



BU bibliothèque Lyon 1

<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

FACULTE DE PHARMACIE DE LYON

8, avenue Rockefeller – 69373 LYON Cedex 08

2014

THESE n°19-2014

**MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

**Travail effectué dans le Laboratoire de Biochimie
Unité des pathologies moléculaires de l'hémoglobine
Hôpital Edouard Herriot
Sous la direction de M le Dr Philippe JOLY**

SOUTENU DEVANT LE JURY INTERREGIONAL LE 1 OCTOBRE 2014

Par M Jean-Baptiste CAMPERGUE

Née le 24 Avril 1986 à Paris(14^{ème})

CONFORMEMENT AUX DISPOSITIONS DU DECRET N° 90-810 DU 10 SEPTEMBRE 1990,
TIENT LIEU DE THESE

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**« MISE AU POINT TECHNIQUE DE LA DÉTERMINATION DU SEXE FŒTAL DANS
LE SANG MATERNEL AUX HOSPICES CIVILS DE LYON »**

JURY

PRESIDENT :

Pr Christine VINCIGUERRA, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

MEMBRES :

Pr Damien SANLAVILLE, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Dr Philippe JOLY, Praticien Hospitalier

Dr Jérôme MASSARDIER, Praticien Hospitalier

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université M. François-Noël GILLY
- Vice-Président du Conseil d'Administration M. Hamda BEN HADID
- Vice-Président du Conseil Scientifique M. Germain GILLET
- Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire M. Philippe LALLE

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

- UFR de Médecine Lyon Est Directeur : M. Jérôme ETIENNE
- UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux Directeur : Mme Carole BURILLON
- Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
- UFR d'Odontologie Directeur : M. Denis BOURGEOIS
- Institut des Techniques de Réadaptation Directeur : M. Yves MATILLON
- Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine Directeur : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- Faculté des Sciences et Technologies Directeur : M. Fabien DE MARCHI
- UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) Directeur : M. Yannick VANPOULLE
- Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) Directeur : M. Pascal FOURNIER
- I.U.T. LYON 1 Directeur : M. Christophe VITON
- Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
- ESPE Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon
Directrice : Madame la Professeure Christine VINCIGUERRA
Directeurs Adjoints : Madame S. BRIANCON, Monsieur P. LAWTON, Monsieur P. NEBOIS
Madame S. SENTIS, Monsieur M. TOD

Directrice Administrative : Madame P. GABRIELE

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

- Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
- Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)
- Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
- Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU)
- Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

- Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
- Madame Françoise FALSON (Pr)
- Monsieur Hatem FESSI (Pr)
- Madame Joëlle BARDON (MCU - HDR)
- Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (MCU - HDR)
- Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
- Madame Ghania HAMDİ-DEGOBERT (MCU - HDR)
- Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
- Monsieur Fabrice PIROT (MCU - PH - HDR)
- Monsieur Patrice SEBERT (MCU - HDR)

- **BIOPHYSIQUE**

- Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
- Madame Laurence HEINRICH (MCU)
- Monsieur David KRYZA (MCU – PH)
- Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
- Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

- Monsieur François LOCHER (PU – PH)
- Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

- Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
- Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
- Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

- Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

- Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**
Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEBAULT (MCU)
Monsieur François COMET (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES** Madame
Claire BARDEL-DANJEAN (MCU) Madame
Marie-Aimée DRONNE (MCU) Madame Marie-
Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr) Madame
Nadia WALCHSHOFER (Pr) Monsieur
Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR) Madame
Christelle MARMINON (MCU) Madame
Sylvie RADIX (MCU -HDR) Monsieur Luc
ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
Monsieur Roland BARRET (Pr)
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH) Madame
Magali BOLON-LARGER (MCU - PH) Madame
Céline PRUNET-SPANNO (MCU) Madame
Catherine RIOUFOL (MCU - PH - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)
Madame Léa PAYEN (MCU -HDR)
- **PHYSIOLOGIE**
Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Bernard RENAUD (Pr)
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Madame Bernadette ASTIER (MCU - HDR)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)

Monsieur Olivier CATALA (Pr PAST)
Monsieur Pascal THOLLOT (MCU PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (AHU)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Monsieur Benoit DUMONT (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**
Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**
Monsieur Philippe LAWTON (Pr - HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU – HDR)
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**
Madame Emilie BLOND
Madame Christelle MOUCHOUX
Madame Florence RANCHON

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**
Monsieur Eyad AL MOUAZEN 85^{ème} section
Monsieur Boyan GRIGOROV 87^{ème} section
Madame Mylène HONORAT 85^{ème} section
Monsieur Abdalah LAOUINI 85^{ème} section
Madame Marine CROZE 86^{ème} section

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel



SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Remerciements

A Madame la Professeure Christine Vinciguerra,

Vous me faites le très grand honneur de présider mon jury de thèse. Après vous avoir connue Professeure en 3^{ème} année de pharmacie, j'ai eu le grand plaisir de vous avoir comme Doyenne de la faculté. Partenaire privilégiée de notre syndicat d'internes, vous avez toujours fait preuve de discernement, sagesse et compréhension à notre égard. Merci de votre soutien qui a pu faire avancer nos projets. Je pense partager votre vision du rôle que jouera le pharmacien, et plus particulièrement le biologiste médical, dans l'avenir de notre système de santé.

A Monsieur le Docteur Philippe Joly,

Tu m'as accueilli dans ton bureau dès mon arrivée au sein du laboratoire. Merci de m'avoir proposé ce travail et d'avoir fait en sorte que l'on puisse le mener jusqu'au bout. Merci de ta patience et de ta compréhension à mon égard. Je te suis infiniment reconnaissant de m'avoir laissé conjuguer mon stage avec des impératifs syndicaux. Je garde en mémoire nos longs échanges sur les arcanes du pouvoir, et les forces occultes qui s'exercent sur nos pauvres épaules. Merci de m'avoir enseigné le traitement de texte (¶). Je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta famille grandissante, et j'espère que nous resterons amis.

A Monsieur le Professeur Damien Sanlaville,

Je suis très honoré de vous avoir dans mon jury, à la fin d'un travail qui n'aurait pas pu commencer sans votre coup de pouce. Merci d'avoir coordonné toutes les équipes jusqu'à l'obtention de l'avis du CPP.

A Monsieur le Docteur Jérôme Massardier,

Je vous remercie d'avoir accepté aussi facilement de participer à mon jury afin d'y apporter un œil clinique. Merci de m'avoir appris les PV (et oui !) lors d'une de vos consultations.

A Madame le Docteur Anne-Marie Villaros,

Vous ne participez pas à mon jury à mon grand regret. Je vous sais gré de m'avoir aidé en prenant le temps d'inclure des patientes dans cette étude. Sans vous, il n'aurait pas été possible de réaliser ce travail. Votre gentillesse est rare. Merci encore et bonne continuation.

A toute l'équipe du laboratoire d'Edouard Herriot,

Pour leur gentillesse, leur accueil et leur soutien. Sans eux, la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible. Caroline, Martine, Joelle, Fabienne Philippe et Vincent Flardo.

A ceux du SIPHL,

Bravo pour votre engagement. Pendant 4 ans nous avons fait en sorte de tirer nos stages d'interne vers le haut et tenté d'apporter dynamisme et bonne ambiance à une communauté discrète et casanière. J'espère que les plus jeunes pourront profiter de notre travail et continueront sur la voie que nous avons tracée. Merci plus particulièrement à Anthony, dont la clairvoyance nous fit remporter de rudes batailles. Tu es le Sun Tzu de la biologie. Merci à Fred, ton dévouement fut un exemple, et le feu d'artifice de l'AG sa récompense. Merci à Benoît, ton passage au bureau fut bref mais remarqué, merci d'avoir accepté ce poste l'année dernière. Merci à tous les autres, et bonne chance aux suivants ! La tâche est ingrate, mais quand on y pense, ca vaut le coup !!

A ceux de l'AIBML,

Relancer la solidarité dans l'internat lyonnais, quel défi ! Le chemin fut long et difficile, mais je pense que nous y sommes arrivés. Une bien belle équipe, complémentaire et impliquée. Nous avons rempli la majorité des challenges que nous nous étions lancés. C'était une expérience magnifique et je suis heureux d'avoir pu voir le forum de la biologie. Bravo à vous tous, et à tout à l'heure.

A ceux de la FNSIP.BM,

Notre combat pour la médicalisation de la biologie n'est pas fini. J'ai été fier de pouvoir y participer de toutes mes forces pendant 1 an. Vous avez toujours fait preuve de ténacité, défendant jusqu'au bout un idéal auquel je crois complètement : un biologiste médical au service de son patient, praticien de laboratoire rigoureux, apportant conseil et efficience à notre belle profession.

A ceux de l'AIAIPHL,

Vous avez toujours été un contact privilégié des internes. Merci de maintenir le fil qui nous sépare maintenant de cet internat joyeux, dynamique (et presque loufoque) dont nous avons tant entendu parler. Merci pour les bourses qui permettent aux internes de mener leurs projets de recherche, merci pour les médailles, merci pour ces soirées rigolantes et chantantes. Je tiens à remercier plus particulièrement Bernard Poggi, dont le dynamisme et l'implication nous a permis d'améliorer notre internat au niveau pédagogique. Merci également pour vos conseils sur l'évolution de la biologie. Enfin merci d'avoir donné un coup de pouce pour notre forum de la biologie, qui n'aurait pas vu le jour sans vous. Je pense également aux autres membres du conseil d'administration (Y Barbier, B Guillot, JP Molgatini, P Nicollin et J Greffe), avec qui j'ai toujours passé d'agréables soirées. A bientôt !

A ma famille,

Modèle, unie et soudée. Je suis très fier de la voir s'agrandir aujourd'hui. Merci plus particulièrement à mes parents, qui m'ont soutenu au long de mes études. J'ai toujours pu compter sur vous dans les moments difficiles. Vos conseils avisés et de bon sens se sont révélés judicieux. C'est un modèle que je m'efforcerai d'appliquer par la suite. Je pense également à mes sœurs, dont la vie a pris récemment un tournant nouveau. Attendez moi, j'arrive ! A mes grands parents, depuis l'époque des cahiers de vacances, j'espère vous avoir rendu fiers. Je pense à vous très fort.

To Marie,

I miss you ! I have been waiting for this moment for so long and I feel so happy to be with you on this special date. Thank you ! I know that even if we are far away, we will always be a support for each other. The day you'll come back will probably be one of the best of my life. I know you'll do a great job overseas. I trust you more than you do yourself. With love.

A Emeline et Adrien,

Votre mariage est dans une semaine, je pense très fort à vous. Depuis presque 10 ans, nos chemins se sont croisés sans se perdre, malgré des trajectoires bien différentes. Vous êtes des amis rares et de confiance. Merci de m'avoir choisi comme témoin de votre mariage. C'est un honneur qui me remplit de joie. Je me rappellerai longtemps avoir exploré la jungle asiatique à vos côtés. On s'est bien marrés.

A Jérôme,

Tu es la première personne que j'ai rencontrée sur les bancs de la fac. Je suis très heureux que notre amitié s'endurisse. On a bien changé depuis le temps, où sont passées doudounes et Air Max ? Je sais que je peux compter sur toi. J'espère que je pourrai être à la hauteur de cette confiance. A Alexia, je suis très heureux de pouvoir venir mettre les pieds sous la table chez toi.

A Clément,

Cher ami, tu es une personne unique que j'ai appris à connaître depuis 4 ans maintenant. Je suis heureux que l'on puisse compter l'un sur l'autre, ton amitié signifie beaucoup pour moi (n'en doute pas ;-). J'ai été très heureux de partager tant de petits jours de m à tes côtés. Je pense que l'on n'est pas près de se perdre de vue. A tout à l'heure amigo.

A Nicolas,

Un biologiste hors pair, doté d'un sens de l'organisation étonnant ! Ton sérieux et ton bon sens font de toi quelqu'un de grande confiance, à qui l'on peut se confier. T'es un vrai pote. Merci aussi pour ton implication dans la communauté. J'ai beaucoup apprécié travailler à tes côtés. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta vie familiale, sans me faire trop de souci.

A mes amis rouennais,

Un groupe indéfectible, unis par une promesse de jeunesse.

A Stéphane et Adrien,

Merci pour votre gentillesse et votre amitié. Depuis que l'on se connaît vous n'avez cessé de me surprendre. Je passe de très bons moments à vos côtés. Bon courage pour la suite !

A Tom,

Ne perd pas espoir mon petit pote, tu vas finir par décrocher la timbale. Tu as déjà démontré ton tempérament de fonceur, il te manque juste un petit coup de pied au c.

Au groupe de l'AIBML,

Charlotte, je suis très heureux que l'on ait appris à se connaître. Tu es une biologiste hors pair également, j'apprends beaucoup à tes côtés (pas autant que je voudrai, à cause justement de cette thèse :). J'apprécie ta droiture et ton engagement, qui m'ont inspirés à certains moments au cours de mes pérégrinations syndicales. Tu auras j'en suis sûr une très belle vie familiale et professionnelle. Merci également pour l'aide (sang et relecture) que tu m'as spontanément apporté lors de ma thèse.

Anthony (re), je tiens vraiment à te remercier pour ta gentillesse et ta générosité. Tous les compliments reçus lors de ta soutenance t'ont bien décrits je trouve. Tu as le don de simplifier toute situation et de trouver les solutions aux problèmes inextricables. Tu seras je pense un très bon professeur, appliqué et non fumeur (rappelle toi du pari ;)

Vincent, je suis très content d'avoir pu travailler à tes côtés. C'était un des meilleurs semestres. J'aurai finalement appris à mieux te connaître en fin d'internat. Bonne chance pour ton année d'école. J'espère que tu resteras dans la biologie, on aura plein de projets à monter.

Une pensée à tous les autres (Alex, Fanélie, PAB, Elsa, Pauline, Yann), et merci pour votre engagement.

A mes deux VP Bio préférés, Roman et Marc,

J'espère que cette expérience vous aura fait prendre le sens des responsabilités (un peu). Merci d'avoir accepté de faire ce bout de chemin à mes côtés.

A mes amis de pharma,

Caroline, Lauren et tous les petits potes que l'on perd de vue petit à petit. Je pense quand même à vous !

A tous mes amis internes,

Tout au long de mon internat, j'ai essayé de donner le maximum pour que notre statut soit reconnu et notre avenir pas aussi noir que certains ne nous le décrivent. Je tiens à vous remercier d'avoir su vous mobiliser dans les moments d'urgence. Quelle fierté de vous voir tous à Paris ! Soyez assurés que ça a servi. J'espère que vous continuerez de faire preuve de ténacité et d'éthique tout au long de votre carrière professionnelle.

Merci à tous ceux qui un jour m'auront donné un coup de pouce, repris une garde ou aidé d'une quelconque manière. **La solidarité est une force !**

Merci à toi si tu es venu à ma soutenance, ou si tu lis ces pages.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Campergue', is centered on the page. The signature is written in a cursive, flowing style.

Table des matières

TABLE DES MATIERES	14
INDEX DES FIGURES	17
INDEX DES TABLEAUX	17
LISTE DES ABREVIATIONS	18
INTRODUCTION	19
PARTIE 1 – ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	21
1 – ETAT DES LIEUX DU DIAGNOSTIC PRE NATAL EN FRANCE	21
1.1 – Définition.....	21
1.2 – Cytogénétique.....	21
1.3 – Biologie moléculaire.....	24
1.4 – Diagnostic pré natal non invasif (DPNNI).....	24
1.5 – Le DPN aux Hospices Civils de Lyon	25
2 – LA REVOLUTION DU DIAGNOSTIC PRE NATAL NON INVASIF	27
2.1 – Contexte et histoire	27
2.2 – L’ADN foetal libre circulant.....	28
2.2.1 – Découverte.....	28
2.2.2 – Cinétique.....	29
2.2.3 – Taille.....	30
2.2.4 – Origine.....	31
2.2.4.1 – ADN plasmatique total.....	31
2.2.4.2 – ADN plasmatique foetal.....	32
2.2.5 – Applications cliniques	33
2.2.5.1 – Anomalies qualitatives	33
2.2.5.1.1 – Détermination du sexe foetal.....	33
2.2.5.1.2 – Prévention de l’allo-immunisation foeto maternelle	34
2.2.5.1.3 – Diagnostic d’une mutation génétique	35
2.2.5.2 – Anomalies quantitatives	36
2.2.5.2.1 –Détermination des aneuploïdies – cas de la Trisomie 21.....	36
2.2.5.2.2 – Autres anomalies quantitatives	38
3 – DETERMINATION DU SEXE FCETAL DANS LE SANG MATERNEL	39
3.1 – Principe général du test SRY	39
3.2 – Applications médicales du diagnostic de sexe foetal sur plasma maternel	40
3.2.1 – Maladies récessives liées à l’X.....	40
3.2.2 – Hyperplasie congénitale des surrénales (HCS).....	41
3.2.3 – Contraintes médicales du test SRY	44
3.3 – Recommandations techniques du test SRY	44

3.3.1 – Contexte	44
3.3.2 – Plasma ou sérum ?	44
3.3.3 – Centrifugation	45
3.3.4 – Extraction	46
3.3.5 – Amplification	47
3.3.5.1 – Gènes d'intérêt	47
3.3.5.2 – Technique utilisée	47
3.3.5.2.1 – PCR en point final	47
3.3.5.2.2 – PCR en temps réel	48
a) TaqMan	48
b) FRET	50
3.3.6 – Contrôle du test	50
3.3.6.1 – Contrôle négatif	50
3.3.6.2 – Contrôle positif	51
3.3.6.2.1 – Double amplification	52
3.3.6.2.2 – ADN traceur de souris	52
3.3.6.2.3 – Marqueur paternel autre que Y	52
PARTIE 2 – MATERIEL ET METHODE	54
1 – CONSTRUCTION DE L'ETUDE	54
1.1 – <i>Considérations éthiques</i>	54
1.1.1 – Etude non interventionnelle	54
1.1.2 – Protection des patientes	54
1.2 – <i>Inclusion des patientes</i>	55
1.3 – <i>Obtention du sexe réel de l'enfant</i>	55
2 – ETAPE PRE-ANALYTIQUE	56
2.1 – <i>Prélèvement</i>	56
2.2 – <i>Transport</i>	56
2.3 – <i>Centrifugation</i>	57
2.4 – <i>Extraction</i>	58
3 – ETAPE ANALYTIQUE	58
3.1 – <i>Bio-informatique</i>	58
3.1.1 – Identification des séquences	58
3.1.2 – Design des amorces et de la sonde	59
3.1.2.1 – Séquence des amorces et de la sonde	59
3.1.2.2 – Amorces : vérification de leur séquence et de leur sensibilité	59
3.1.2.3 – Contrôle de la bonne identité de la PCR	60
3.2 – <i>Préparation des milieux réactionnels</i>	60
3.2.1 – PCR TaqMan DYS14	60
3.2.2 – PCR Fret SRY	62
3.3 – <i>Caractéristiques de la PCR</i>	62

4 – ETUDE DE CONTAMINATION	63
PARTIE 3 – RESULTATS.....	64
1 – RESULTATS BRUTS.....	64
2 – SENSIBILITE/SPECIFICITE DU TEST	64
2.1 – <i>Spécificité</i>	64
2.2 – <i>Sensibilité</i>	67
2.2.1 – Sensibilité de la cohorte	67
2.2.2 – Limite de sensibilité.....	68
3 – ETUDE DE CONTAMINATION	69
PARTIE 4 – DISCUSSION	70
1 – DISCUSSION METHODOLOGIQUE.....	70
1.1 – <i>Etape pré analytique</i>	70
1.2 – <i>Etape analytique</i>	71
1.3 – <i>Analyse du résultat</i>	72
2 – UTILISATION DU TEST EN ROUTINE	72
3 – PERSPECTIVES	73
3.1 <i>Test SRY</i>	73
3.2 <i>Considérations éthiques</i>	74
CONCLUSIONS	75
ANNEXES.....	77
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	86

