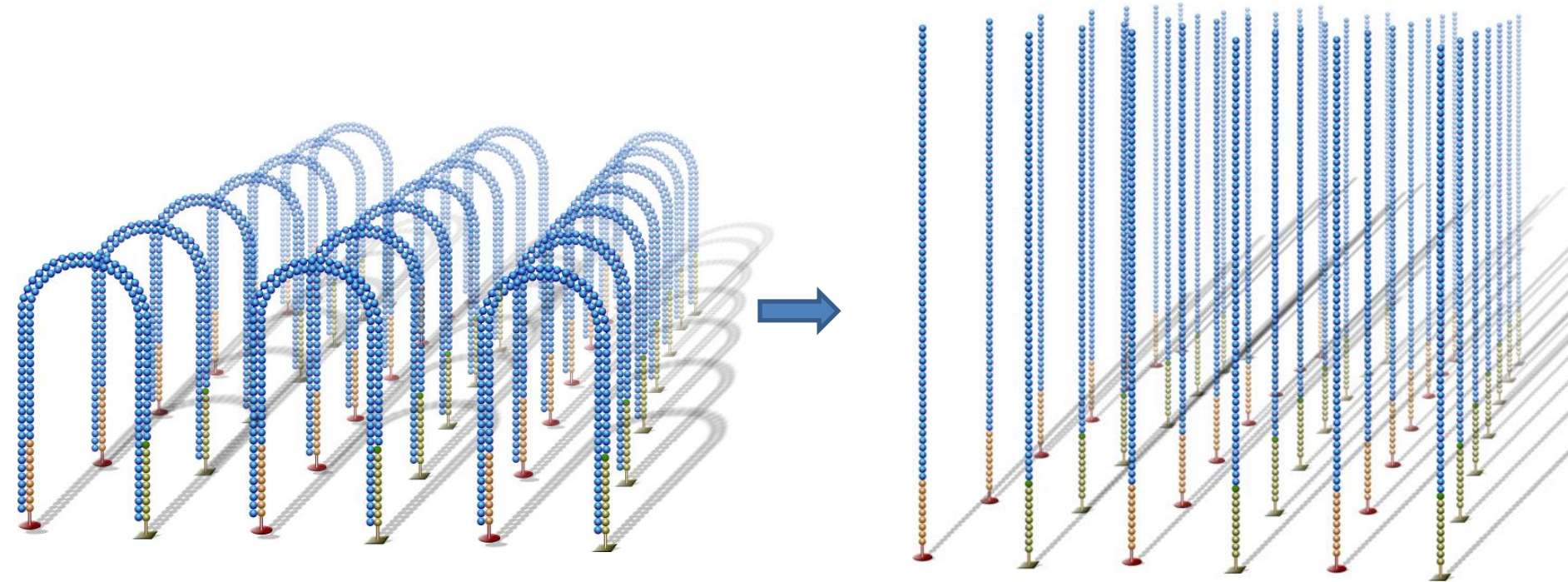
Qu'est ce un cluster ?



# Formations des clusters



# Formations des clusters



# Cycle de séquençage

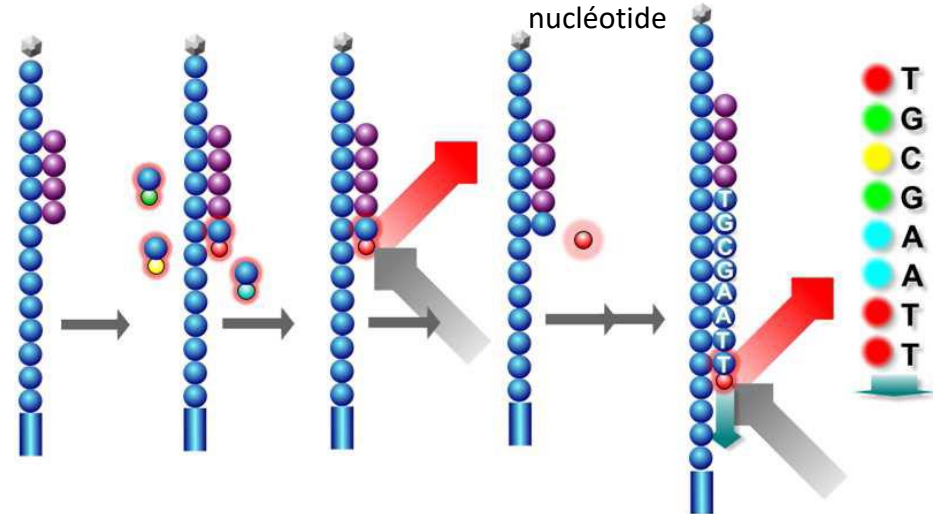
|         | red channel                                                                         | green channel                                                                       |   |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Cycle 1 |    |    | C |
| Cycle 2 |    |    | T |
| Cycle 3 |    |    | A |
| Cycle 4 |   |   | G |
| Cycle 5 |  |  | A |