Index des figures

<u>FIGURE 1.</u> EVOLUTION DU NOMBRE DE FEMMES AYANT FAIT UN PRÉLÈVEMENT POUR CARYOTYPE FŒTAL.	23
<u>FIGURE 2.</u> EVOLUTION DU NOMBRE DE FEMMES AYANT BÉNÉFICIÉ D’UN DPNNI POUR LES INDICATIONS : DÉTERMINATION DU RHÉSUS FŒTAL (TABLEAU GAUCHE) ET DÉTERMINATION SEXE FŒTAL (TABLEAU DROIT).	25
<u>FIGURE 3</u> – ÉTUDE DE LA TAILLE DE L’ADN CIRCULANT DANS DEUX PLASMAS DE FEMMES ENCEINTES. LE TRAIT PLEIN REPRÉSENTE UN PLASMA PAUVRE EN ADN FŒTAL ET LE TRAIT POINTILLÉ UN PLASMA PLUS RICHE.	31
<u>FIGURE 4</u> – STRATÉGIE DE DIAGNOSTIC DE LA TRISOMIE 21.	38
<u>FIGURE 5</u> – UTILITÉ DU TEST SRY DANS LA PRISE EN CHARGE DU DPN DES MALADIES LIÉES À L’X.	41
<u>FIGURE 6</u> – PROTOCOLE DE PRISE EN CHARGE DES GROSSESSES À RISQUE D’HCS DEPUIS 2002 EN FRANCE.	43
<u>FIGURE 6</u> – PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE PCR TEMPS RÉEL TAQMAN.	49
<u>FIGURE 7</u> – PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE PCR TEMPS RÉEL FRET.	51
<u>FIGURE 8</u> – CARTE REPRÉSENTANT LES LABORATOIRES DE BIOLOGIE MÉDICALE (EN ROUGE) AYANT PARTICIPÉ À NOTRE ÉTUDE.	57
<u>FIGURE 9</u> – DÉTECTION DU GÈNE <i>DYS14</i> PAR TECHNIQUE TAQMAN.	65
<u>FIGURE 10</u> – DÉTECTION DU GÈNE <i>SRY</i> PAR TECHNIQUE FRET.	65
<u>FIGURE 11</u> – SENSIBILITÉ DE NOTRE PCR <i>DYS14</i> TAQMAN.	68
<u>FIGURE 12</u> – MISE EN ÉVIDENCE DE CONTAMINATION DE NOS EXTRAITS DE SÉRUMS DE FEMMES ENCEINTES PAR DE L’ADN GÉNOMIQUE.	69

Index des tableaux

<u>TABLEAU I</u> – VITESSE DE CENTRIFUGATION DU SANG MATERNEL AVANT EXTRACTION DE L’ADN PLASMATIQUE FŒTAL DANS LA LITTÉRATURE.	46
<u>TABLEAU II</u> – SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE DES AMORCES.	59
<u>TABLEAU III</u> – SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE DES SONDAS.	59
<u>TABLEAU IV</u> – CONTRÔLE DES SNP SUR NOS AMORCES.	61
<u>TABLEAU V</u> – CARACTÉRISTIQUES DE NOS RÉACTIONS PCR.	63
<u>TABLEAU VI</u> – RÉSULTATS DU TEST SRY DE NOTRE COHORTE, COMPARÉS AVEC LE SEXE DE L’ENFANT À LA NAISSANCE.	66
<u>TABLEAU VII</u> – ANALYSE DES SÉRUMS DE GROSSESSE « MASCULINES » ANTÉRIEURES À 8 SA EN FONCTION DE NOMBRE DE CYCLES PERMETTANT D’OBTENIR UN SIGNAL AVEC NOTRE TECHNIQUE TAQMAN.	67

Liste des abréviations

CBPE – Centre de biologie et pathologie est

CHU – Centre hospitalo universitaire

CPDPN – Centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal

CPP – Comité de protection des personnes

DEX – Dexaméthasone

DPN – Diagnostic prénatal

DPNNI – Diagnostic prénatal non invasif

HAS – Haute autorité de santé

HCL – Hospices civils de Lyon

HCS – Hyperplasie congénitale des surrénales

HPA – *Human platelet antigen*

IMG – Interruption médicale de grossesse

LBMMS – Laboratoire de biologie multi-sites

MLPA – *Multiplex ligation-dependent probe amplification*

NABM – Nomenclature des actes de biologie médicale

PCR – *Polymerase chain reaction*

SA – Semaine d'aménorrhée

SNP – Single nucleotid polimorphism

Introduction

Le diagnostic prénatal (DPN) repose sur la mise en évidence de matériel génétique fœtal. Pour en obtenir, on effectue un prélèvement invasif, soit par ponction de villosités choriales soit par amniocentèse. Le principal inconvénient de ces prélèvements est le risque de fausses couches (0,5 à 1%). La découverte en 1997 de l'ADN fœtal circulant, ou ADN libre, dans le sang maternel a ouvert la voie au diagnostic prénatal non invasif (DPNNI), qui ne présente aucun risque pour le fœtus. La détermination du sexe fœtal dans le sang maternel, ou « test SRY » a été la première application mise en place en routine. Elle repose sur la mise en évidence de séquences du chromosome Y (présentes uniquement dans le génome masculin) : si l'on retrouve ces séquences, c'est que le fœtus est de sexe masculin. Si on ne les retrouve pas, c'est que le fœtus est de sexe féminin.

La détermination du sexe fœtal dans le sang maternel possède deux applications majeures :

(i) Le diagnostic de maladies liées à l'X : dans ce cas, le test est réalisé à 10 semaines d'aménorrhées. Un DPN invasif ne sera proposé que dans le cas où le fœtus est de sexe masculin, ce qui diminue théoriquement de 50% le risque de fausses couches liées au prélèvement.

(ii) L'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS) : dans ce cas, le test est réalisé avant 9 semaines d'aménorrhées, date de réceptivité du bourgeon génital aux androgènes. Le déficit en 21 hydroxylase est alors compensé par un traitement de la femme enceinte à la dexaméthasone (DEX), uniquement dans le cas d'un fœtus féminin pour éviter la virilisation des organes génitaux externes.

Les autres applications du DPNNI actuellement disponibles sont la détermination du Rhésus fœtal et le dépistage de la trisomie 21. Il s'agit d'une discipline innovante en progression rapide depuis quelques années. En France, le DPNNI en général et le diagnostic

de sexe fœtal en particulier sont réalisés majoritairement dans des laboratoires privés. Le développement de ces techniques est en cours au sein des Centres Hospitalo-Universitaires publics. L'objectif de cette thèse est donc la mise au point technique du diagnostic de sexe fœtal dans le sang maternel dans le cadre d'un travail pluridisciplinaire des Hospices Civils de Lyon sur le DPNNI.

Après une revue de la littérature sur l'ADN plasmatique, nous verrons les différentes étapes de mise au point du test SRY, qui a été validé à partir de 6,5 semaines d'aménorrhées sur une cohorte de 49 patientes en début de grossesse.

Partie 1 – Analyse bibliographique

1 – Etat des lieux du Diagnostic Pré Natal en France

1.1 – Définition

D'après l'article L2131-1 du Code de la Santé publique, «le diagnostic prénatal s'entend des pratiques médicales, y compris l'échographie obstétricale et fœtale, ayant pour but de détecter *in utero* chez l'embryon ou le fœtus une affection d'une particulière gravité». Les pathologies recherchées peuvent être d'origine génétique, comme la trisomie 21 ou la mucoviscidose, ou encore d'origine infectieuse, comme la toxoplasmose ou la rubéole. L'impact social et économique de cette disposition est important puisqu'il peut amener à prendre la décision d'une interruption médicale de grossesse (IMG), au sens de l'article L.2213-1, issu de la loi de bioéthique du 7 juillet 2011. De plus, la réalisation du diagnostic prénatal n'est pas un acte anodin puisqu'il est accompagné d'un risque de survenue de fausse-couche iatrogène dans 0.5 à 1 % des cas (1). Au cours de cette thèse, nous nous intéresserons au diagnostic prénatal (DPN) génétique, qui vise à mettre en évidence une anomalie chromosomique ou d'un gène *in utero*.

Il nécessite actuellement encore la réalisation d'un prélèvement fœtal invasif qui est soit une ponction de villosités choriales à partir de 11 semaines d'aménorrhées (SA), soit une ponction de liquide amniotique (amniocentèse) après 15 SA. Ce prélèvement permet d'accéder au matériel génétique du fœtus, qui est analysé selon des techniques de cytogénétique ou de biologie moléculaire.

1.2 – Cytogénétique

La cytogénétique représente environ 75% de l'activité de DPN, soit 41.639 examens réalisés en 2012. Elle repose sur l'analyse du caryotype, qui peut être complétée par des

techniques d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Le caryotype est l'identification et le classement des chromosomes de l'individu. Dans le cadre du DPN, il permet d'identifier chez le fœtus une anomalie déséquilibrée, portant sur le nombre de chromosomes, ou une anomalie équilibrée avec une résolution de l'ordre de 2 Mb.

En 2014, la sécurité sociale reconnaît et prend en charge le recours à la cytogénétique dans 5 cas :

- Les grossesses dont le risque d'avoir un enfant atteint de trisomie 21 s'avère, après utilisation du dépistage combiné, supérieur ou égal à 1/250 au moment du prélèvement. Cette disposition est prévue par l'arrêté du 23 juin 2009 fixant les règles de bonne pratique du dépistage de la trisomie 21. La détermination du risque combiné prend en compte le dosage des marqueurs sériques du 1^{er} trimestre et les mesures échographiques de la clarté nucale ainsi que de la longueur crânio-caudale.
- En cas de signes d'appel échographiques après consultation d'une équipe d'un centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal (CPDPN). Au 1^{er} trimestre il est tenu compte de la mesure de la nuque, aux 2^{ème} et 3^{ème} trimestres de la présence de malformations, anomalies de quantité de liquide amniotique ou retard de croissance intra-utérin. Cette disposition est prévue à l'article R162-29 du code de la santé publique.
- Dans le cas d'un couple présentant des antécédents de grossesses avec caryotype anormal.
- Dans le cas d'une maladie génétique liée à l'X, une détermination du sexe fœtal est proposée systématiquement. Cette indication est probablement en diminution du fait de l'émergence du diagnostic prénatal non invasif, qui fait l'objet de ce travail de thèse.
- Un DPN génétique est proposé systématiquement en cas de présence chez un des parents d'un remaniement chromosomique.

L'âge maternel n'est plus une indication depuis l'arrêté du 23 juin 2009, car il entre dans l'algorithme de calcul du risque.

En 2012, sur 4663 anomalies détectées, 4066 étaient des anomalies déséquilibrées, c'est à dire qu'elles portaient sur le nombre de chromosomes. Par ordre de fréquence, les anomalies déséquilibrées diagnostiquées sont la Trisomie 21 (48,5%), la Trisomie 18 (16,7%), le Syndrome de Turner (8,7%, caryotype 45, X), la Trisomie 13 (6,5%), une Triploïdie (3,7%), le Syndrome de Klinefelter (1,3%, caryotype 47, XXY), ainsi que d'autres anomalies plus rares (Trisomie X, d'autres dysgonosomies etc.). Depuis 2010, le nombre de femmes ayant eu un caryotype fœtal est en importante diminution (Figure 1). Ce phénomène s'explique par la mise en place du dépistage combiné de la trisomie 21 au 1^{er} trimestre de grossesse.

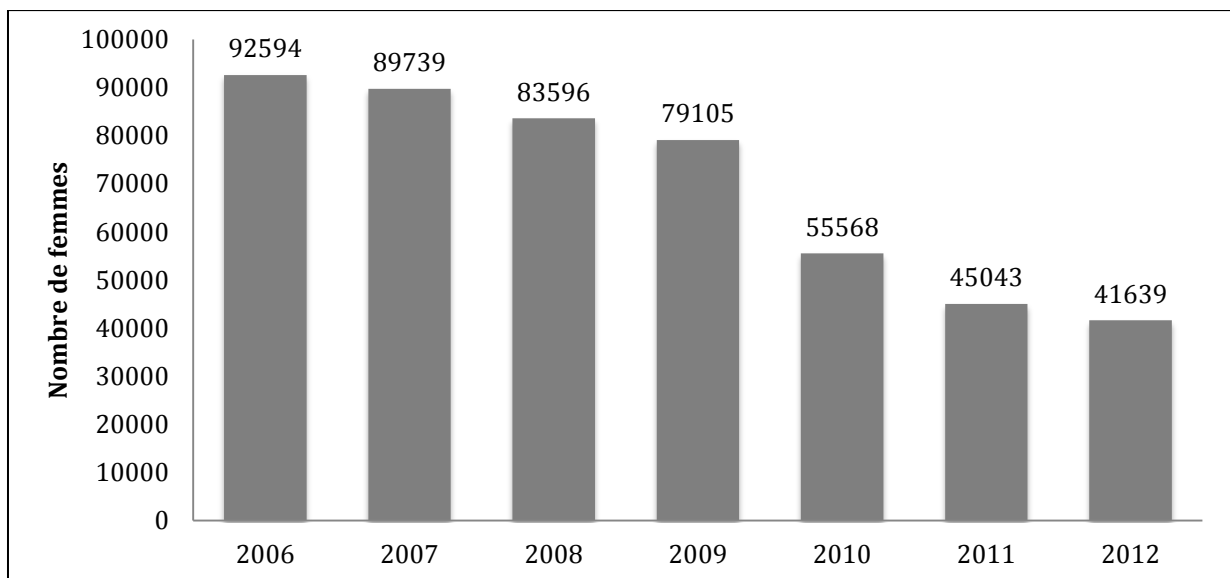


Figure 1. Evolution du nombre de femmes ayant fait un prélèvement pour caryotype fœtal.

Agence de biomédecine (France). Bilan 2013

En fonction du résultat du DPN, une interruption médicale de grossesse (IMG) peut être proposée à la femme. Le recours à l'IMG est lié au type d'anomalie, à sa gravité et aux signes échographiques associés. Environ 80% des diagnostics de trisomie 21 sont suivis d'une interruption de grossesse.

Depuis quelques années, on note également une augmentation des dépistages d'anomalies chromosomiques par des techniques de génétique moléculaire, comme la PCR quantitative ou la « Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification » (MLPA). 5100 fœtus ont bénéficié de ces techniques en 2012, et ce chiffre est en constante augmentation.

1.3 – Biologie moléculaire

Au cours de l'année 2012, 2829 examens ont été réalisés pour une analyse génétique. On recherche chez le fœtus la présence d'une ou deux mutations préalablement identifiées chez les parents ou un cas index. Dans 1/3 des cas, le diagnostic prénatal est effectué suite à la découverte de signes d'appel échographiques. Les modalités de prélèvement sont les mêmes que pour la cytogénétique. La ponction de villosités choriales est cependant préférée du fait de sa précocité (11 SA). La résolution est plus faible que pour le DPN chromosomique puisqu'on peut détecter la mutation d'une seule base (mutation ponctuelle). Plus de 250 pathologies génétiques font l'objet d'un DPN moléculaire. En 2012, ce DPN a permis de détecter 513 cas de fœtus atteints de maladie génétique. Une IMG a été réalisée dans 387 cas.

La mucoviscidose (maladie autosomique récessive) est la pathologie qui fait l'objet du plus grand nombre de DPN, avec 517 DPN en 2012. Les autres maladies génétiques faisant le plus souvent l'objet de DPN sont les disomies uni-parentales (301 DPN), l'achondroplasie (maladie autosomique dominante, 187 DPN), la drépanocytose majeure (maladie autosomique récessive, 213 DPN) ou l'amyotrophie spinale (maladie autosomique récessive, 154 DPN).

1.4 – Diagnostic pré natal non invasif (DPNNI)

A l'heure actuelle, la seule technique utilisée en routine est l'analyse de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel. Comme nous le verrons par la suite, le DPNNI est une technique récente. L'Agence de Bio Médecine française préconise son recours pour deux indications qui seront développées dans la suite de cette thèse : la détermination du sexe fœtal dans certaines conditions et la détermination du phénotype rhésus fœtal.

Le nombre de détermination du sexe fœtal a augmenté régulièrement entre 2006 et 2010 avant de former un plateau (Figure 2), à environ 650 déterminations annuelles. Cependant, l'entrée de cet examen à la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) en 2011 et la démocratisation de cette technique vont probablement entraîner l'augmentation du nombre de diagnostic en 2013 et 2014.

La détermination du rhésus fœtal n'est toujours pas inscrit à la NABM en 2014 malgré les préconisations d'un rapport d'experts de la Haute Autorité de Santé (HAS). Ceci explique la stabilité de réalisation de cet examen depuis 2011 (Figure 2).



Figure 2. Evolution du nombre de femmes ayant bénéficié d'un DPNNI pour les indications : détermination du rhésus fœtal (tableau gauche) et détermination sexe fœtal (tableau droit).

Agence de biomédecine (France). Bilan 2013

1.5 – Le DPN aux Hospices Civils de Lyon

Les Hospices Civils de Lyon (HCL) ont une forte activité de diagnostic prénatal. Ils regroupent en effet trois centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal. Le laboratoire de biologie multi-sites (LBMMS) des HCL compte de nombreuses équipes agréées impliquées dans le DPN. De plus, très prochainement, une unité de biochimie foeto-maternelle sera créée au Centre de Biologie et de Pathologie Est (CBPE). Le CBPE regroupera alors les activités de

biologie fœto-maternelle et permettra une interaction privilégiée entre tous les acteurs biologiques et génétiques du DPN.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire des pathologies de l'hémoglobine, sur la plateforme de génétique de l'hôpital Edouard Herriot de Lyon. En 2013, le LBMMS a lancé une étude pluri-disciplinaire intitulée « Diagnostic prénatal non invasif à partir de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel: étude de faisabilité et de mise au point technique autour de 4 projets au CHU de Lyon », sous la direction du Professeur Damien Sanlaville. L'objectif était de mettre au point différentes techniques de DPNNI afin de proposer aux patientes prises en charge aux HCL un diagnostic prénatal génétique fiable et sans risque pour le fœtus. Quatre projets ont été développés par quatre équipes agréées par l'Agence de la Biomédecine pour les actes de biologie moléculaire (et/ou biologie moléculaire appliquée à la cytogénétique) et pour le Diagnostic Prénatal:

- Le diagnostic de sexe fœtal par le Dr Philippe Joly (Unité des Pathologies Moléculaires de l'hémoglobine), qui fait l'objet de ce travail de thèse.
- Le diagnostic du déficit en 21-hydroxylase, maladie autosomique récessive par le Pr Yves Morel et le Dr Véronique Tardy (Laboratoire Endocrinologie et Maladies Rares);
- Le diagnostic de la trisomie 21, par le Pr Damien Sanlaville et le Dr Caroline Schluth-Bolard (Laboratoire de Cytogénétique Constitutionnelle);
- Le diagnostic de comptabilité fœto-maternelle dans les groupes plaquettaires (HPA) par le Pr Christine Vinciguerra et le Dr Mathilde Frétny (Laboratoire d'Hématologie biologique, centre de référence des pathologies plaquettaires, Pr. Claude Négrier).

Les quatre équipes ont toutes une solide expérience du DPN « conventionnel ». Le laboratoire de Cytogénétique Constitutionnelle réalise environ 1200 caryotypes fœtaux par an; l'Unité des Pathologies Moléculaires de l'hémoglobine réalise 10 à 14 DPN par an dans le cadre de la drépanocytose et de la bêta-thalassémie majeure; le Laboratoire d'Endocrinologie

Moléculaire et Maladies Rares réalise une trentaine de DPN par an pour le seul déficit en 21-hydroxylase et le laboratoire d'Hémostase biologique réalise environ 10 DPN par an dans le cadre des pathologies de l'hémostase (hémophilies, maladie de Glanzmann, allo-immunisation fœto-maternelle ...). Les quatre équipes travaillent en collaboration depuis de nombreuses années, notamment le Laboratoire de Cytogénétique Constitutionnelle et le Laboratoire Endocrinologie et Maladies Rares réunis au CBPE des HCL depuis 2007. Le Laboratoire des Pathologies de l'Hémoglobine et celui d'Hémostase doivent les rejoindre prochainement.

2 – La révolution du Diagnostic Pré Natal Non Invasif

2.1 – Contexte et histoire

Le risque principal associé à la réalisation d'un DPN génétique reste la survenue d'une fausse-couche iatrogène liée au prélèvement invasif. Par exemple, en France, 45.043 caryotypes fœtaux ont été réalisés en 2011, ce qui représente, pour un risque maximum de 1% environ, 450 pertes fœtales iatrogènes théoriques. Afin d'éviter ces pertes fœtales iatrogènes, de nombreuses équipes se sont engagées dans le développement de méthodes de diagnostic prénatal non invasif (DPNNI). En effet, en isolant du matériel génétique fœtal directement dans le sang maternel, on s'affranchit du risque de perte fœtale iatrogène ; une prise de sang suffit au diagnostic. Les équipes de recherche travaillant sur la découverte du DPNNI se sont d'abord intéressées aux cellules fœtales circulantes avant la découverte de l'ADN fœtal libre circulant.

Dès 1893, Schmorl fut le premier à suggérer un possible passage de cellules fœtales, en mettant en évidence des cellules multinucléées d'origine placentaire dans les vaisseaux maternels (2). D'autres auteurs ont confirmé cette hypothèse, notamment par la mise en évidence de cellules trophoblastiques dans les vaisseaux pulmonaires de femmes décédées d'éclampsie (3). En 1969, une équipe américaine de l'université de Californie identifie dans le

sang de 19 femmes enceintes la présence d'un chromosome Y, isolé à partir de cellules fœtales lymphoïdes circulantes mises en culture (4). En plus de cette approche cytogénétique, d'autres techniques ont été développées pour isoler, identifier et compter ces cellules fœtales : la coloration à la quinacrine (5), la culture (6) ou encore la cytométrie de flux (7). Dans cette dernière, Herzenberg et al. ont sélectionné des lymphocytes fœtaux grâce à l'antigène HLA-A2 présent chez le père et absent chez la mère.

Différents types cellulaires ont été retrouvés dans le sang maternel, comme des cellules trophoblastiques, leucocytaires ou des érythrocytes (8,9). Cependant, le nombre de cellules fœtales présentes chez la mère (estimé à une cellule fœtale pour 10^5 à 10^8 cellules maternelles, soit une à deux cellules par mL de sang maternel) est très faible. De plus, l'absence de marqueurs de surface spécifiques de ces cellules fœtales et leur possible persistance après la grossesse (10,11) font que cette technique n'a jamais trouvé sa place en pratique clinique, du fait d'un manque de spécificité et de reproductibilité (12).

2.2 – L'ADN fœtal libre circulant

2.2.1 – Découverte

En 1996, le chercheur Dennis Lo travaille sur la présence des cellules fœtales circulantes dans le sang maternel. Conscient du potentiel de la mise au point de techniques de DPNNI, il se heurte à la faible concentration des cellules fœtales et à leur persistance imprévisible lors de grossesses antérieures (12). En 1997, par analogie avec la libération plasmatique d'ADN par les tumeurs, Dennis Lo et son équipe découvrent la présence d'ADN plasmatique foetal libre (*cffDNA : cell-free circulating fetal DNA*) chez la femme enceinte (13). En effet, leur recherche montre grâce à une Polymerase Chain Reaction (PCR) dans le plasma maternel la présence d'une séquence de 198 paires de bases (pb) spécifique du chromosome Y (gène *DYS14*).

Si l'impact de la découverte sur les pratiques de diagnostic pré natal est fondamental, la nature biologique exacte de cet ADN foetal plasmatique fait l'objet de recherches, encore à l'heure actuelle. De récents travaux ont prouvé que l'intégralité du génome foetal était présent sous forme d'ADN circulant dans le plasma maternel (14).

2.2.2 – Cinétique

L'ADN plasmatique foetal apparaît rapidement au début de la grossesse. La détection la plus précoce a été faite 18 jours après une procréation médicalement assistée (15). L'ADN plasmatique foetal représente une petite fraction de l'ADN plasmatique maternel total, et augmente tout au long de la grossesse. Il passe de 3,4% (0,39% à 11,9%) de l'ADN plasmatique maternel total au 1^{er} trimestre à 6,2% (2,33% à 11,4%) au 3^{ème} trimestre (16). La fraction d'ADN foetal d'une femme à une autre semble varier en fonction de différents paramètres, et notamment le poids maternel (17).

A la fin de la grossesse, l'ADN plasmatique foetal disparaît rapidement et totalement. Certains auteurs en ont retrouvé la présence dans l'urine, ce qui suggère une élimination rénale (15). En 1999, Lo et al ont estimé la demi-vie d'élimination à 16 minutes (4-30 min). Sur 8 femmes étudiées, 7 n'avaient plus d'ADN foetal circulant 2h après l'accouchement (18).

Cette élimination rapide est un avantage pour le DPNNI. Comme il n'y a pas de persistance de l'ADN foetal, le DPN peut être répété à chaque grossesse. Dans la littérature on retrouve 1 cas de persistance, liée probablement à la présence de cellules fœtales quiescentes (19). Cependant, ces données sont aujourd'hui contestées car le protocole de centrifugation était non optimal (15,20). Ainsi, une centrifugation du sang maternel correcte semble être suffisante pour s'affranchir des cellules quiescentes.

De nombreux auteurs ont cherché à confirmer l'existence de cellules fœtales quiescentes sur un nombre important de femmes enceintes de fœtus féminin ayant eu une grossesse antérieure d'un fœtus masculin. Dans 4 études, 131 femmes qui avaient

antérieurement donné naissance à des garçons ont été testées (21–24). Toutes se sont révélées être négatives au test SRY. On peut donc considérer que dans l'état de l'art et des connaissances il n'y a pas de persistance de l'ADN fœtal après une grossesse (15,25).

2.2.3 – Taille

L'ADN plasmatique est très fragmenté. La PCR initiale de Dennis Lo avait mis en évidence une séquence de 198 pb. La taille exacte des fragments d'ADN plasmatique maternels et fœtaux a été déterminée en 2004, suite aux travaux de Chan et al (26,27) Grâce à une PCR en temps réel ciblée sur le gène SRY (présent chez le fœtus de sexe masculin et absent dans le génome maternel), ils ont montré que 80% des fragments d'ADN plasmatique fœtal ne dépassaient pas 200pb. Aucun fragment ne faisait plus de 313pb. De plus, les auteurs ont mis en évidence le fait que l'ADN libre fœtal était significativement plus court que l'ADN libre maternel. Cette propriété a été confirmée en 2010 grâce au séquençage haut débit (14,28).

Il est aujourd'hui admis que par rapport à l'ADN plasmatique maternel, l'ADN plasmatique fœtal présente une proportion moins importante de fragments de 166 pb et une fraction plus importante de fragments de moins de 150 pb (Figure 3).

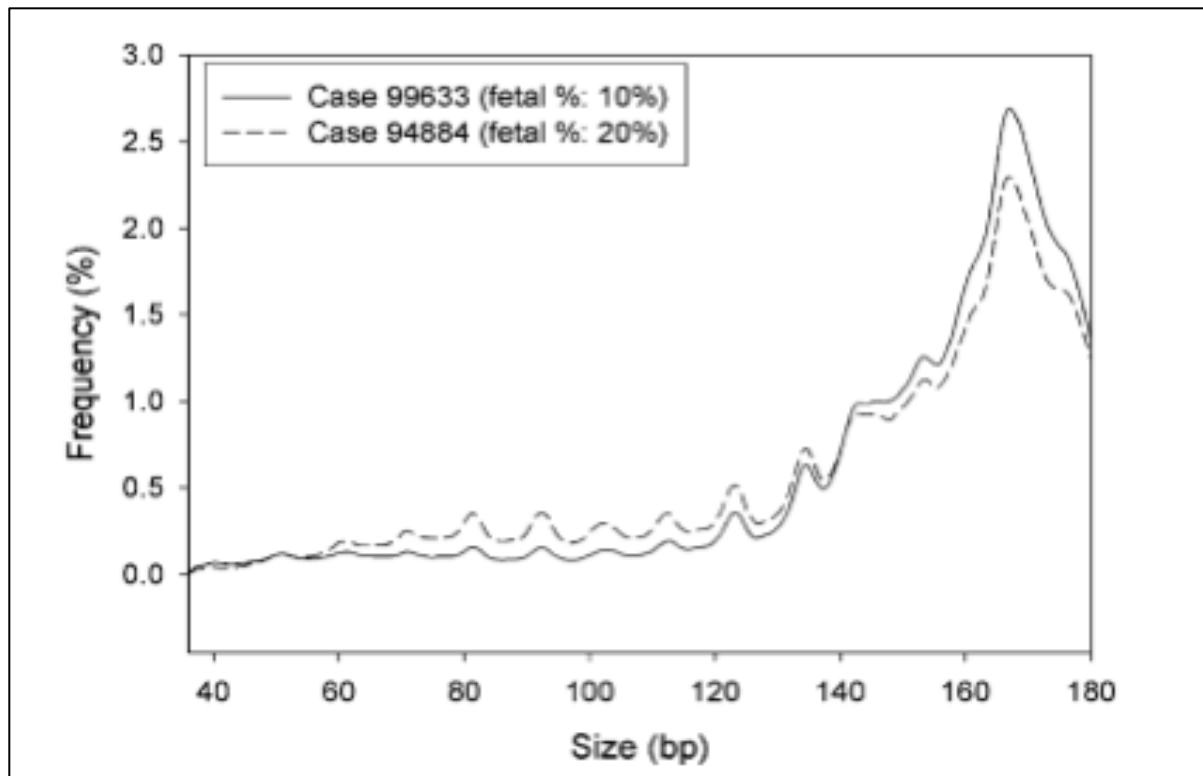


Figure 3 – Etude de la taille de l’ADN circulant dans deux plasmas de femmes enceintes. Le trait plein représente un plasma pauvre en ADN foetal et le trait pointillé un plasma plus riche.

D’après Yu S. C. Y. *et al.*, 2014 (29)

Récemment, l’équipe de Dennis Lo a utilisé cette propriété pour estimer la fraction d’ADN plasmatique foetal dans l’ADN plasmatique maternel (29). La différence de taille peut permettre de sélectionner l’ADN plasmatique foetal afin d’enrichir le prélèvement. Comme nous le verrons plus loin, les auteurs ont également réussi à diagnostiquer des aneuploïdies fœtales grâce aux différences de répartition de taille de l’ADN plasmatique foetal .

2.2.4 – Origine

2.2.4.1 – ADN plasmatique total

L’origine de l’ADN libre plasmatique est incertaine. Tout être humain possède de l’ADN plasmatique. Dans certaines situations, physiologiques ou pathologiques, on observe une augmentation de sa concentration. On a retrouvé de l’ADN tumoral dans le plasma de

patients cancéreux. On a également retrouvé de l'ADN du donneur dans le plasma de patients greffés du foie ou du rein. Lui *et al* se sont intéressés à l'origine de cet ADN circulant (30). L'ADN plasmatique de patients greffés de moelle d'un donneur de sexe différent (par exemple, un receveur homme reçoit une greffe de moelle d'une donneuse femme et inversement) a été étudié. Les auteurs se sont aperçus qu'environ 60% de l'ADN plasmatique du receveur était modifié après la greffe, ce qui suggère que l'ADN libre plasmatique provient majoritairement de la moelle osseuse. Cependant, en extrapolant l'expérience avec des greffes d'organes solides (rein, foie), les auteurs se sont rendus compte que ces organes participaient faiblement à la production d'ADN libre plasmatique (31).

En élargissant l'hypothèse de Lui *et al* à la femme enceinte, on peut donc suggérer que l'ADN libre maternel de la femme enceinte provient majoritairement de la moelle osseuse maternelle.

2.2.4.2 – ADN plasmatique foetal

En découvrant l'ADN plasmatique foetal en 1997, Lo et son équipe ne connaissaient pas son origine. Cependant, ils ont émis l'hypothèse qu'il proviendrait d'une lyse cellulaire et de l'apoptose de certains tissus fœtaux (13). Le faible nombre de cellules fœtales circulantes (1 à 2 par mL de sang maternel) ne permet pas d'expliquer la quantité relativement importante d'ADN plasmatique foetal.

A l'heure actuelle, l'origine majoritairement placentaire de l'ADN plasmatique foetal ne semble plus faire de doute. En effet, la présence d'ADN foetal circulant est détectée après l'apparition du placenta mais avant la mise en place du système circulatoire foetal. De plus, dans le cas d'un mosaïcisme placentaire confiné (le caryotype placentaire n'est pas le même que le caryotype foetal), il a été montré que l'ADN plasmatique foetal circulant chez la mère portait les anomalies du placenta. Certains auteurs ont travaillé sur les différences épigénétiques entre le placenta et le sang maternel, dans la perspective de trouver un

marqueur d'ADN fœtal. Les résultats montrent que l'ADN fœtal circulant porte les caractéristiques génétiques du placenta (15). Enfin, la présence d'ADN fœtal circulant dans le cadre de grossesses anembryonnaires (sac amniotique vide) confirme une origine trophoblastique (32). L'ADN fœtal serait ainsi libéré lors de phénomènes d'apoptose et de nécrose de cellules placentaires, ce qui fait partie du turn over cellulaire normal. Dans certaines situations pathologiques, comme les pré-éclampsies, le turn over cellulaire est augmenté. On observe dans ce cas là une augmentation de l'ADN fœtal circulant (15), ce qui est encore une fois en faveur de son origine placentaire.

Si certains auteurs ont aussi évoqué une possible destruction des cellules trophoblastiques par les cellules épithéliales pulmonaires maternelles, ce phénomène n'a pas pu être mis en évidence à l'heure actuelle.

2.2.5 – Applications cliniques

L'ADN fœtal circulant permet donc d'obtenir des informations génétiques sur le fœtus sans avoir recours à un acte invasif. On peut séparer l'utilisation de ce matériel génétique en deux catégories : la détection d'anomalies qualitatives de l'ADN fœtal circulant et d'anomalies quantitatives.

2.2.5.1 – Anomalies qualitatives

Les premières applications du DPN non invasif ont reposé sur la détection par des techniques de PCR de séquences normalement absentes du génome maternel. La détection se fait à l'échelle chromosomique (chromosome Y absent ou présent) ou génétique (mutation, délétion etc.).

2.2.5.1.1 – Détermination du sexe foetal

A l'échelle chromosomique, la détermination du sexe fœtal ou « test SRY » (détection de séquences issues du chromosome Y) fait l'objet de notre travail et sera développée plus en

détail dans un prochain paragraphe. Il s'agit de la première technique de DPNNI disponible en routine dans les laboratoires.

2.2.5.1.2 – Prévention de l'allo-immunisation fœto maternelle

A l'échelle du gène, la prévention de l'allo-immunisation fœto maternelle est sûrement l'application la plus importante du DPNNI. Elle représente 6916 diagnostics en 2012. L'allo-immunisation fœto maternelle correspond à la production d'anticorps maternels dirigés contre le fœtus. Ces anticorps sont dirigés contre des éléments figurés du sang fœtal : hématies et plaquettes. La production est entraînée, hors transfusion, par le passage de sang fœtal dans la circulation maternelle lors de différentes situations à risque. Au cours de grossesses suivantes, l'allo-immunisation peut être à l'origine de cytolyse fœtale, comme la maladie hémolytique du nouveau né. Il existe un traitement, pendant la grossesse, qui permet d'empêcher l'allo-immunisation fœto maternelle. L'objectif du diagnostic prénatal est de définir le statut du fœtus dans les couples où il existe une possibilité d'incompatibilité entre la mère et le fœtus.

Le système rhésus est à l'origine de la majorité des allo-immunisations fœto maternelles. On assiste à la production d'anticorps anti RH1 (anti D) qui se développent chez des femmes RH : -1 (D négatif) lorsque le fœtus est RH :1 (D positif). L'analyse de l'ADN fœtal circulant permet d'obtenir, dans les grossesses à risque, le génotype RHD fœtal et donc de prévenir, par des immunoglobulines anti RH1 (anti D) injectées à la mère, l'allo-immunisation fœto maternelle. Le test peut être effectué à la 28^{ème} semaine d'aménorrhée, avant la première injection d'immunoglobuline anti D, ou bien précocement pour prévoir le suivi tout au long de la grossesse (33).

En pratique quotidienne l'utilisation de ce test est encore limitée en France, bien que sa sensibilité soit proche de 100% (15). Il n'est pas encore remboursé par la sécurité sociale.

Dans le cadre du développement du DPNNI au sein des Hospices Civils de Lyon, le diagnostic pré natal non invasif de l'allo-immunisation fœto-maternelle dans les groupes

plaquettaires a été initié en parallèle de ce travail par le Professeur Christine Vinciguerra et le Docteur Mathile Fretigny. Il s'agit de l'équivalent de la maladie hémolytique du nouveau-né, mais qui concerne les groupes antigéniques présents sur les plaquettes sanguines (HPA= Human Platelet Antigen) (34). L'allo-immunisation de la femme enceinte entraîne une thrombopénie sévère chez le fœtus, pouvant entraîner des hémorragies graves, notamment au niveau cérébral. L'objectif du diagnostic pré natal est la détermination d'un groupe plaquettaire fœtal pour permettre de mettre en évidence sur l'ADN fœtal circulant l'allèle paternel incompatible. On peut alors prévenir l'allo immunisation de la mère par l'injection d'immunoglobulines polyvalentes pendant la grossesse.

2.2.5.1.3 – Diagnostic d'une mutation génétique

La détermination du sexe fœtal et le génotypage rhésus sont des techniques relativement faciles à mettre en place car on détecte des séquences d'ADN absentes du génome maternel. Cependant, le DPNNI de maladies autosomiques récessives présente un défi plus difficile à réaliser. En effet, les anomalies portent généralement sur un faible nombre de paires de bases, voire sur une seule paire (mutation ponctuelle). Les premières mises au point ont donc logiquement été faites sur des anomalies de plusieurs paires de bases, comme des polymorphismes de microsatellites, des anomalies de répétitions de trois nucléotides (comme dans la dystrophie myotonique) ou des délétions de plusieurs paires de bases (15,33,35). De récents développements dans la spectrométrie de masse ont permis de séparer l'ADN circulant fœtal et maternel pour des différences d'une seule paire de bases. Grâce à cette technique, Ding et al. ont réussi à faire le DPNNI de β -thalassémie par mutation ponctuelle (36).

De plus, lorsque la mère est porteuse de la mutation dans une maladie à transmission autosomique récessive, il est particulièrement difficile de déterminer si le fœtus a hérité de l'allèle maternel sain ou muté. Afin de différencier l'allèle maternel de l'allèle fœtal, le

principe est de mettre en évidence dans l'ADN plasmatique total une sur-représentation de l'allèle muté par rapport à l'allèle sauvage. En effet, dans le cas où la mère hétérozygote pour une mutation transmet l'allèle muté, le fœtus homozygote libère de l'ADN circulant uniquement porteur de la mutation. Dans le plasma maternel, le rapport allèle muté/allèle sain est alors modifié. Si le fœtus est hétérozygote, le rapport est inchangé. De cette façon, des équipes ont réussi à développer des DPPNI sur la bêta thalassémie, la drépanocytose ou l'hémophilie, grâce à des techniques de digital PCR (33). Une autre approche utilisant les techniques de séquençage haut débit est actuellement en développement et a montré son utilité pour le diagnostic de la bêta thalassémie ou l'hyperplasie congénitale des surrénales (17).

2.2.5.2 – Anomalies quantitatives

2.2.5.2.1 – Détermination des aneuploïdies – cas de la Trisomie 21

Le diagnostic prénatal non invasif de la trisomie 21 a été longtemps difficile du fait que le fœtus possède un chromosome 21 en commun avec sa mère et qu'en cas de trisomie 21, le chromosome 21 surnuméraire est d'origine maternelle dans 90% des cas.