1- Ajout 4 nucléotides

2- Incorporation

3- Lecture fluorescence

4- Retrait fluorescence et activation nucléotide



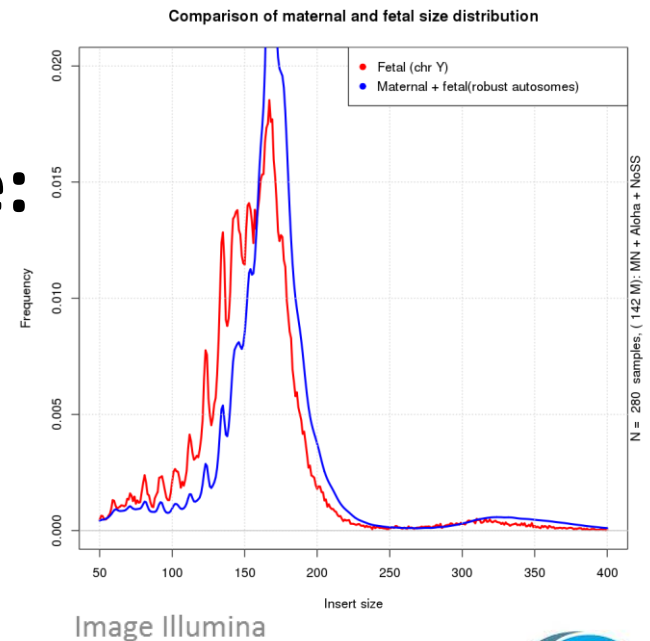
# Algorithme d'analyse

- **Détermination de la ploïdie:**

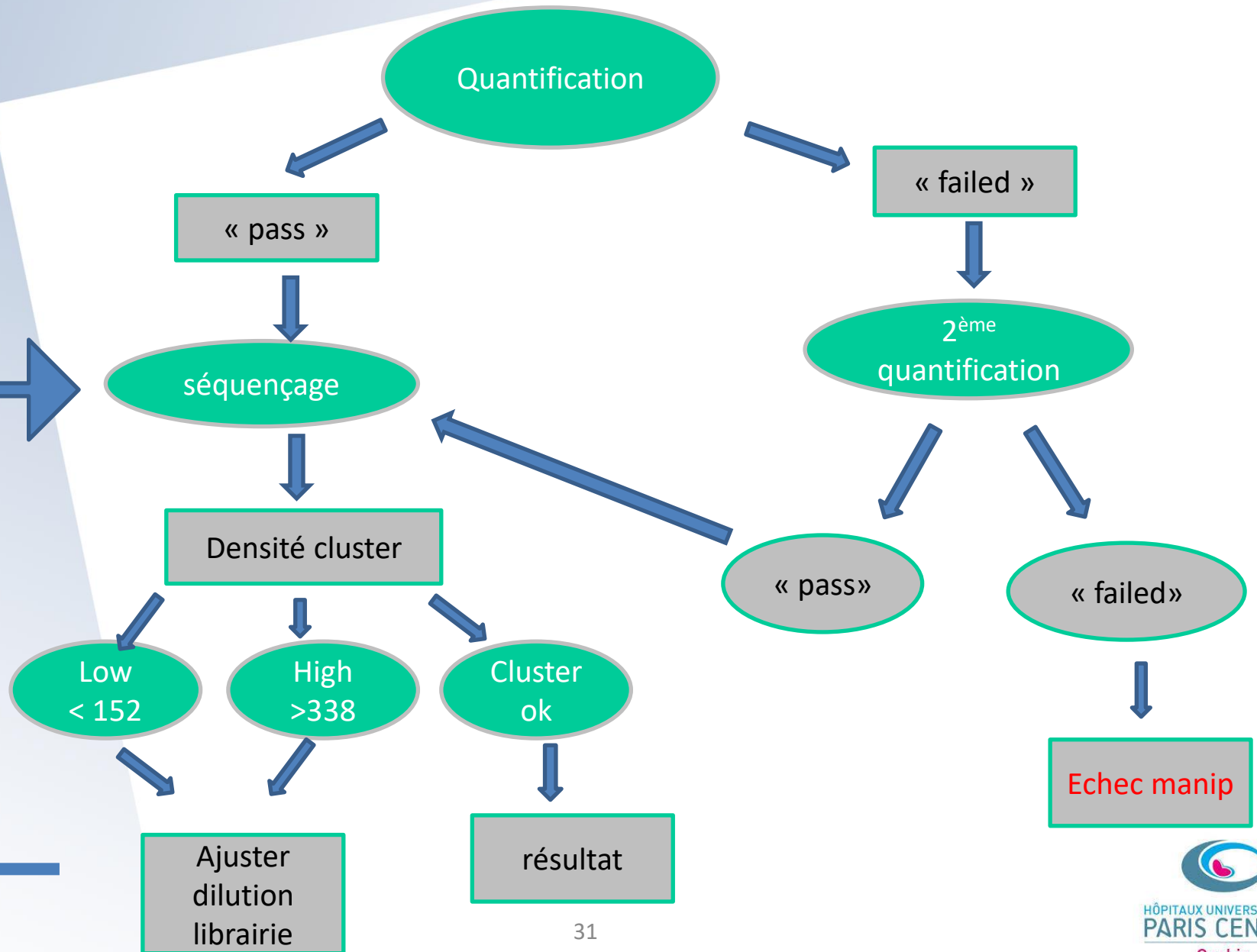
Basée sur le comptage moléculaire et le calcul d'un score chromosomique (comme expliqué précédemment)