Récemment, les technologies de séquençage haut-débit, permettant de séquencer des millions de fragments d'ADN en parallèle, ont permis de mettre au point le DPN non-invasif de la trisomie 21 par comptage relatif. Les fragments d'ADN plasmatiques sont ainsi séquencés. Une analyse bio-informatique permet ensuite de déterminer à quel chromosome chaque fragment correspond et calcule le pourcentage de séquences provenant du chromosome 21. L'hypothèse est que la présence d'un fœtus porteur d'une trisomie 21 se manifestera par un excès de séquences d'ADN issues du chromosome 21 par rapport aux autres chromosomes.

Les premières études ont montré la preuve de concept de cette technologie sur un nombre limité de patientes à haut risque de trisomie 21 (marqueurs sériques, âge maternel,

signe d'appel échographique) (37–39). Puis des études sur de plus larges cohortes de femmes à haut-risque de trisomie 21 ont permis de montrer une sensibilité (98,6% –100%) et une spécificité (97,9% – 99,8%) excellentes (39–41). La détermination des trisomies 18 et 13 est également réalisée avec la même précision.

Actuellement, le test est proposé par 8 laboratoires dans le monde. En France, même s'il a reçu un avis favorable du collège national des gynécologues et obstétriciens français en janvier 2013 et du Comité consultatif national d'éthique en avril 2013, le test n'est pas encore porté à la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM). Son coût est d'environ 800 euros. Si le prélèvement est fait en France et proposé aux patientes, l'analyse technique est réalisée à l'étranger, notamment aux Etats-Unis. La mise au point sur le territoire français, et au sein des CHU en particulier, est en cours. L'équipe du Professeur Damien Sanlaville a travaillé sur la mise au point technique de cette détermination en parallèle de ce travail.

Le test non invasif de dépistage de la trisomie 21 fœtale n'est pas amené à remplacer le test combiné avec le dosage des marqueurs sériques et la mesure échographique de la clarté nucale (Figure 4).

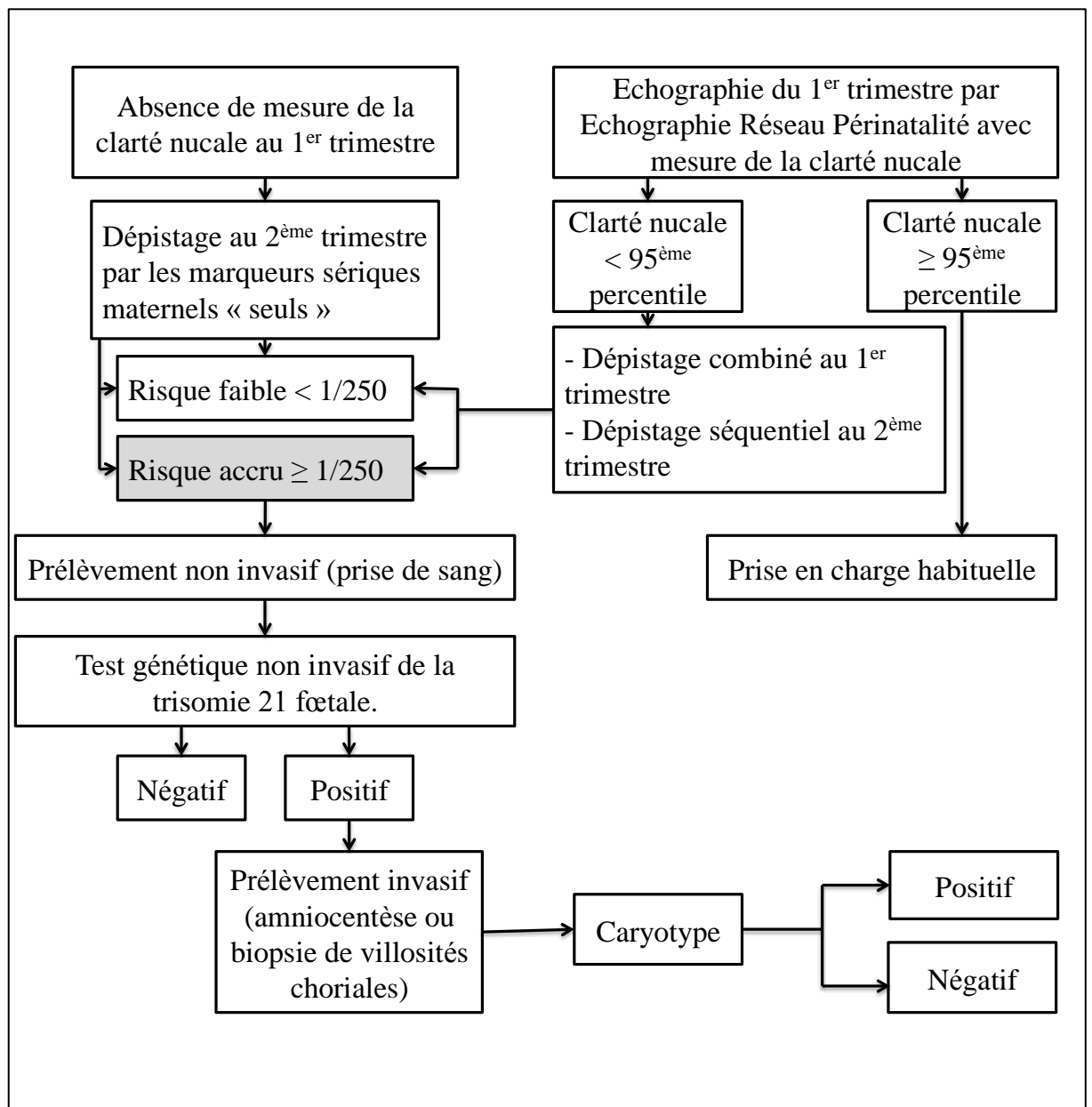


Figure 4 – Stratégie de diagnostic de la trisomie 21

D'après le laboratoire Cerba, « Test génétique non invasif de la trisomie 21 fœtale, informations destinées aux professionnels de santé ». Disponible sur www.lab-cerba.com

2.2.5.2.2 – Autres anomalies quantitatives

Suite au constat que la quantité d'ADN fœtal plasmatique augmentait dans les grossesses pathologiques, certaines équipes ont expérimenté l'idée que l'on puisse diagnostiquer la pré-éclampsie ou la rupture prématurée des membranes par une mesure quantitative de l'ADN libre fœtal (15,42). Cependant, l'absence de marqueur spécifique

d'ADN fœtal ne permet pas d'assurer une totale spécificité de ces techniques. De plus, de récentes études ont montré qu'il existait un chevauchement entre la quantité d'ADN fœtal dans les grossesses normales et les grossesses pathologiques, ce qui réduit fortement les perspectives de ces techniques de screening (15).

De récents développements de techniques sur l'ARN libre circulant offrent de nouvelles opportunités de découverte de marqueurs fœtaux. En effet, l'ARN messenger fœtal libre semble particulièrement stable. De récents développements dans la pré-éclampsie ou les tumeurs trophoblastiques gravidiques semblent donner des résultats encourageants (15).

3 – Détermination du sexe fœtal dans le sang maternel

3.1 – Principe général du test SRY

Comme nous l'avons vu précédemment, la détermination du sexe fœtal dans le sang maternel, ou « test SRY », est le premier DPNNI à avoir été utilisé en routine. En 2009, des experts de la Haute Autorité de Santé (HAS), à la demande du Collège national des enseignants et praticiens de Génétique Médicale, ont rendu un rapport d'évaluation sur la technique de dépistage du sexe fœtal sur le sang maternel. De part leurs activités en diagnostic prénatal, les Drs. Véronique TARDY et Laurence MICHEL du Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies Rares des HCL ont fait partie du groupe d'experts, respectivement pour les Hyperplasies Congénitales des Surrénales (HCS) et les Maladies liées à l'X. Les conclusions de ce rapport peuvent être classées en deux grands items: le premier relatif aux applications médicales pertinentes et éthiquement acceptables de ce test et le second relatif aux conditions techniques optimales de réalisation.

Ceci a permis d'inscrire en octobre 2010 la détermination du sexe fœtal sur sérum maternel à la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM) dans deux indications :

« *fœtus à risque pour une maladie génétique liée à l’X* » et « *fœtus à risque pour l’hyperplasie congénitale des surrénales* ».

Ces tests font actuellement partie intégrante des pratiques de DPN en France. En 2012, 609 dépistages ont eu lieu. Dans les autres pays d’Europe, le test SRY est aussi utilisé en routine clinique par les Pays-Bas, le Royaume-Unis et l’Espagne (43).

Le test repose sur l’extraction et l’amplification, à partir du plasma ou du sérum maternel, des acides nucléiques fœtaux libres (ADN libre) en ciblant des séquences spécifiques du chromosome Y(44). Une amplification PCR positive (présence de ces séquences) permettra de dire que le fœtus est de sexe masculin; à l’inverse, l’absence d’amplification fera conclure à un fœtus de sexe féminin. Le principal risque de ce type de test est celui de faux-négatif puisque l’ADN plasmatique fœtal est très minoritaire par rapport à celui de la mère (3,4 à 6,2% de l’ADN total circulant selon le stade de la grossesse)(16). Deux méta-analyses récentes (43,45) ont montré que la sensibilité et la spécificité du test pouvaient être proches de 100% à partir de la 7^{ème} SA tandis que le sexe échographique ne peut être déterminé de façon fiable avant au moins 13 SA (46–48). L’étude récente de Tardy *et al.* sur une cohorte française de 258 femmes enceintes entre 2002 et 2011 préconise l’utilisation du test SRY après 6,5 SA (49).

3.2 – Applications médicales du diagnostic de sexe fœtal sur plasma maternel

3.2.1 – Maladies récessives liées à l’X

Environ 400 maladies liées au chromosome X sont répertoriées. Elles présentent une morbidité et une mortalité variable. Certaines ont un pronostic très sévère comme la Dystrophie Musculaire de Duchenne, l’hémophilie sévère, l’adrénoleucodystrophie, le syndrome d’Alport, ou certains déficits intellectuels liés à l’X.

Contrairement aux maladies génétiques autosomiques, le Diagnostic Pré-Natal (DPN) des maladies récessives liées à l’X nécessite une connaissance précoce (1^{er} trimestre

idéalement) du sexe fœtal (Figure 5). En effet, un fœtus féminin sera 'au pire' porteur sain de la maladie et le risque de fausse-couche lié au DPN par biopsie de trophoblaste ou amniocentèse (0,5 à 1,0%) sera supérieure au bénéfice clinique retiré. En d'autres termes, le diagnostic de sexe fœtal sur sang maternel permet de réduire de 50 % les procédures invasives de DPN dans les maladies liées au chromosome X.

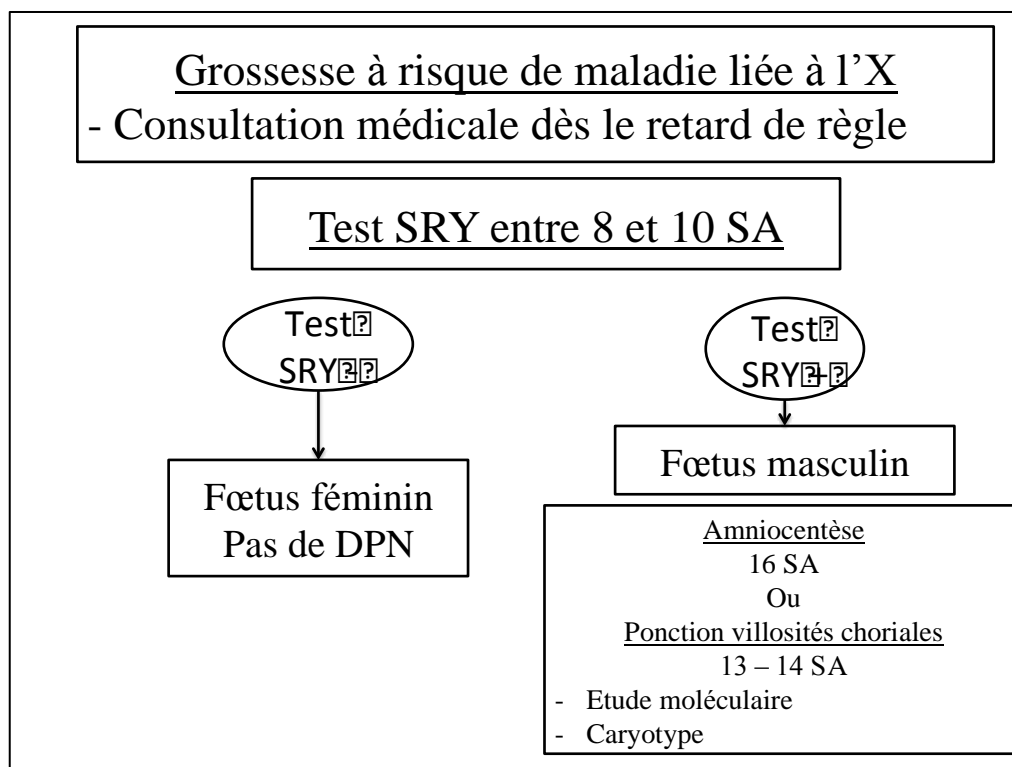


Figure 5 – Utilité du test SRY dans la prise en charge du DPN des maladies liées à l’X

3.2.2 – Hyperplasie congénitale des surrénales (HCS)

Il s’agit d’une maladie génétique autosomique due à un déficit de la stéroïdogénèse surrénalienne: dans 95% des cas il s’agit d’un déficit en 21-hydroxylase (gène *CYP21A2*) et plus rarement d’un déficit en 11-hydroxylase (50). La conséquence de ce déficit est une production excessive d’androgènes pendant la vie fœtale. Le développement des organes génitaux masculins n’est pas affecté par cet excès d’androgènes mais cette exposition précoce

à des taux élevés d'androgènes virilise à des degrés variables les organes génitaux externes des fœtus de sexe féminin. Pour prévenir cette virilisation, un traitement par glucocorticoïdes (DEX) a été proposé dès 1984 par les pédiatres lyonnais et adopté internationalement. Pour être efficace, ce traitement doit être débuté avant la date présumée de réceptivité du bourgeon génital à l'action des androgènes, soit avant 9 SA (51,52) et poursuivi jusqu'à la naissance.

La transmission de l'HCS étant de type autosomique récessif, un couple à risque (deux parents hétérozygotes) aura à chaque grossesse 1 risque sur 4 d'avoir un enfant atteint et donc 1 risque sur 8 que ce soit une fille atteinte. Ceci signifie que le traitement glucocorticoïde en systématique est inutile dans 7 cas sur 8. La description par des équipes suédoises d'effets sur la mémoire de travail verbale chez les enfants exposés à la DEX (53) et la crainte d'effets secondaires à long terme ont conduit la Suède ou les Etats-Unis à arrêter l'usage de la DEX dans cette indication. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux outils pour en limiter la prescription au strict nécessaire (fœtus féminin et atteint). La validation de la détermination du sexe fœtal sur sérum maternel par les Laboratoires Cerba dès 2001 (21) a ouvert la possibilité de ne plus traiter les garçons à condition de valider ce test plus tôt dans la grossesse. Ceci a été possible grâce au protocole proposé en 2002 par le Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire en charge du DPN à Lyon et les Laboratoires Cerba (49,54).

En pratique, dans les grossesses à risque d'HCS, un diagnostic de sexe sur plasma est classiquement effectué à partir de 7 SA (43). Si le test SRY est négatif (foetus féminin), un traitement glucocorticoïde par DEX est proposé, après consentement éclairé, aux femmes enceintes, vu les bénéfices sur les organes génitaux externes et le manque de preuves quant aux risques. Un contrôle vers 10 SA est recommandé par le Laboratoire Cerba pour éviter les éventuels faux-négatifs. Un protocole de prise en charge des grossesses à risque est donc en place en France depuis 2002 (Figure 6).

Ce protocole a été validé en 2014 en France sur une cohorte française de 258 grossesses à risque recrutées entre 2002 et 2011 (55). Ainsi, la combinaison du test SRY avec le traitement par la DEX, en plus du DPN invasif conventionnel permet de limiter l'usage de la DEX et la naissance d'enfants atteints d'une virilisation des organes génitaux externes (49).

Afin de limiter encore l'usage de la DEX, et notamment chez les fœtus déterminés comme féminins par le test SRY mais non atteints par la maladie, le développement d'une technique de DPNNI par recherche de l'anomalie génétique directement sur l'ADN circulant a été menée en parallèle de ce travail par l'équipe du Dr Véronique Tardy et du Pr Yves Morel. Elle repose sur l'analyse de microsatellites extra-géniques du gène *CYP21A2* et de mutations directement sur *CYP21A2*.

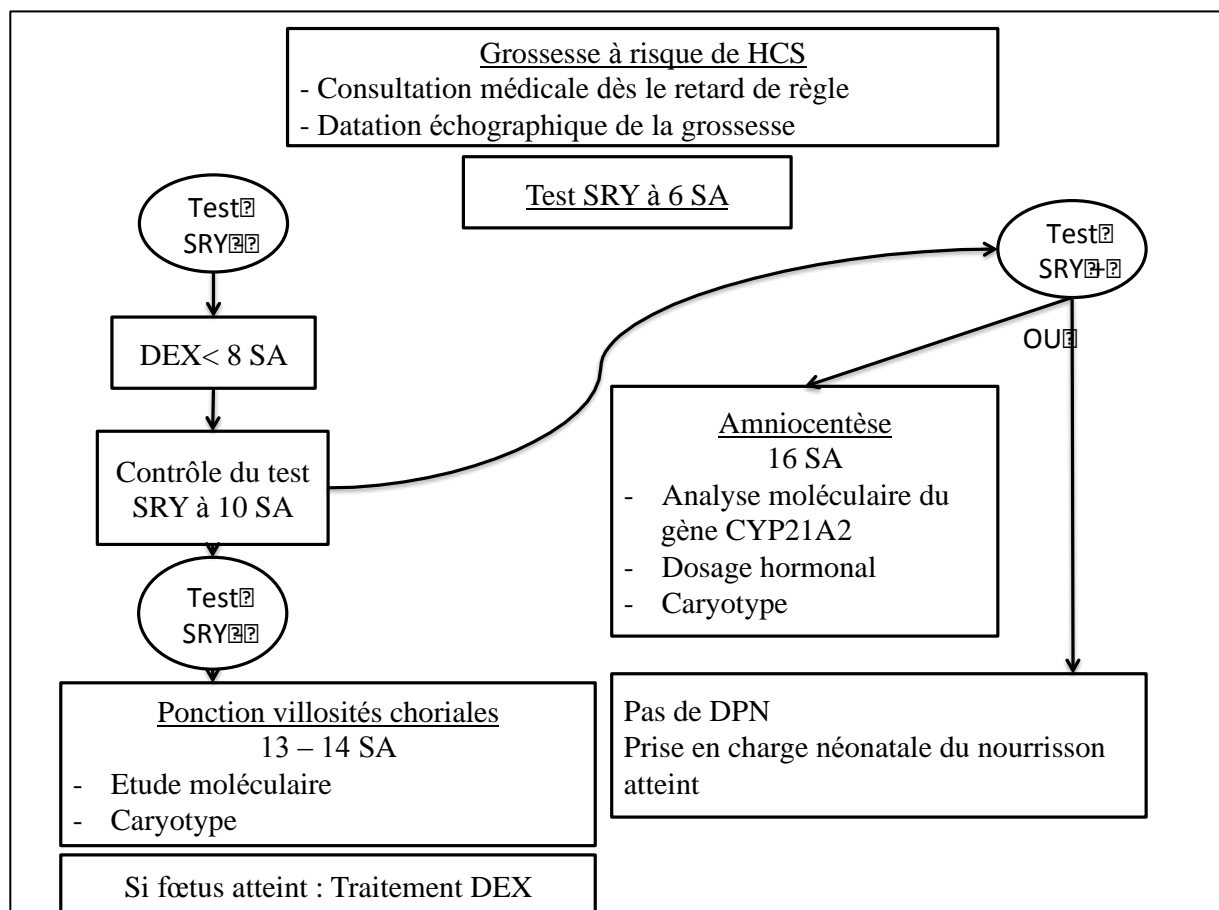


Figure 6 – Protocole de prise en charge des grossesses à risque d'HCS depuis 2002 en France
Adapté d'après Tardy-Guidollet V. et al., 2014 (55)

3.2.3 – Contraintes médicales du test SRY

Au total, dans le cadre du diagnostic des maladies liées à l’X, il faut avoir une bonne sensibilité, c’est à dire éviter les faux négatifs (déterminer comme féminin un fœtus masculin) car seuls les fœtus diagnostiqués comme masculins bénéficieront du DPN de la maladie recherchée. Dans le cadre du diagnostic de l’HCS, qui touche les organes génitaux externes du fœtus féminin, c’est la spécificité qui devra être privilégiée, car seuls les fœtus diagnostiqués comme féminins bénéficieront du traitement DEX ou d’un DPN plus poussé.