- **Estimation de la fraction foétale:**

Basée sur la taille des fragments



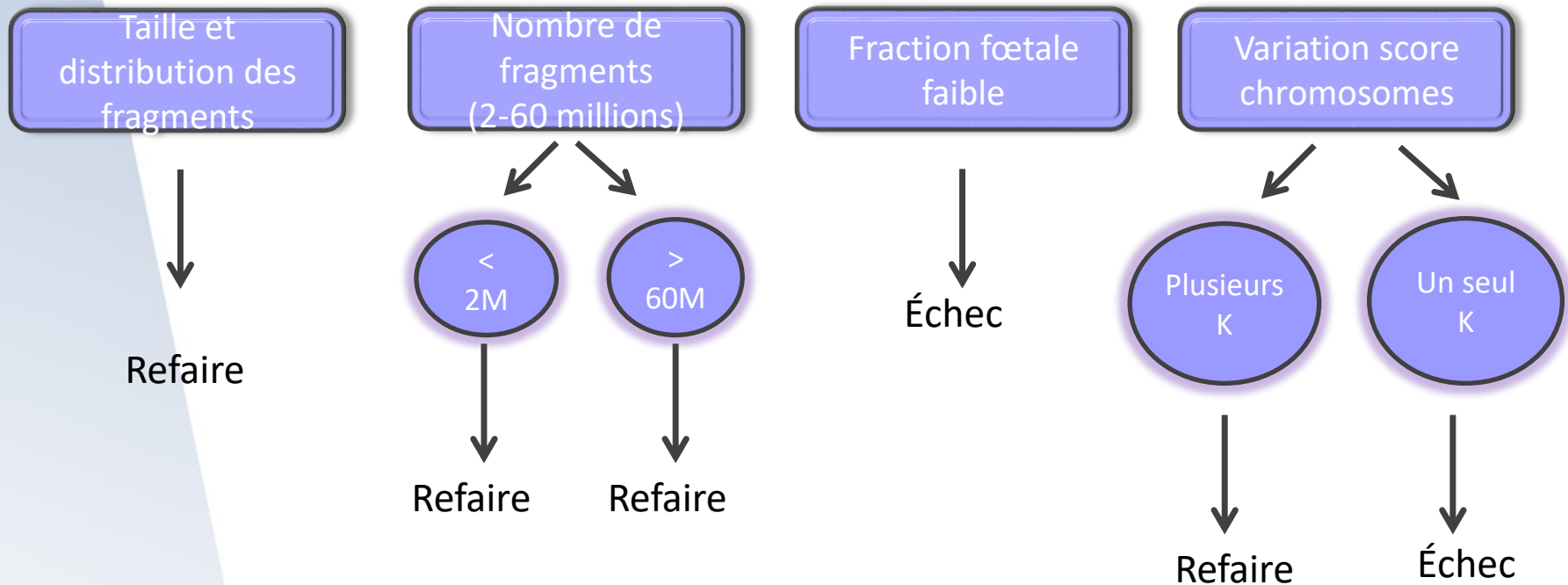
# Contrôles qualité analytique



# Rapport d'analyses

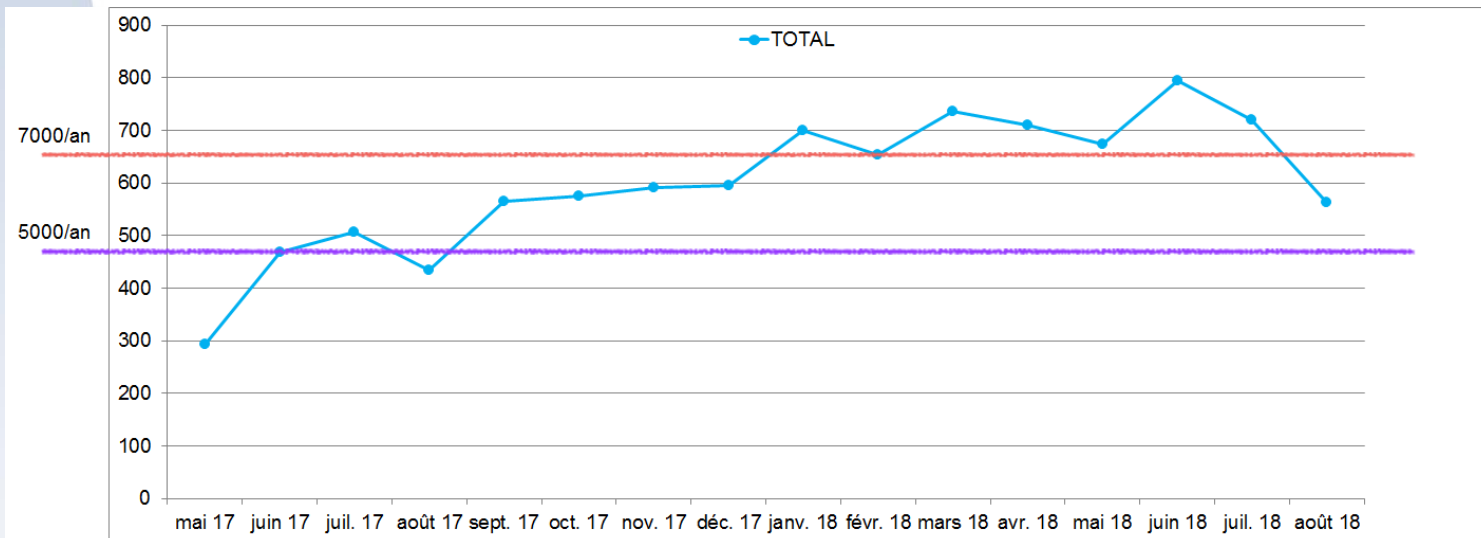
|    | A           | B              | C           | D         | E         | F          | G          | H          | I          | J          | K          | L       | M            | N           |
|----|-------------|----------------|-------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------|--------------|-------------|
| 1  | batch_name  | sample_barcode | sample_type | sex_chrom | flowcell  | class_13   | class_18   | class_21   | score_t13  | score_t18  | score_t21  | qc_flag | qc_failure   | ff          |
| 2  | LT180500622 | 170504621601   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | ANEUPLOIDY | -20,696    | -15,036    | 86,324     | PASS    | NONE         | 12%         |
| 3  | LT180500622 | 180504324701   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -7,197     | -6,638     | -6,76      | PASS    | NONE         | 7%          |
| 4  | LT180500622 | 180504947401   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | INVALIDATE | INVALIDATE | INVALIDATE | INVALIDATE | INVALIDATE | INVALIDATE | FAIL    | DATA OUTSI   | INVALIDATED |
| 5  | LT180500622 | 180504967701   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -43,239    | -31,84     | -27,939    | PASS    | NONE         | 14%         |
| 6  | LT180500622 | 180505342901   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -136,166   | -91,823    | -69,329    | PASS    | NONE         | 15%         |
| 7  | LT180500622 | 180505625401   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -13,445    | -10,953    | -7,186     | PASS    | NONE         | 10%         |
| 8  | LT180500622 | 180505994101   | Twin        | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -10,381    | -12,16     | -12,053    | PASS    | NONE         | 9%          |
| 9  | LT180500622 | 180506351601   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -139,288   | -133,813   | -99,643    | PASS    | NONE         | 18%         |