De plus, le test devra être en mesure de diagnostiquer le sexe fœtal au plus tard à 9 semaines d’aménorrhée, date à laquelle le traitement de l’HCS est administré. Une sensibilité de 100% à 6 SA permettrait de répondre aux recommandations française dans la prévention de l’HCS (Figure 6).

3.3 – Recommandations techniques du test SRY

3.3.1 – Contexte

En 2009, le rapport de la HAS rapporte les conditions optimales de réalisation du test. En 2011, une revue de la littérature menée par Devaney et al. publiée dans le JAMA fait le point sur les conclusions techniques de 57 équipes ayant développées le test SRY (43). En se basant sur ces deux publications scientifiques majeures, associée à une analyse de la littérature, nous avons documenté chacune des étapes de la réalisation du test. Cette base bibliographique nous a permis de monter le test par la suite au sein du laboratoire (chapitre matériel et méthode).

3.3.2 – Plasma ou sérum ?

L’ADN fœtal libre peut être récupéré à partir du plasma ou du sérum maternel. Dans la littérature, la majorité des équipes utilisent du plasma prélevé sur tube EDTA (23,37,40,56–65). Seule l’équipe française du Dr Costa propose des résultats sur sérum, prélevé sur tube sec

avec gel séparateur(21,44). En 2011, dans un rapport de la HAS sur la détermination prénatale du génotype RHD fœtal à partir du sang maternel, il est indiqué que « le sérum peut se conserver plus longtemps que le plasma, permettant ainsi le prélèvement dans un centre et l'extraction d'ADN dans un autre ». Il n'a pas été possible de confirmer cette affirmation dans la littérature.

Dans l'utilisation de routine proposée par les laboratoires spécialisés, le laboratoire Cerba demande le prélèvement de 3 tubes de 7 mL sur tube sec avec gel séparateur. Les autres laboratoires comme Sequenom, Ariosa diagnostics ou Verinata health proposent de commander directement un kit de prélèvement. Il n'est donc pas possible de déterminer s'il s'agit de plasma ou de sérum.

3.3.3 – Centrifugation

La centrifugation est une étape cruciale du test SRY. En effet, elle doit être suffisante pour séparer toutes les cellules du plasma ou sérum. Cependant, une centrifugation trop importante entraînera une lyse cellulaire, libérant des concentrations importantes d'ADN génomique qui viendront « polluer » l'ADN plasmatique. Cette étape est encore plus critique dans le cadre des tests quantitatifs sur l'ADN plasmatique comme la détermination de la trisomie 21. Nous avons donc réalisé une analyse poussée de nombreuses publications décrivant le test pour voir si il y avait un consensus sur la centrifugation du prélèvement. Un nombre important d'auteurs utilise une double centrifugation, d'abord à vitesse réduite pour éliminer le maximum de cellules, puis à vitesse importante. Les résultats de l'analyse bibliographique sont présentés dans le tableau 1. Les publications ayant fait l'objet de l'analyse se servent de la PCR en temps réel, ont été publiées après 2005 et ont pour finalité la détermination du sexe fœtal dans le sang maternel (SRY), le dépistage de la trisomie 21 (T21) ou la détermination du rhésus fœtal (RHD).

Il ne semble pas y avoir de consensus dans les vitesses de centrifugation, même si un nombre important d'équipes (9/21) réalisent une première centrifugation lente (1600 g pendant 10 minutes) suivie d'une ultra-centrifugation du surnageant (environ 16.000 g pendant 10 minutes).

Tableau I – Vitesse de centrifugation du sang maternel avant extraction de l'ADN plasmatique fœtal dans la littérature.

Publication	Année	Examen	1ère centrifugation	2ème centrifugation
<i>Hyett et al.(56)</i>	2005	SRY	2500 g 10 min	10000 g 10 min
<i>Birch et al.(23)</i>	2005	SRY	1600 g 10 min	16000 g 10 min
<i>Illanes et al.(66)</i>	2006	SRY	10000 g 10 min	10000 g 10 min
<i>Devalieva et al. (67)</i>	2006	SRY	2500 tpm 10 min	X
<i>Dresch Martinhago et al.(57)</i>	2006	SRY	1800 g 10 min	6000 g 10 min
<i>Deng et al.(58)</i>	2006	SRY	1600 g 10 min	16000 g 5 min
<i>Zhong et al.(59)</i>	2006	SRY	1600 g 10 min	X
<i>Liu et al.(61)</i>	2007	SRY	3000g	3000g
<i>Bustamante et al.(62)</i>	2008	SRY	1600 g 10 min	13000 g 10 min
<i>Vecchione et al.(63)</i>	2008	SRY	1600 g 10 min	16000 g 10 min
<i>Chiu et al. (68)</i>	2001	SRY	1600 g 10 min	16000 g 10 min
<i>Wagner et al.(64)</i>	2008	SRY	1400 g 10 min	1400 g 10 min
<i>Costa et al.(21)</i>	2001	SRY	3000 g 10 min	X
<i>Zimmerman et al.(65)</i>	2005	SRY	1600 g 10 min	16000 g 10 min
<i>Daniels et al (69)</i>	2006	RHD	2500 g 10 min	10000 g 10 min
<i>Benachi et al. (70)</i>	2012	RHD	3000 g 10 min	X
<i>Finning et al.(71)</i>	2006	RHD	2500 g 10 min	10000 g 10 min
<i>Minon et al. (72)</i>	2005	RHD	3000 g 10 min	10000 g 10 min
<i>Palomaki et al.(39)</i>	2011	T21	1600 g 10 min	16000 g 10 min
<i>Ehrich et al. (40)</i>	2011	T21	2500 g 10 min	15000 g 10 min
<i>Bianchi et al. (73)</i>	2012	T21	1600 g 10 min	16000 g 10 min

3.3.4 – Extraction

Les auteurs utilisent majoritairement les kits QIAamp® DNA blood mini ou QIAamp® DSP virus kit. Ces kits ne sont pas spécifiques de l'ADN plasmatique. Or, l'ADN plasmatique est, comme nous l'avons vu, très fractionné. Ainsi, de nouveaux kits spécifiques

ont récemment fait leur apparition sur le marché. Il semblerait que ces kits aient des performances meilleures en terme de concentration d'ADN plasmatique extrait (74).

Parmi ces kits spécifiques on retrouve QIAamp® circulating nucleic acid de Qiagen®, NucleoSpin® Plasma XS de MachereyNagel® ou encore FitAmp® plasma/serum DNA isolation de Epigentek®. Cette liste est non exhaustive.

3.3.5 – Amplification

3.3.5.1 – Gènes d'intérêt

En détectant des séquences du chromosome Y, absent du patrimoine génétique maternel, on signe la présence d'un fœtus de sexe masculin. Sur le chromosome, les gènes les plus couramment utilisés sont *SRY* et *DYS14* (43). Le gène *SRY* est un gène en copie unique, tandis que *DYS14* est une séquence présente en plusieurs copies (75). On pourrait donc penser que travailler sur *DYS14* augmente la sensibilité de la technique. Certaines publications vont dans ce sens (59,65). Cependant, dans sa revue de la littérature, l'équipe de Devaney a trouvé que la sensibilité de la technique était la même quelque soit le gène utilisé (43). Il n'est donc pas strictement recommandé d'utiliser un gène plutôt que l'autre.

D'autres auteurs ont travaillé sur des séquences différentes, comme les gènes *DYS1/DAZ*, *DYZ3* et *AMELY* (43). L'utilisation des ces séquences est cependant marginale.

3.3.5.2 – Technique utilisée

3.3.5.2.1 – PCR en point final

En 1997, Dennis Lo découvre l'ADN fœtal circulant grâce à une PCR classique amplifiant une séquence du gène *DYS 14* (du chromosome Y) . Il utilise un nombre élevé de cycles de PCR (40 cycles), ce qui augmente le risque d'apparition d'amplifications non spécifiques, pouvant parasiter la lecture de la révélation sur gel d'agarose. Afin d'augmenter

la sensibilité de la technique, la PCR nichée a ensuite été utilisée. Il s'agit d'une double PCR ou « PCR de PCR ». Le risque principal de cette technique est la contamination de l'échantillon, du fait de la manipulation de produits déjà amplifiés pour faire la deuxième PCR. La revue de Devaney *et al.* trouve une sensibilité de 94% et une spécificité de 97,3% (43). Cette performance est jugée médiocre et insuffisante. En France, les experts de la HAS préconisent l'utilisation de la PCR en temps réel, seule technique actuellement capable de fournir une performance acceptable (sensibilité de 99% et spécificité 99,6%) (43).

3.3.5.2.2 – PCR en temps réel

La PCR en temps réel permet de visualiser l'avancement de la PCR à chaque cycle, grâce à la détection de fluorescence directement dans le thermocycleur. En effet, la présence du gène recherché entraîne une augmentation proportionnelle de la fluorescence pendant la PCR. De plus, on utilise un système clos qui permet de limiter la contamination et l'apparition de faux positifs. Parmi les techniques de PCR en temps réel à disposition, deux semblent particulièrement intéressantes : le TaqMan et le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert).

a) TaqMan

Cette technique est utilisée depuis longtemps dans la détermination du sexe fœtal dans le sang maternel (21). De façon amusante, la technique TaqMan a été nommée en contractant le mot Taq polymérase avec PacMan, le fameux jeu vidéo. De fait, cette technique est basée sur la propriété 5'-3' exonucléotidase de l'ADN Taq polymérase. Elle est développée par les laboratoires Roche et est utilisable sur l'automate LightCycler®.

Elle fait appel à une sonde nucléotidique, que l'on va intercaler entre les 2 amorces qui délimitent la séquence à amplifier. (Figure 6). La sonde est marquée à son extrémité 5' par un fluorochrome émetteur appelé reporter. A son extrémité 3' se trouve un autre fluorochrome

suppresseur de fluorescence appelé quencher. Lorsque la sonde est intacte, la proximité entre le quencher et reporter empêche l'émission de fluorescence.

Au cours de la PCR, si la séquence du chromosome Y que l'on cible est présente, la sonde s'hybride sur sa cible. Elle est alors hydrolysée par l'ADN Taq polymérase pendant l'élongation. Le reporter se retrouve donc séparé du quencher, ce qui entraîne l'émission d'un signal fluorescent. Ce signal, mesuré au cours de l'élongation, est proportionnel au nombre de sondes hydrolysées.

L'avantage de cette technique est une plus grande spécificité car elle repose sur l'hybridation de 2 amorces d'environ 20 nucléotides et d'une sonde d'environ 20 nucléotides.

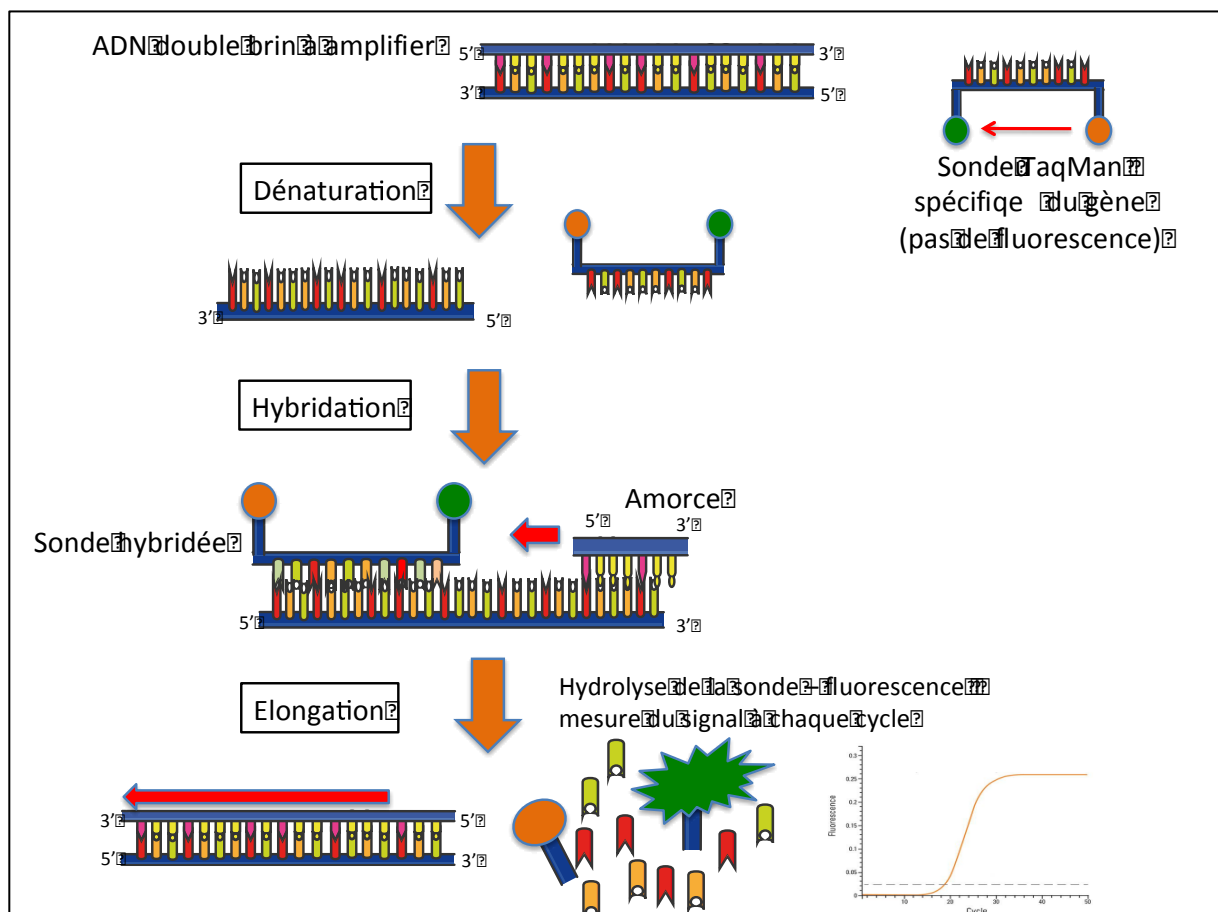


Figure 6 – Principe de la technique de PCR temps réel TaqMan

b) FRET

La technique FRET utilise également la fluorescence, mais d'une autre façon que le TaqMan (Figure 7). Elle utilise deux sondes nucléotidiques complémentaires de la séquence cible et espacées de quelques paires de bases. Une sonde est porteuse à son extrémité 3' d'un fluorochrome donneur, et l'autre possède à son extrémité 5' un fluorochrome accepteur. Lorsque les deux sondes sont dans le milieu, il n'y a pas de fluorescence.

Au moment de l'hybridation, les deux sondes viennent s'hybrider sur la séquence cible. Elles ne sont plus espacées que de 3 à 5 nucléotides, ce qui provoque une émission d'une fluorescence par transfert d'énergie car le spectre d'émission du fluorophore donneur se chevauche avec celui du fluorophore accepteur.

On peut alors mesurer le signal de deux façons différentes : Si on le mesure au moment de l'hybridation, le signal est proportionnel à la quantité de séquences cibles présentes dans le milieu. On peut également réaliser une courbe de fusion après la PCR, car les sondes ne subissent pas d'hydrolyse (contrairement à la technique TaqMan) ce qui rend la production de fluorescence réversible.

3.3.6 – Contrôle du test

3.3.6.1 – Contrôle négatif

Un manque de spécificité ou une contamination entraîneraient l'apparition de faux positifs, c'est à dire le diagnostic de fœtus masculins alors qu'ils sont féminins. Dans le cadre des diagnostics de maladies liées à l'X, le risque serait « au pire » la réalisation d'un DPN invasif inutile, avec 1% de chance de fausse couche. En revanche, dans le cadre de l'HCS, le risque est plus important. Si l'on considère comme masculin un fœtus féminin, le DPN ne sera peut être pas réalisé (Figure 5) et on risque une virilisation des voies génitales externes féminines.

Afin de prévenir ce phénomène, il est recommandé d'utiliser un blanc PCR. Un sérum de femme non enceinte doit être ajouté à chaque série depuis l'extraction jusqu'à la révélation de la PCR comme un témoin négatif. De plus, l'utilisation de la PCR en temps réel dans un système clos permet de limiter au maximum les contaminations, puisqu'il n'y a pas de manipulation d'ADN amplifié. Enfin, de nombreuses équipes utilisent du personnel féminin pour la réalisation du test SRY (76)

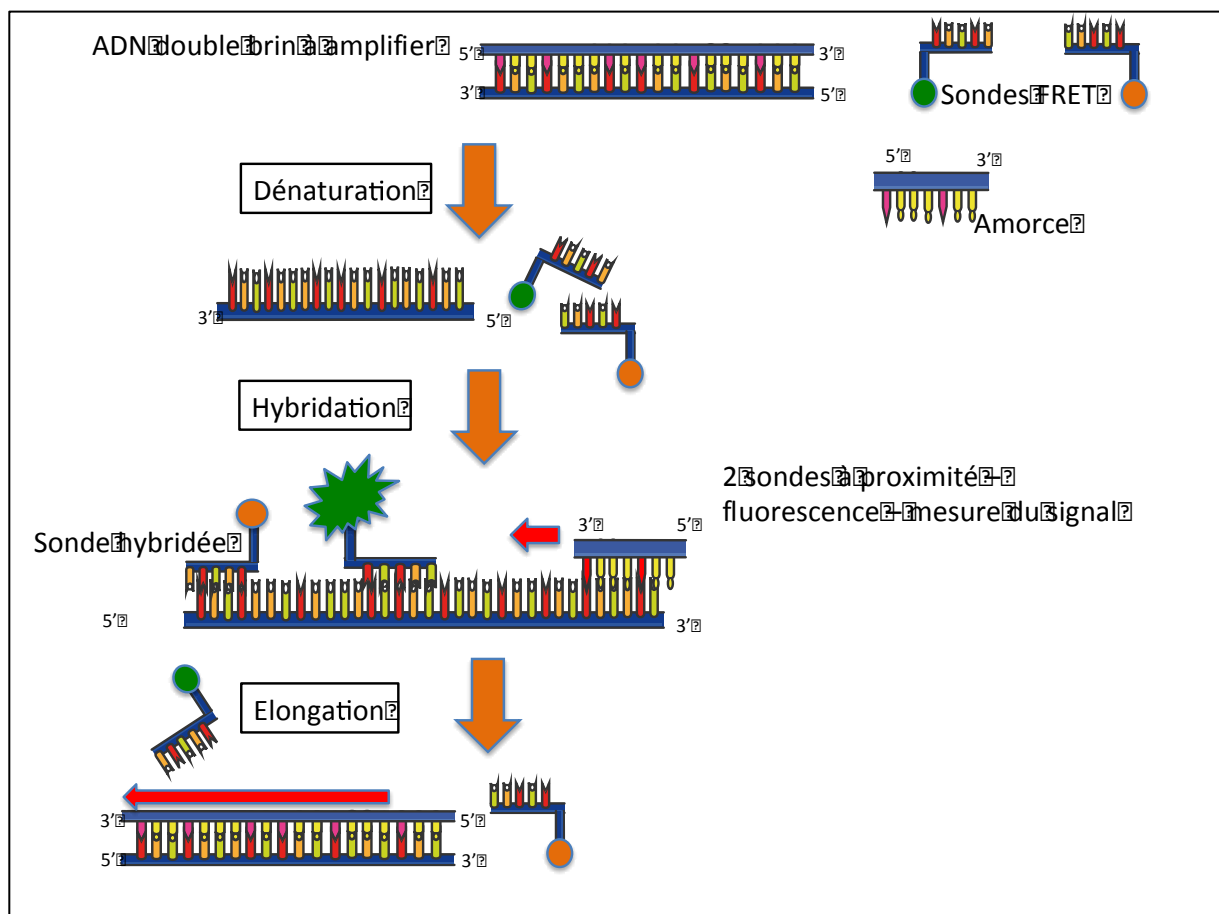


Figure 7 – Principe de la technique de PCR temps réel FRET

3.3.6.2 – Contrôle positif

Le contrôle positif de l'amplification est le principal défi à relever dans la réalisation du test SRY. En effet, le diagnostic de sexe féminin se fait par défaut lorsqu'il n'y a pas

d'amplification. Comment différencier un fœtus féminin d'un problème technique de réalisation du test? Voici les différentes méthodes utilisées pour limiter les faux négatifs :

3.3.6.2.1 – Double amplification

La méthode la plus simple consiste à amplifier deux séquences fœtales différentes. En effet, tout le génome fœtal étant présent dans le plasma maternel sous forme fragmentée, on augmente la sensibilité du test en combinant la recherche sur 2 gènes différents. On peut utiliser deux séquences du chromosome Y. Comme expliqué précédemment, les gènes les plus fréquemment utilisés dans la littérature sont *SRY* et *DYS14*. D'autres auteurs amplifient un gène témoin qui n'est pas présent sur le chromosome Y. On retrouve par exemple l'amplification de séquences du gène β -globine, communes aux deux sexes (57,77). Cette approche augmente la sensibilité et dans le cas d'un fœtus féminin (test *SRY* négatif) elle permet d'affirmer qu'il y avait bien de l'ADN plasmatique dans le milieu. On ne peut cependant pas différencier l'ADN plasmatique fœtal et maternel.