| 10 | LT180500622 | 180506536201   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -17,744    | -15,171    | -15,587    | PASS    | NONE         | 11%         |
| 11 | LT180500622 | 180506538501   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -29,099    | -15,122    | -14,629    | PASS    | NONE         | 11%         |
| 12 | LT180500622 | 180506540701   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -10,887    | -9,676     | -10,902    | PASS    | NONE         | 9%          |
| 13 | LT180500622 | 180506543401   | Twin        | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -157,021   | -108,314   | -91,159    | PASS    | NONE         | 16%         |
| 14 | LT180500622 | 180506587501   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -12,072    | -11,043    | -11,926    | PASS    | NONE         | 9%          |
| 15 | LT180500622 | 180506590901   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -15,371    | -15,034    | -15,95     | PASS    | NONE         | 11%         |
| 16 | LT180500622 | 180506635301   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -33,362    | -36,985    | -28,365    | PASS    | NONE         | 13%         |
| 17 | LT180500622 | 180506636901   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -23,019    | -16,421    | -14,448    | PASS    | NONE         | <1%         |
| 18 | LT180500622 | 180506637101   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -14,567    | -10,738    | -14,399    | PASS    | NONE         | 11%         |
| 19 | LT180500622 | 180506637601   | Twin        | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -4,075     | -5,505     | -4,822     | PASS    | NONE         | 5%          |
| 20 | LT180500622 | 180506638901   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | NO ANEUPLO | -101,288   | -67,947    | -25,56     | PASS    | NONE         | 15%         |
| 21 | LT180500622 | 180506640501   | Singleton   | yes       | HJFT7BGX7 | INVALIDATE | INVALIDATE | INVALIDATE | INVALIDATE | INVALIDATE | INVALIDATE | FAIL    | FAILED IFACT | INVALIDATED |