3.3.6.2.2 – ADN traceur de souris

Costa et al, une équipe française pionnière dans le domaine, a une approche légèrement différente (21). Plutôt que d'amplifier deux séquences, ils ajoutent dans le sérum maternel un ADN traceur de souris. Ce traceur sert donc de contrôle d'extraction et d'amplification. On vérifie sa présence en cas de fœtus féminin. On peut ainsi différencier les vrais négatifs (fœtus féminins) des faux négatifs provenant d'une extraction insuffisante d'ADN ou d'un problème d'amplification.

3.3.6.2.3 – Marqueur paternel autre que Y

Afin de mettre en évidence un marqueur spécifique de l'ADN fœtal qui ne soit pas présent sur le chromosome Y, de nombreuses équipes se sont intéressées à l'analyse de polymorphismes par des PCR multiplex (61,78). Pour mettre en évidence la présence d'ADN

fœtal grâce aux polymorphismes, il faut trouver 2 profils différents du même polymorphisme. Cela complexifie énormément l'analyse du résultat, et cette approche semble aujourd'hui abandonnée.

En 2008, l'équipe de Vecchione *et al.* s'est intéressée à des short tandem repeat (STR) présents sur le chromosome X (63). Ces séquences présentent des polymorphismes de répétitions chromosome-dépendants. Ainsi, l'ADN fœtal féminin (deux chromosomes X) possèdera deux profils différents : un allèle maternel et un allèle paternel, qui sont de tailles différentes. Dans le sang maternel, détecter l'allèle paternel sert de marqueur spécifique de l'ADN fœtal des fœtus féminin et donc élimine les faux négatifs. Cependant, l'inconvénient majeur de cette technique est la nécessité d'avoir à disposition du matériel permettant de différencier des fragments d'ADN de tailles différentes.

Une autre approche consiste à s'intéresser à des marqueurs fœtaux épigénétiques. Certains auteurs ont par exemple décrit que le promoteur du gène *MASPIN* était hyperméthylé dans les cellules maternelles et hypométhylées dans les cellules placentaires (79). Cependant, l'analyse de dérivés hypométhylés étant extrêmement difficile (15,80), les auteurs se sont tournés vers le promoteur du gène *RASSF1A* (gène suppresseur de tumeur) dont la séquence placentaire est hyperméthylée (80). La mise en évidence d'un dérivé hyperméthylé du promoteur du gène *RASSF1A* est donc un témoin de présence d'ADN plasmatique fœtal. A l'heure actuelle, il n'est pas fait état dans la littérature de laboratoires utilisant cette technique en routine avec le test SRY.

Partie 2 – Matériel et méthode

1 – Construction de l'étude

1.1 – Considérations éthiques

1.1.1 – Etude non interventionnelle

Le projet inter disciplinaire concernait la mise au point technique du travail sur l'ADN foetal plasmatique. Il ne s'agissait pas dans un premier temps de remplacer le DPN invasif traditionnel par ces techniques innovantes. De plus, il n'y avait pas de prélèvement supplémentaire lié à l'étude, seuls 2 tubes de sang supplémentaires étaient prélevés en plus lors d'un examen standard. Cette étude était donc uniquement observationnelle ou « non interventionnelle ».

En France, les études « non interventionnelles » ne sont pas soumises à un encadrement légal. Il n'y avait donc pas lieu de saisir un comité de protection des personnes (CPP) pour les réaliser. Afin d'en être certain, nous avons sollicité le CPP Sud Est IV le 5 avril 2013. Le 25 avril 2013, le CPP Sud Est IV a rendu un avis consultatif favorable au classement de notre étude comme « non interventionnelle » (Annexe 1), ouvrant la voie au recrutement des patientes.

1.1.2 – Protection des patientes

A chaque inclusion dans l'étude, les patientes ont été informées de la teneur de l'étude par une lettre d'information (Annexe 2). Elles avaient le choix de refuser de participer à l'étude sans que cela ne modifie leurs relations avec l'équipe médicale. De plus, à tout moment et sans justification les patientes pouvaient interrompre leur participation. Elles ont donné leur consentement éclairé qui est gardé au laboratoire (Annexe 3).

Les données ont été rendues anonymes dès la réception du prélèvement, et aucun résultat n'a été transmis aux patientes par la suite.

1.2 – Inclusion des patientes

Afin de développer le test SRY, il fallait inclure des patientes enceintes de 6 semaines d'aménorrhées (SA) afin de répondre aux contraintes posées par le diagnostic de l'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS). Cette date correspond au bilan biologique initial de la grossesse. Ce bilan est généralement prescrit par le gynécologue amené à suivre la grossesse des patientes.

Nous avons recruté 49 patientes entre le 3 mai 2013 et le 19 octobre 2013. 42 patientes ont été recrutées par le Dr Anne-Marie Villaros, gynécologue lyonnaise libérale qui a accepté de collaborer avec notre équipe. 5 patientes ont été recrutées par les Dr Lucia Rugeri et Yasim Dargaud à la consultation d'hémostase clinique de l'hôpital Edouard Herriot. 1 patiente provenait de la consultation du Dr Carine Abel de l'hôpital de la Croix Rouse et 1 patiente était technicienne sur le plateau de génétique de l'hôpital Edouard Herriot.

L'âge gestationnel était compris entre 5 et 38 SA (médiane 7,9 SA). Au moment de la réalisation du test SRY, le sexe réel du fœtus n'était pas connu.

1.3 – Obtention du sexe réel de l'enfant

Afin de comparer les résultats du test SRY avec le sexe réel de l'enfant, nous avons attendu la réalisation de l'échographie du 2^{ème} trimestre. Si le résultat n'était pas disponible, nous avons obtenu le sexe à la naissance de l'enfant. Dans le cas d'une fausse couche survenue après la réalisation du test, nous avons cherché à obtenir le sexe fœtal sur le compte rendu d'anatomo-pathologie, lorsque cela était possible.

2 – Etape pré-analytique

2.1 – Prélèvement

Au cours de leur consultation avec le Dr Villaros, les patientes recevaient la lettre d'information et signaient un consentement papier pour participer à l'étude. Lors de leur passage au laboratoire de biologie médicale pour effectuer leurs examens, elles présentaient au biologiste un papier d'information spécialement destiné au biologiste médical (Annexe 4). On demandait alors au laboratoire de rajouter au prélèvement un tube sec avec gel de 5 mL (BD Vacutainer® Ref : 367955) ou à défaut un tube sec sans gel (BD Vacutainer® Ref : 368815). Nous n'avons jamais récupéré de tubes secs sans gel.

Les 6 patientes prélevées en consultation d'hémostase ont été informées et ont signé le consentement au cours de leur consultation. Elles ont ensuite été prélevées au centre de prélèvement du pavillon E de l'hôpital Edouard Herriot, où deux tubes sec avec gel de 5 mL (BD Vacutainer® Ref : 367955) ont été ajoutés pour les besoins de l'étude.

Un tube sec avec gel de 5mL a été prélevé chez la patiente du laboratoire au centre de prélèvement de l'hôpital Edouard Herriot (pavillon K), comme la patiente du Dr Abel au centre de prélèvement de l'hôpital de la Croix Rousse.

2.2 – Transport

Les laboratoires de biologie médicale étaient chargés de nous appeler juste après la réalisation du prélèvement. Nous venions alors chercher les prélèvements le jour même. Si le transport le jour même n'était pas possible, le laboratoire était chargé de conserver le tube à +4°C jusqu'au lendemain (après la première centrifugation). Le transport a été effectué à température ambiante. Les 42 prélèvements ont été effectués dans 19 laboratoires différents, dans la région lyonnaise, ce qui représente un trajet total d'un peu moins de 400 kilomètres (voir Figure 8).

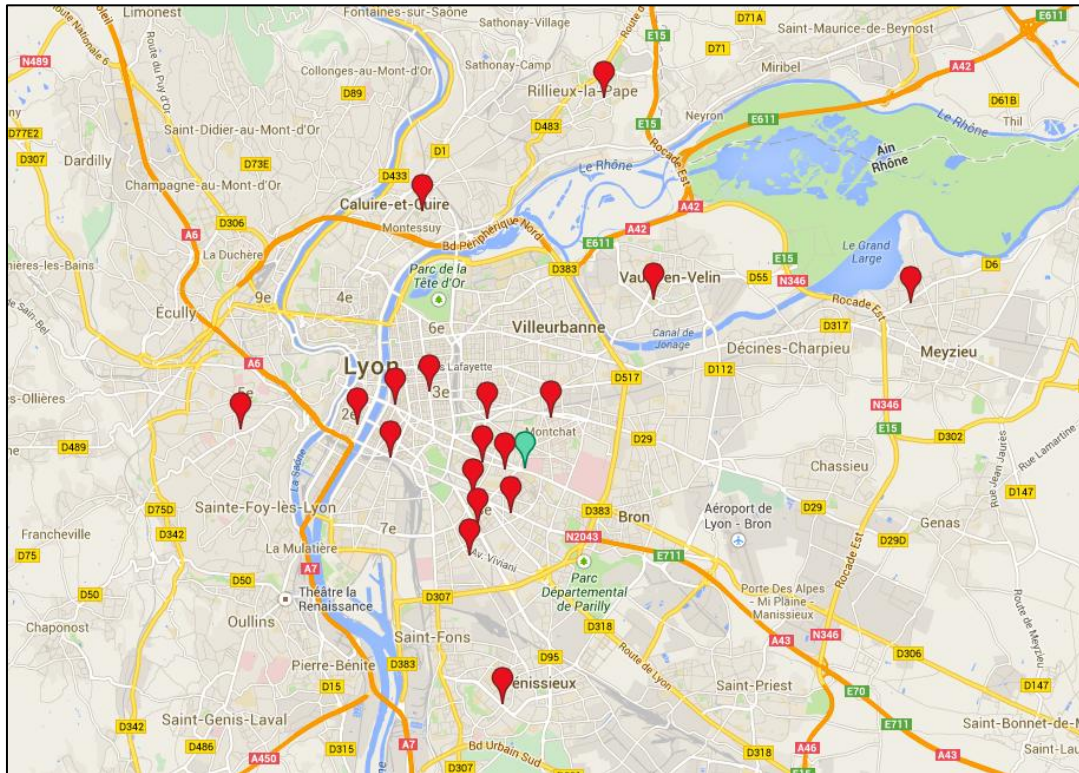


Figure 8 – Carte représentant les laboratoires de biologie médicale (en rouge) ayant participé à notre étude.

L’hôpital Edouard Herriot est représenté en vert. Carte réalisée par Google map®.

Les prélèvements provenant des pavillons E ou K de l’hôpital Edouard Herriot ont été acheminés à pied juste après le prélèvement. Le prélèvement en provenance de l’hôpital de la Croix Rousse a été acheminé à température ambiante par un chauffeur des HCL.

2.3 – Centrifugation

Suite à notre étude bibliographique sur les centrifugations, nous avons choisi d’avoir recours à une double centrifugation. Lorsqu’elle a été effectuée au laboratoire, la première centrifugation était de 1600 g 10 min. Cependant, pour la majorité des prélèvements, la première centrifugation a été effectuée par le laboratoire préleveur.

Le sérum a ensuite été décanté minutieusement puis ultracentrifugé à (16000 g 10 min). Il a ensuite été décanté minutieusement (jusqu’à 1cm au dessus du culot) et congelé à -20°C dans un réfrigérateur ne contenant que des échantillons primaires.

2.4 – Extraction

L'ADN libre a été élué dans 50 µL à partir de 1 mL de sérum grâce au kit « QIAamp® circulating nucleic acid » de Qiagen. Les extractions ont été faites manuellement avec la pompe à vide QIAvac 96 de la société Qiagen. Les instructions du fabricant ont été respectées à toutes les étapes : tout d'abord une lyse des protéines grâce à la protéinase K dans un tampon à 60°C. Cette étape permet de libérer l'ADN circulant et d'inactiver les DNases potentielles. Vient ensuite une étape d'adsorption sur une membrane contenue dans une colonne. Enfin, l'ADN est élué dans un tampon.

A chaque série d'extraction nous avons ajouté un témoin positif et un témoin négatif qui ont été amplifiés et permettaient de contrôler les différentes étapes.

Les extraits ont ensuite été congelés à -20°C dans un congélateur spécifique d'ADN extrait.

3 – Etape analytique

3.1 – Bio-informatique

3.1.1 – Identification des séquences

Le marqueur *DYS 14* est une séquence présente plusieurs fois sur le gène *TSPY*. Nous avons identifié une séquence de 83 pb sur le gène *TSPY1*. Il s'agit de la séquence GenBank® NCBI de référence NG_027958 entre les positions 7144 et 7163.

Le gène *SRY* est un gène en une copie, connu depuis longtemps et utilisé massivement par les équipes réalisant le test SRY. Nous avons identifié une séquence de 115 pb sur le gène *SRY*. Il s'agit de la séquence GenBank® NCBI de référence NG_011751 entre les positions 5308 et 5422.

Nous avons effectué un criblage du génome humain avec nos séquences d'intérêt grâce au logiciel NCBI Blast®, qui confirme que les répétitions de la séquence sont présentes

uniquement sur le chromosome Y (consulté le 16 août 2014). Cela garantit la sélectivité du test. Il n'y aura pas d'amplification en présence d'ADN maternel.

3.1.2 – Design des amorces et de la sonde

3.1.2.1 – Séquence des amorces et de la sonde

Les séquences des amorces et des sondes que nous avons utilisées, ainsi que leur position, sont présentées respectivement dans les tableaux 2 et 3.

Tableau II – Séquence nucléotidique des amorces

Gène	Séquence	Taille amplicon	Nom de la séquence	Coordonnées
DYS14	5'–ATCGTCCATTTCCAGAATCA–3'	82 pb	NG_027958	7144 – 7163
	5'–GTTGACAGCCGTGGAATC–3'			7208 – 7225
SRY	5'–GGCAACGTCCAGGATAGAGTGA–3'	115 pb	NG_011751.1	5308 – 5329
	5'–TGCTGATCTCTGAGTTTCGCATT–3'			5400 – 5422

Tableau III – Séquence nucléotidique des sondes

Gène	Séquence	Nom de la séquence	Coordonnées
DYS14	5'–TGCCACAGACTGAACTGAATGATTTTC–3'	NG_027958	7153 – 7179
SRY	5'–CATGAACGCATTCATCGTGTGTGGT[F1c]–3'	NG_011751	5337 – 5361
	5'–[LC640]CGATCAGAGGCGCAAGATGGCTCT[Phos]–3'		5364 – 5387

3.1.2.2 – Amorces : vérification de leur séquence et de leur sensibilité

Pour qu'une amplification PCR soit correcte, il est capital que les amorces puissent se fixer sans aucun mésappariement sur le génome. Cela inclut donc de vérifier leur complémentarité parfaite avec la séquence d'intérêt et l'absence, autant que possible, du moindre *single nucleotid polymorphism* (SNP) sur leur séquence afin d'éviter une amplification spécifique d'allèle. Pour cela, on réalise une interrogation, pour chaque couple d'amorces, des banques de données des SNP au moyen du logiciel de l'université de Manchester, SNP check, qui recense tous les SNP décrits dans la littérature.

(<https://ngri.manchester.ac.uk/SNPCheckV3/snpcheck.htm>). L'objectif est que les amorces ne contiennent pas de SNP fréquents (>1%), surtout sur les 5 dernières bases de leur extrémité 3'. Les résultats du test des amorces et de la sonde sont satisfaisants et sont présentés dans le tableau 4. Les résultats des SNP check sont disponibles dans le tableau IV et en Annexes 5, 6, 7 et 8 (consulté le 17 août 2014).

NB : En annexe 8, les deux sondes FRET sont situées sur le même brin, mais pour utiliser le logiciel il a fallu traduire une des deux sondes sur le brin reverse. Il s'agit juste d'un artefact pour faire fonctionner le logiciel.

3.1.2.3 – Contrôle de la bonne identité de la PCR

Afin de garantir la totale sélectivité du test, nous avons effectué un « blast » de la séquence théoriquement amplifiée par les amorces. L'objectif est d'obtenir des séquences amplifiées de tailles inférieures à 1500 pb uniquement présentes sur le chromosome Y (et donc absentes du génome maternel).

Pour ce faire nous avons utilisé le logiciel Primer-blast. Les résultats sont satisfaisants et confirment que *DYS14* est présente en plusieurs copies et uniquement sur le chromosome Y, tandis que *SRY* est une séquence unique du même chromosome. Ils sont disponibles en Annexes 9 et 10 (consulté le 16 août 2014).

3.2 – Préparation des milieux réactionnels

3.2.1 – PCR TaqMan *DYS14*

Nous avons préparé un milieu réactionnel dans la glace de 30µL comprenant 7µL d'ADN extrait, la sonde TaqMan (170 nM), les amorces (500 nM) et le réactif LC480 Probe Master de Roche (15µL) contenant tampon, dNTP et ADN Taq polymérase.

Tableau IV – Contrôle des SNP sur nos amorces

Amorce	Date SNP check	SNP		Interprétation	Validation amorce ?
DYS14 - Foward	16-août-14	Aucun			Oui
DYS14 - Reverse	16-août-14	Aucun			Oui
DYS14 - Sonde	16-août-14	Aucun			Oui
SRY - Foward	16-août-14	rs104894957	NG_011751.1:g.5326G>C	- Rare	Oui
				- Mutation pathogène	
				- Pas dans les 3 dernières bases en 3'	
SRY - Reverse	16-août-14	rs104894970	NG_011751.1:g.5422A>T	- Rare	Oui
		rs104894959	NG_011751.1:g.5418C>G	- Mutation pathogène	
				- En 5' de l'amorce	
SRY - Sonde 1	16-août-14	Aucun			Oui
SRY - Sonde 2	16-août-14	rs104894969	NG_011751.1:g.5340G>A	- Rare	Oui
		rs104894968	NG_011751.1:g.5351T>C	- Mutation pathogène	
				- En 5' de l'amorce	
		rs104894965	NG_011751.1:g.5357G>A	- Rare	
				- Mutation pathogène	
				- Pas dans les 3 dernières bases en 3'	

3.2.2 – PCR Fret SRY

Nous avons défini un protocole en deux étapes. Tout d’abord une PCR du fragment d’intérêt sur un thermocycleur classique. Puis l’ajout dans le milieu des sondes FRET. On réalisait ensuite une courbe de température.

Pour la PCR initiale, nous avons préparé un milieu réactionnel dans la glace de 20µL comprenant 10µL d’ADN extrait, les amorces (500 nM) et le réactif PCR (10µL) contenant Taq Q Biogène, tampon, MgCl₂ et dNTP.

Pour la deuxième étape, les deux sondes sont ajoutées à concentrations égales dans le milieu réactionnel (250 nM).

3.3 – Caractéristiques de la PCR

Les conditions de PCR ont été définies et optimisées grâce à des essais sur des témoins positifs et négatifs. A l’exception de la 1^{ère} étape de notre PCR sur SRY, qui a eu lieu dans un thermocycleur « classique », toutes les autres étapes ont été réalisées dans le Light Cycler 480® de la société Roche. Les caractéristiques de nos réactions PCR sont résumées dans le tableau V.

Chaque examen était réalisé avec un témoin positif (ADN plasmatique d’homme) qui permettait de contrôler l’étape d’extraction et d’amplification. On utilisait également un témoin négatif (ADN plasmatique de femme) afin de contrôler l’absence de contamination dans la série.

Les résultats n’étaient interprétés que si le témoin négatif et le témoin positif rendaient le résultat attendu.

Tableau V – caractéristiques de nos réactions PCR

		DYS14		SRY	
Etape1	Dénaturation		95°C 10 min		95°C 5 min
	Dénaturation	40 cycles	95°C 15s	50 cycles	95°C 30s
	Hybridation		56°C 20s		62°C 30s
	Elongation		72°C 20s (Mesure fluo)		72°C 1 min
	Elongation finale		72°C 5 min		72°C 5 min
Etape 2	Dénaturation			99°C 10 min	
	Gel			0°C 10 min	
	Courbe température			- Dénaturation 99°C 10 min - Hybridation 50°C 10 s - Chauffage par 0,06°C/s jusqu'à 75°C (Mesure fluo)	

4 – Etude de contamination

La majorité de nos inclusions ont été faites dans des laboratoires de biologie médicale de ville, qui sont la plupart du temps des sites péri-analytiques. Ainsi, au moment de récupérer les prélèvements, le tube était la plupart du temps déjà centrifugé. Nous avons donc craint que la première étape de centrifugation ne soit mal effectuée, ce qui entraînerait une contamination de nos prélèvements par de l'ADN génomique.

Nous avons donc effectué une électrophorèse de taille de l'ADN présent dans certains de nos échantillons, grâce à l'automate Caliper LabChip® XT, qui permet de séparer les fragments d'ADN selon leur taille par une technique électrophorétique en puce. En effet, l'ADN plasmatique ayant une taille inférieure à 200pb, il est très facile de le différencier de l'ADN génomique.

Partie 3 – Résultats

1 – Résultats bruts

La détermination du sexe fœtal dans le sang maternel a été effectuée chez les 49 patientes. Les Figures 9 et 10 illustrent des résultats positifs et négatifs dans chacune des techniques utilisées avec le LightCycler 480. Un sérum masculin a été ajouté comme contrôle positif et un sérum féminin (femme non enceinte) a été ajouté comme témoin négatif.

Au cours de l'étude, 3 patientes ont été perdues de vue et 3 autres ont fait des fausses couches sans que l'examen anatomo-pathologique ne permette de déterminer le sexe fœtal (les résultats de ces patientes sont présentés en gris dans le tableau VI). Pour le sérum C-5, il nous est possible de dire que le fœtus était probablement masculin. Pour les 5 autres, n'ayant pas eu d'amplification, il ne nous est pas possible de dire si le fœtus était féminin ou s'il s'agit de faux négatifs.

Pour une autre patiente ayant fait une fausse couche, le sexe fœtal a été déterminé par les anatomo-pathologistes. Pour toutes les autres patientes, le sexe réel du fœtus ou de l'enfant a pu être obtenu de la façon prévue par le protocole, c'est à dire soit grâce au sexe échographique du 2^{ème} trimestre, soit après la naissance.

2 – Sensibilité/spécificité du test

2.1 – Spécificité

Toutes les femmes enceintes d'un fœtus féminin (n=20) ont eu un test SRY négatif dans les deux techniques. De plus, une patiente s'est révélée avoir une grossesse gémellaire de deux filles. Le test était également négatif dans ce cas de figure. La spécificité du test est donc de 100% dans notre cohorte.

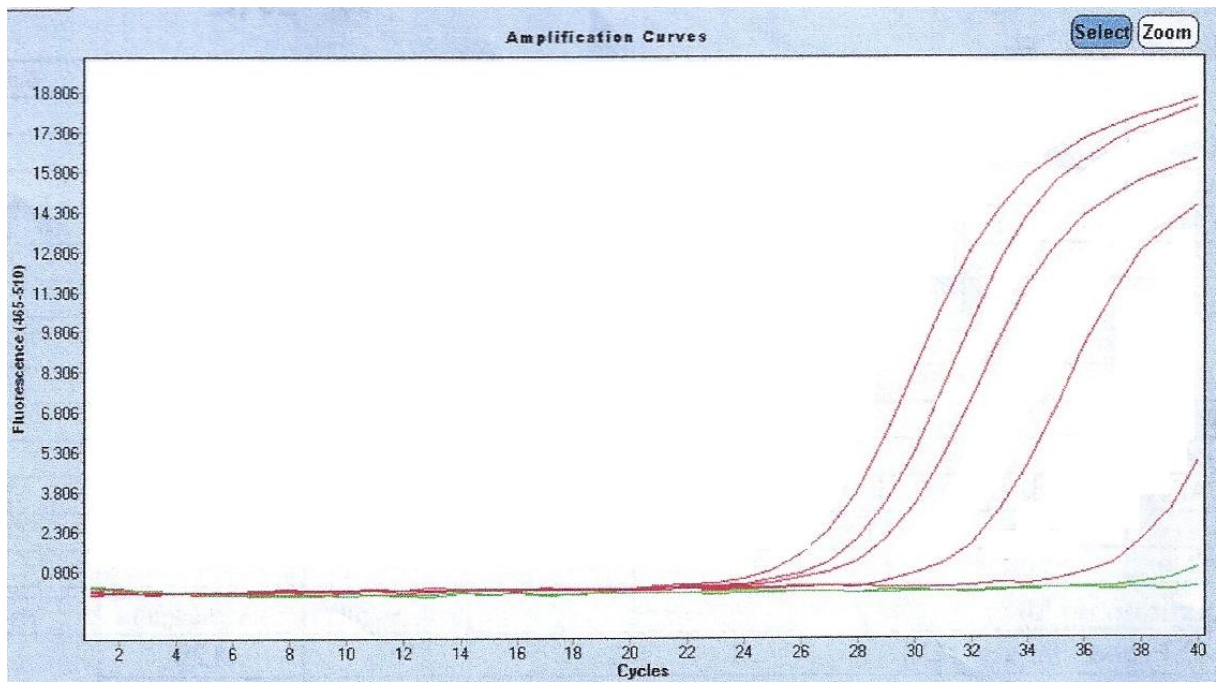


Figure 9 – Détection du gène *DYS14* par technique TaqMan.
 Nous avons testé 4 sérums masculins et un sérum féminin..

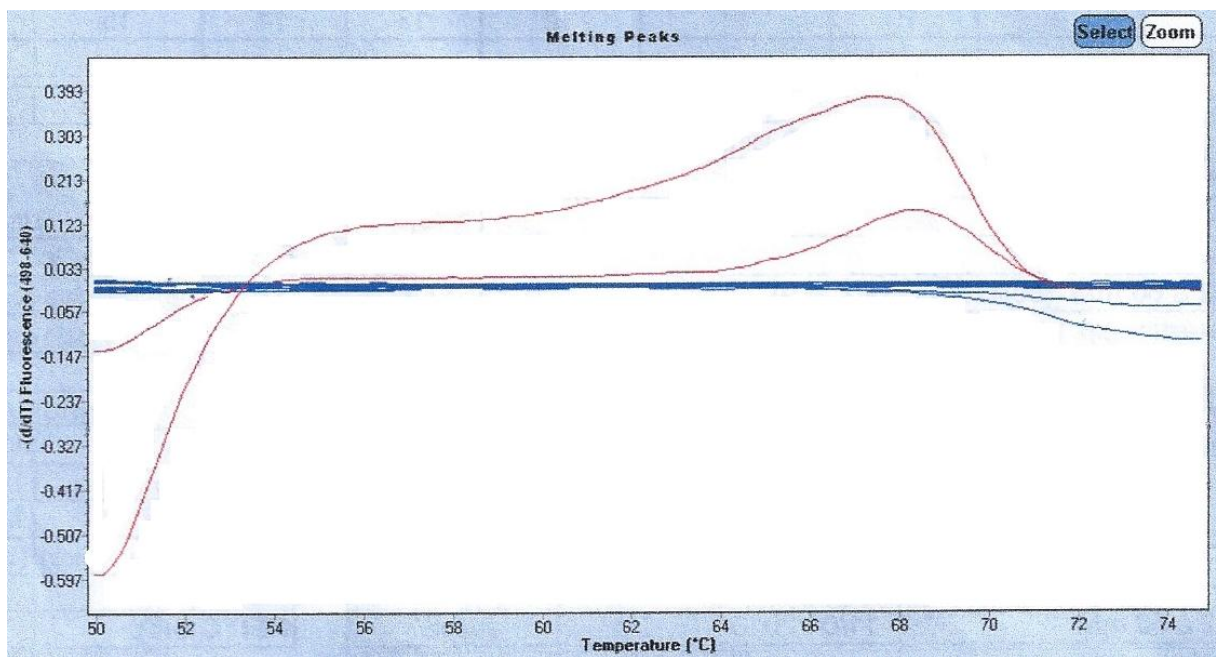


Figure 10 – Détection du gène *SRY* par technique FRET.
 Nous avons testé 14 sérums féminins et 1 sérum masculin.

Tableau VI – Résultats du test SRY de notre cohorte, comparés avec le sexe de l'enfant à la naissance.

n° Sérum	Date de la grossesse (SA)	Sexe à la naissance	Résultat TaqMan <i>DYS14</i>	Résultat FRET <i>SRY</i>
C-1	6,43	Féminin	Féminin	Féminin
C-2	6,43	Féminin	Féminin	Féminin
C-3	8,43	Féminin	Féminin	Féminin
C-4	7,43	Féminin	Féminin	Féminin
C-5	6,29	Inconnu	Masculin	Masculin
C-6	7,43	Féminin	Féminin	Féminin
C-7	9,71	Féminin	Féminin	Féminin
C-8	8,57	Féminin	Féminin	Féminin
C-9	7,57	Masculin	Masculin	Masculin
C-10	9,57	Masculin	Masculin	Masculin
C-11	7,86	Masculin	Masculin	Masculin
C-12	6,71	Masculin	Masculin	Masculin
C-13	7,57	Masculin	Masculin	Masculin
C-14	9,00	Féminin	Féminin	Féminin
C-15	7,71	Féminin	Féminin	Féminin
C-16	7,86	Féminin	Féminin	Féminin
C-17	8,71	Masculin	Masculin	Masculin
C-18	8,00	Masculin	Masculin	Masculin
C-19	7,57	Masculin	Masculin	Masculin
C-20	9,00	Masculin	Masculin	Masculin
C-21	9,00	Masculin	Masculin	Masculin
C-22	7,57	Masculin	Masculin	Masculin
C-23	5,86	Féminin	Féminin	Féminin
C-24	8,71	Féminin	Féminin	Féminin
C-25	7,43	Féminin	Féminin	Féminin
C-26	9,57	Masculin	Masculin	Masculin
C-27	7,29	Féminin	Féminin	Féminin
C-28	7,86	Féminin	Féminin	Féminin
C-29	11,43	Masculin	Masculin	Masculin
C-30	5,86	Masculin	Masculin	Masculin
C-31	10,43	Masculin	Masculin	Masculin
C-32	5,14	Inconnu	Féminin	Féminin
C-33	13,57	Inconnu	Féminin	Féminin
C-34	7,43	Féminin	Féminin	Féminin
C-35	5,14	Masculin	Féminin	Féminin
C-36	11,57	Masculin	Masculin	Masculin
C-37	5,43	Masculin	Masculin	Féminin
C-38	10,71	Inconnu	Féminin	Féminin
C-39	6,14	Inconnu	Féminin	Féminin
C-40	11,29	Féminin	Féminin	Féminin
C-41	7,29	Féminin/Féminin	Féminin	Féminin
C-42	9,14	Inconnu	Féminin	Féminin
C-43	6,14	Masculin	Masculin	Masculin
C-44	7,43	Féminin	Féminin	Féminin
A-5	13,00	Masculin	Masculin	Masculin
A-6	38,00	Masculin	Masculin	Masculin
A-7	35,00	Masculin	Masculin	Masculin
A-1	21,00	Féminin	Féminin	Féminin
A-3	25,00	Masculin	Masculin	Masculin

2.2 – Sensibilité

2.2.1 – Sensibilité de la cohorte

Le calcul de la sensibilité est réalisé uniquement sur des grossesses de fœtus masculins. Sur 23 femmes enceintes d'un fœtus masculin, 21 ont eu un test positif dans les deux techniques. Il y a eu deux faux négatifs : une patiente (C37 : 5,43 SA) a eu un test positif dans une seule technique (*DYS14*) et une patiente pourtant enceinte d'un fœtus masculin (C35 : 5,14 SA) était négative dans les deux techniques (présentés en orange dans le tableau VI). La sensibilité de notre test n'est donc pas de 100%, a fortiori dans les examens réalisés très tôt pendant la grossesse. Dans notre cohorte, la sensibilité devient de 100% après 5,43 SA.

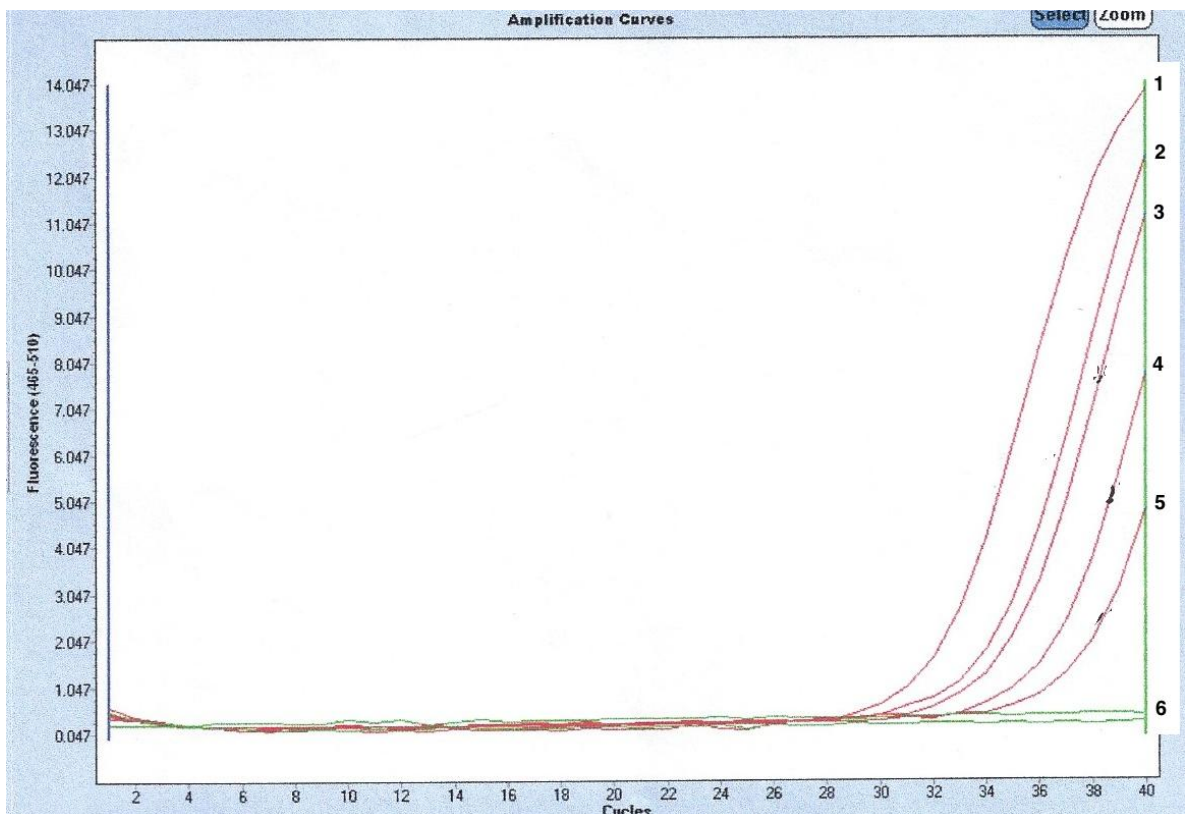
Les résultats des tests réalisés avant 8 SA (date limite de réalisation du test dans le diagnostic d'HCS) avec la technique TaqMan sont synthétisés dans le tableau VII. Avec cette technique, moins la concentration en séquence à amplifier est importante et plus il faut de cycles pour obtenir un signal. Lorsque l'inflexion de la courbe est obtenue au delà de 38 cycles, il est très difficile de différencier un sérum positif d'un sérum négatif. On remarque grâce au tableau VII qu'il n'y a pas de corrélation entre l'avancement de la grossesse et le nombre de cycles permettant d'obtenir un signal.

Tableau VII – Analyse des sérums de grossesse « masculines » antérieures à 8 SA en fonction de nombre de cycles permettant d'obtenir un signal avec notre technique TaqMan.

N° Sérum	SA	Sexe	Nombre de cycles
C-35	5,14	Masculin	Pas de signal
C-37	5,43	Masculin	38
C-30	5,86	Masculin	35
C-43	6,14	Masculin	37
C-12	6,71	Masculin	36
C-13	7,57	Masculin	34
C-19	7,57	Masculin	33
C-22	7,57	Masculin	32
C-9	7,57	Masculin	33
C-11	7,86	Masculin	31

2.2.2 – Limite de sensibilité

Nous avons cherché à déterminer la limite de sensibilité de notre méthode TaqMan *DYS14* (la plus sensible), en diluant de l'ADN plasmatique masculin (issus d'un homme sain) dans du sérum de femme non enceinte. Nous avons obtenu un signal jusqu'à la dernière dilution effectuée, qui correspond à une concentration en ADN de 2,62 pg/ μ L. Cette sensibilité est parfaitement compatible avec une utilisation en routine clinique à 6,5 SA.



Numéro sérum	Concentration ADN (pg/ μ L)	Nombre de cycle
1	21	31
2	15,75	33
3	10,5	34
4	5,25	35
5	2,62	36
6	Témoin négatif (sérum femme non enceinte)	

Figure 11 – Sensibilité de notre PCR *DYS14* TaqMan.

Un sérum de sujet masculin a été dilué dans du sérum de femme non enceinte. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de séquences *DYS14* amplifiées au cours de la PCR. Plus la concentration du sérum en ADN fœtal est importante et moins il faut de cycles pour obtenir une amplification mesurable.