# Contrôles qualité post analytique



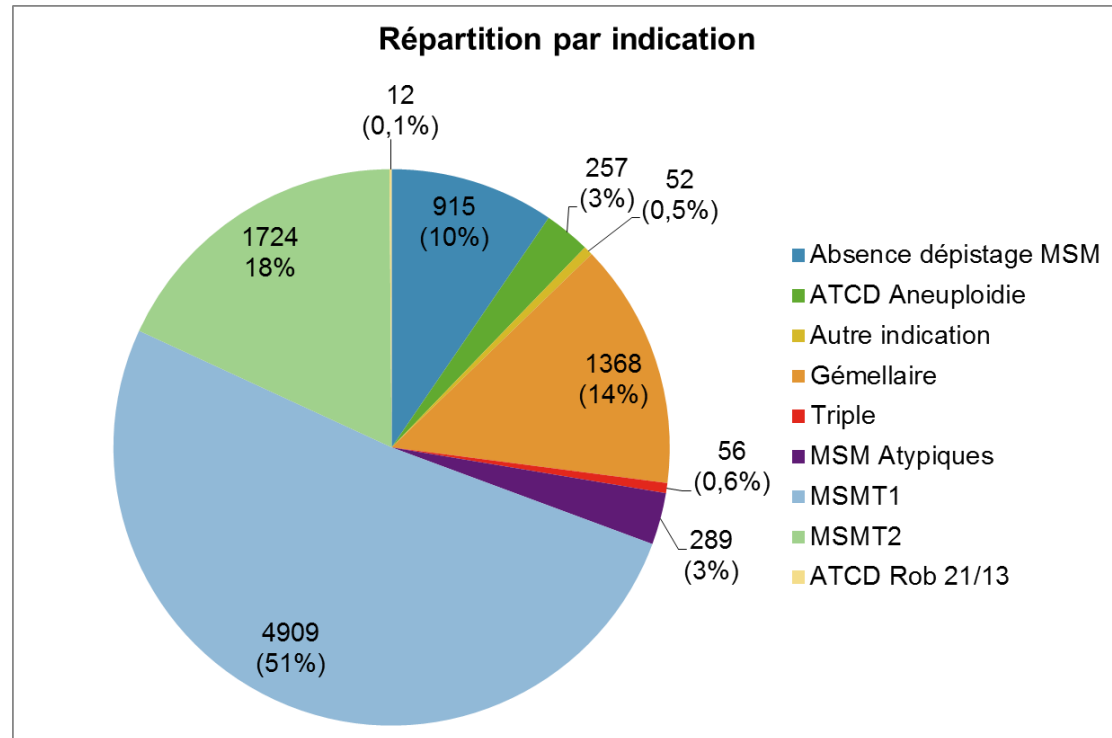
# Bilan de la plateforme

- Mai 2017 -> Août 2018
- 9582 tests pour les 13 maternités de l'APHP.



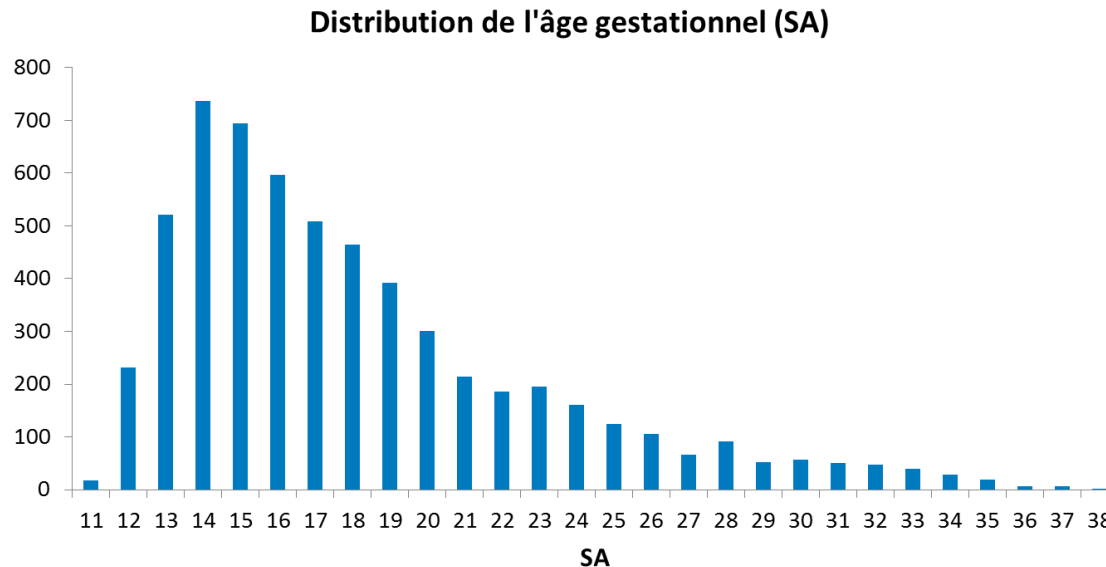
# Bilan de la plateforme

- Mai 2017 -> Août 2018
- 9582 tests pour les 13 maternités de l'APHP.
- Indications:



# Bilan de la plateforme

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



- Délai de réponse moyen (après réception) : 6 jours

# Bilan de la plateforme

- Anomalies détectées:
  - 91 T21
    - Sensibilité : 98,2%
    - Spécificité : 99,7%
  - 17 T18
  - 14 T13
- Taux d'échec 1<sup>er</sup> passage : 2,4%
- Taux d'échec final : 1,3%

# Les recommandations

- **Recommandations HAS (Singleton)**
  - Risque  $\geq 1/1000$  (MSM T1 ou à défaut MSM T2) : DPNI
  - Risque  $\geq 1/50$  : Caryotype de préférence ou DPNI
- **Recommandations complémentaires ACLF - CNGOF**
  - Grossesses gémellaires
  - Patientes n'ayant pas pu bénéficier des MSM
  - Profil de MSM atypique
  - ATCD de tri 13, 18 ou 21 foétale
  - Parent porteur d'une translocation robertsonienne impliquant un chr 13 ou 21

# Et pour l'avenir...

- A court ou moyen terme:
  - Autres trisomies
  - CNV de grande taille > 5Mb



**HAMILTON**

MERCI