3 – Etude de contamination

Nous avons ensuite effectué l'étude de contamination par l'ADN génomique uniquement sur certains de nos échantillons. Les résultats sont visibles sur la figure 12. Nous n'avons pas pu le faire sur tous du fait d'un problème de matériel (puce endommagée). Cependant, nous avons constaté que les tubes ayant été prélevés dans des laboratoires de biologie médicale privés sont contaminés par l'ADN génomique qui fait plusieurs centaines de paires de bases, tandis que les tubes prélevés dans notre laboratoire en sont exempts. La contamination par l'ADN génomique n'a cependant pas interféré avec nos résultats.

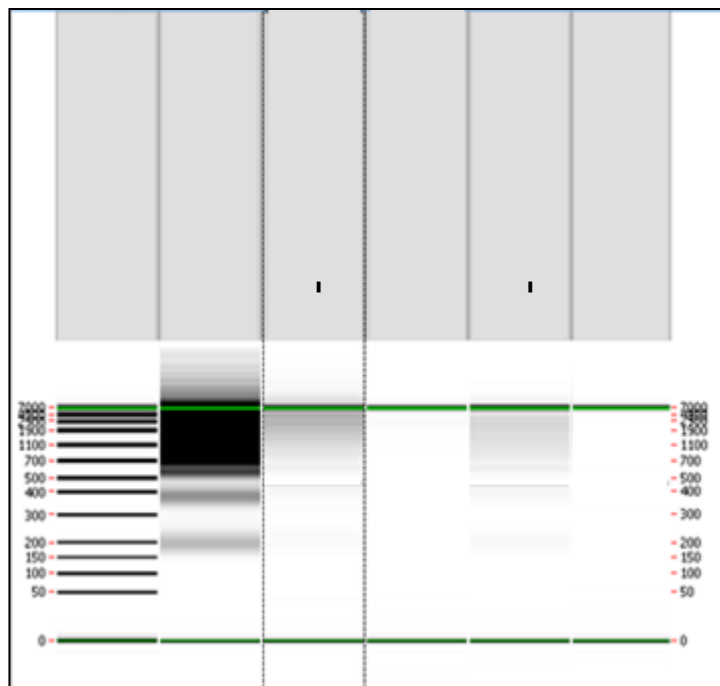


Figure 12 – Mise en évidence de contamination de nos extraits de sérums de femmes enceintes par de l'ADN génomique.

Les sérums testés sont C-26 et C-41. Le témoin laboratoire est l'extrait du sérum d'un témoin masculin prélevé au sein de notre laboratoire. Le témoin négatif est un extrait d'eau.

Partie 4 – Discussion

L'objectif de cette étude était de mettre au point une technique de détermination du sexe fœtal sur le sang maternel qui soit utilisable pour le diagnostic prénatal des maladies génétiques liées à l'X et le diagnostic de l'hyperplasie congénitale des surrénales. Nous avons donc développé deux techniques de PCR en temps réel différentes sur deux gènes différents du chromosome Y, le gène *SRY* et le gène *DYS14*. La combinaison de ces deux techniques réalisées en parallèle constitue notre test *SRY*.

1 – Discussion méthodologique

1.1 – Etape pré analytique

Même si la majorité des auteurs réalisent le test sur du plasma prélevé sur tube EDTA, nous avons choisi de faire nos essais techniques sur du sérum prélevé sur tube sec avec gel séparateur. En effet, il s'agit de la matrice demandée par les laboratoires CERBA, qui sont les seuls à proposer d'effectuer le test avec du matériel pré-analytique simple (3 tubes secs avec gel séparateur). Dans les autres laboratoires, il est demandé de commander un kit spécial, dont la nature n'est pas précisée. De plus, Costa *et al.* ont montré une sensibilité et spécificité très bonne du test sur sérum au début de la grossesse (21,55). Travailler sur tube sec avec gel séparateur ne semble pas diminuer la performance du test puisque nous obtenons une sensibilité et une spécificité conforme avec les données de la littérature.

Cependant, une étude rapide de nos échantillons a montré une contamination du sérum par de l'ADN génomique. Celui-ci provient probablement de cellules leucocytaires dégradées *in vitro* lors de la première centrifugation ou le transport des échantillons. En effet, la contamination n'est pas retrouvée lorsque l'intégralité de la phase pré-analytique est réalisée dans notre laboratoire. Cette contamination ne semble pas gênante pour une analyse

qualitative de l'ADN fœtal comme le test SRY. En revanche, dans le cadre d'un travail quantitatif sur l'ADN circulant, comme le diagnostic non invasif de la trisomie 21, il faudra modifier ce protocole. La première centrifugation semble trop aléatoire lorsqu'elle est réalisée sur des sites non experts de DPN. Il semble donc préférable que l'intégralité de l'examen soit réalisé au laboratoire de génétique, le temps que d'autres essais sur les conditions pré analytiques de réalisation de DPNNI sur ADN plasmatique soient menés.

1.2 – Etape analytique

Dans notre cohorte, la spécificité était de 100%. Cependant, il a été mis en évidence un défaut de sensibilité (faux négatif) sur des prélèvements effectués très tôt pendant la grossesse (5,14 et 5,43 SA). Pour le sérum prélevé à 5,43 SA, la technique TaqMan sur *DYS 14* s'est révélée plus sensible que la technique FRET *SRY*. Ceci est probablement dû au fait que le gène *DYS 14* est présent en plusieurs copies sur le chromosome Y, contrairement au gène *SRY*. Pour améliorer la sensibilité de notre technique FRET, il serait envisageable de changer le protocole technique, et de faire l'intégralité de la réaction dans le LightCycler 480. Nous n'avons pas pu le réaliser par souci d'économie. En effet, cela nécessiterait d'utiliser une Taq polymérase bien plus coûteuse que celle de notre protocole (Taq Q Biogène). Mais, en ajoutant les sondes FRET dans le milieu réactionnel directement avant la réaction, nous pourrions nous affranchir de l'ouverture des tubes en cours de réaction, ce qui limiterait grandement le risque de contamination et serait conforme aux recommandations des experts de la HAS.

Il n'a pas été observé de contamination sur notre cohorte. Pourtant, l'intégralité des analyses a été réalisée par un sujet masculin. Même si de nombreux auteurs disent travailler avec du personnel exclusivement féminin, l'ADN plasmatique et le DPNNI ne paraissent pas plus sujet à la contamination que le DPN traditionnel. Il nous semble donc que le test SRY peut être réalisé par du personnel masculin qui respecte les bonnes pratiques de laboratoire.

Lors de chaque série, l'absence de contamination est contrôlée depuis l'extraction par un témoin négatif (sérum de femme non enceinte).

1.3 – Analyse du résultat

Nous n'avons pris en compte la série de résultat que si le contrôle positif (ADN de femme enceinte connue pour avoir un fœtus masculin) et le contrôle négatif (ADN de femme non enceinte) étaient conformes.

Comme dans le DPN traditionnel, l'utilisation de plusieurs techniques différentes dans un même test permet de garantir la sécurité du résultat. Dans notre cas, la PCR en temps réel sur *DYS 14* nous a offert la meilleure sensibilité. Dans le cas où nous avons une amplification de *DYS 14* et pas de *SRY*, nous avons considéré le test comme positif (fœtus masculin). Néanmoins, si nous avons eu un résultat positif pour *SRY* et négatif pour *DYS 14* nous aurions recommencé le test depuis l'extraction pour éliminer une possible contamination. Ce cas de figure ne s'est pas présenté sur notre cohorte.

2 – Utilisation du test en routine

Nous avons obtenu deux résultats faussement négatifs, à 5,14 et 5,43 SA, ce qui est très précoce. Ceci est probablement lié à une très faible concentration du sérum en ADN fœtal. L'équipe de Lo a montré que la concentration d'ADN plasmatique dans le sang maternel augmentait au cours de la grossesse (16). Ainsi, pour éviter les faux négatifs liés à une concentration en ADN fœtal insuffisant, la réalisation de notre test ne semble pas indiquée à 5 SA. A 6 SA nous n'avons pas noté de faux négatifs. Ceci confirme sur une petite cohorte de patiente les données de l'étude de Tardy-Guidollet *et al.* qui dans le cadre du DPN de l'hyperplasie congénitale des surrénales ne préconisent pas d'effectuer le test avant 4,5 semaines de grossesse (soit environ 6,5 SA) (55).

De plus, comme nous n'utilisons pas de marqueur spécifique de présence d'ADN plasmatique dans chacun des tubes, nous ne pouvons pas faire la différence entre un faux négatif aléatoire et un fœtus féminin. Le risque, dans les maladies liées à l'X, serait la naissance d'un enfant malade n'ayant pas bénéficié d'un DPN suite à l'erreur du test SRY. Nous pensons cependant que dans cette indication le test peut être réalisé entre 8 et 10 SA, où sa sensibilité est de 100% sur la cohorte de patientes que nous avons testé.

La mise au point technique du test SRY a répondu à nos objectifs et aux contraintes posées par le DPN de l'HCS et de maladies liées à l'X. Suite à ce travail, nous pensons donc que le test pourrait entrer dans son développement final en vue d'une utilisation en pratique clinique.

3 – Perspectives

3.1 Test SRY

La détermination du sexe fœtal dans le sang maternel a été la première application du DPNNI à avoir été utilisée en routine clinique. Il s'agit d'un test uniquement qualitatif dont l'utilisation nécessite des moyens techniques déjà disponibles sur les plateformes de génétique des CHU les plus importants. De plus, l'inscription du test SRY à la nomenclature des actes de biologie médicale a ouvert la voie à sa démocratisation, alors qu'elle était réservée jusqu'alors à des structures privées internationales. Grâce à notre travail, nous avons montré qu'il était tout à fait possible d'introduire cette technique aux HCL. De plus, il paraît techniquement envisageable d'élargir le recrutement de patientes aux laboratoires de biologie médicale de ville, dans le cadre de conventions publiques/privées.

3.2 Considérations éthiques

Du fait de l'absence de risque lié au prélèvement et de sa disponibilité en début de grossesse, de nombreux scientifiques s'inquiètent de la possibilité de voir apparaître un screening systématique des femmes enceintes plutôt qu'un dépistage ciblé (81), comme c'est le cas actuellement. De plus, le DPNNI pourrait être utilisé à des fins non médicales et prendre le chemin d'une nouvelle forme d'eugénisme. En effet, en naviguant sur internet, il est aujourd'hui possible de déterminer le sexe de son futur enfant contre une somme d'argent (http://www.medgadget.com/2005/06/baby_gender_men.html, consulté le 1^{er} septembre 2014). Les sociétés marchandes proposant ces services n'ont aucun objectif médical, et se chargent même, si le sexe de l'enfant n'était pas celui trouvé par le test, de rembourser le client à 200% (82). Il est aussi possible de réaliser un test de paternité sur un prélèvement de la mère, ce qui montre que ces sociétés sont dotées de capacités techniques importantes.

En considérant que la finalité du test est une possible interruption de la grossesse en cas de résultat « inattendu », la démocratisation du DPNNI doit se faire poser la question de l'éthique d'une telle pratique.

En France, la sélection du sexe ou le test de paternité sur le fœtus sont interdits. Dans certains pays, comme la Chine, cette sélection prénatale pourrait être à l'origine d'une véritable redistribution démographique ainsi que d'une nouvelle forme de discrimination.

Au final, afin d'éviter les dérives eugénistes et de pouvoir garantir aux patientes un diagnostic fiable dans le strict cadre médical, il serait souhaitable que le DPNNI puisse avoir lieu dans un nombre limité de centres de biologies spécialisés, dûment équipés (matériels et infrastructures) et composés de praticiens rigoureux, habilités et expérimentés dans la gestion, la technique et l'interprétations des techniques et résultats de diagnostic prénatal.

Conclusions

ISPB - FACULTE DE PHARMACIE

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : M Jean-Baptiste Campergue

Le principal inconvénient du diagnostic prénatal (DPN) « traditionnel » est que son prélèvement invasif peut être générateur de fausses couches (0.5 à 1%). La découverte en 1997 de l'ADN foetal circulant dans le sang maternel dès le début de la grossesse a ouvert la voie au diagnostic prénatal non invasif. La détermination du sexe foetal pour les maladies liées à l'X et dans les grossesses à risque d'hyperplasie congénitale des surrénales a représenté la première application clinique car elle repose sur la recherche d'une séquence d'ADN normalement absente du plasma maternel : le chromosome Y. Le but de notre travail de thèse consistait à mettre au point le test de dépistage non-invasif du sexe foetal, appelé communément « test SRY » aux Hospices Civils de Lyon en vue d'une utilisation ultérieure en routine.

Cliniquement parlant, le diagnostic de sexe foetal doit être fait avant 10 semaines d'aménorrhées pour les maladies liées à l'X (pour prévoir un DPN « traditionnel » en cas de foetus masculin) et avant 9 semaines d'aménorrhées au plus tard pour l'hyperplasie congénitale des surrénales afin de pouvoir initier le plus rapidement possible un traitement à la dexaméthasone en cas de foetus féminin pour éviter sa virilisation. En France, les recommandations d'experts prévoient un test SRY fiable à partir de 6,5 semaines d'aménorrhées.

En nous inspirant d'une revue assez exhaustive de la littérature, nous avons mis au point 2 PCR en temps réel, une en technique « Taqman » et une avec une technique de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET), ciblées respectivement sur la séquence répétée *DYS14* du chromosome Y et sur le gène *SRY*. Pour valider notre technique, 49 sérums de femmes enceintes (entre 5,14 et 38 semaines d'aménorrhées ; médianes 7,9) ont été collectés. Le résultat du test SRY sur nos deux techniques a été comparé au sexe réel de l'enfant.

Les 20 sérums de grossesses « féminines » ont tous donné, comme attendu, une absence de signal PCR dans les deux techniques, soit une spécificité de 100%. Sur les 23 prélèvements de grossesses « masculines », 22 ont été correctement interprétés (signal PCR positif dans au moins une technique). Un faux négatif a été obtenu sur un sérum, qui avait été prélevé très tôt pendant la grossesse (5,14 semaines d'aménorrhées). A partir de 5,43 semaines d'aménorrhées, la sensibilité devenait en revanche de 100% dans notre étude.

Notre test répond donc parfaitement aux préconisations d'experts puisqu'il montre une sensibilité et une spécificité de 100% à partir de 6,5 semaines d'aménorrhées. Le test mis au point lors de ce travail apparaît donc apte à une utilisation en routine.

Depuis la découverte de l'ADN plasmatique en 1997, le diagnostic prénatal non invasif a connu une avancée exceptionnelle. Jusqu'alors réservée à de grands laboratoires privés internationaux, l'exploration de l'ADN fœtal plasmatique peut être utilisée en routine par les grands centres hospitalo-universitaires. La détermination du sexe fœtal dans le sang maternel en est une des applications les plus simples à mettre en place. C'est la raison pour laquelle ce travail constitue le premier aboutissement du projet coordonné mis en place sur le diagnostic prénatal non invasif aux Hospices Civils de Lyon.

Dans quelques années, il est vraisemblable que l'ensemble des diagnostics prénataux génétiques seront disponibles de façon non invasive, permettant de diminuer massivement le risque de fausse couche lié au prélèvement. Malgré la démocratisation de ces techniques, et pour des raisons éthiques, le DPNNI devra être réalisé dans un nombre limité de centres de biologie spécialisés, dûment équipés et possédant une importante expérience de diagnostic prénatal.

Le Président de la thèse,
Nom :

Signature :

**P/ La Directrice et par déléation
La directrice adjointe
Pr. Stéphanie BRIANCON**



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le
Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Annexes

Annexe1 – Avis consultatif du CPP Sud Est IV sur l'étude « Diagnostic prénatal non invasif à partir de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel : étude faisabilité et de mise au point technique au CHU de Lyon ».

Comité de Protection des Personnes SUD-EST IV

Centre Léon Bérard – 28 rue Laennec – 69373 LYON CEDEX 08

Président : Dr. David PEROL - Vice-président : Mme Pascale CHIFFE-COSTANZO
Secrétaire général : Dr. Daniel ESPINOUSE

Professeur Damien SANLAVILLE
Service Cytogénétique Constitutionnelle
Groupement Hospitalier EST
Centre de Biologie et Pathologie Est
59 boulevard Pinel
69677 BRON CEDEX

Lyon, le 25 avril 2013

N/Réf. : L13-50

Objet : Demande d'avis

Monsieur,

Le Comité a bien reçu les 5 et 19 avril 2013 votre demande relative à un projet de recherche intitulé "**Diagnostic prénatal non invasif à partir de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel : étude de faisabilité et de mise au point technique au CHU de Lyon**".

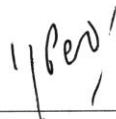
Il s'agit d'une étude dont l'objectif est de mettre au point et optimiser des protocoles dont le but est d'établir un diagnostic prénatal non invasif à partir de l'extraction d'ADN fœtal circulant dans le sang maternel. Cette étude va consister en un prélèvement sanguin supplémentaire au cours d'un bilan programmé chez une population de femmes enceintes ciblées. Le transfert en diagnostic de ces techniques validées en recherche est un enjeu important puisqu'elles permettraient d'éviter les fausses couches liées au prélèvement invasif réalisé dans le cadre d'un diagnostic prénatal.

Le Comité a examiné votre demande au cours de ses séances des 9 et 23 avril 2013. Au vu des informations fournies, il considère que cette étude est non interventionnelle et ne nécessite pas l'avis d'un CPP pour être conduite en France.

Cet avis n'est que consultatif et n'a donc pas de valeur légale.

Membres présents à la séance : Dr. D. ESPINOUSE, Mme M. MONTANGE, Dr. D. PEROL, Mme N. FALETTE, Mme R. MARAVAL-GAGET (Personnes qualifiées "Recherche Biomédicale") ; Dr. M. LE GAL (Médecin généraliste) ; Mme C. STAMM (Pharmacien) ; Mme C. KAPITZ (Personne qualifiée "Ethique") ; Mme S. GANDREAU (Personne qualifiée "Juridique") ; Dr. D. AZOULAY, Mme C. FABRY (Représentants d'associations de malades et d'usagers de la santé).

Le président de séance,
Dr. David PEROL



Secrétariat : Odette MARITAZ

☎ 04 78 78 27 61 - ☎ 04 78 78 28 58 - E-mail : odette.maritaz@lyon.unicancer.fr

LETTRE D’INFORMATION AU PATIENT

Etude « Diagnostic prénatal non invasif à partir de l’ADN fœtal circulant dans le sang maternel : étude de faisabilité et de mise au point technique au CHU de Lyon »

Lisez attentivement cette notice et posez toutes les questions qui vous semblent utiles. Vous pourrez alors décider si vous voulez participer à cette recherche ou non.

Madame,

Vous avez été sollicitée pour participer à l’étude intitulée « **Diagnostic prénatal non invasif à partir de l’ADN fœtal circulant dans le sang maternel** », supervisée par le Professeur Damien Sanlaville.

- **Quel est l’objectif de cette étude ?**

- Dans certaines grossesses à risque de maladie génétique, il est nécessaire de réaliser un diagnostic prénatal génétique. Celui-ci nécessite au préalable le recueil de matériel génétique du fœtus par un prélèvement invasif comme l’amniocentèse ou la biopsie de trophoblaste. Ce prélèvement comporte un risque de fausse-couche. Les avancées technologiques ont permis le développement de méthodes non invasives de diagnostic prénatal, à partir d’ADN du fœtus présent dans le sang maternel. Ces tests permettent notamment de déterminer le sexe fœtal (important dans la prise en charge des maladies génétiques « liées au chromosome X » comme l’hémophilie), de faire le diagnostic de déficit en 21-hydroxylase (maladie génétique entraînant une virilisation des foetus féminin), de faire le diagnostic de trisomie 21 ou de rechercher une incompatibilité plaquettaire entre la mère et le fœtus (pouvant entraîner des hémorragies fœtales graves). **Notre objectif est de mettre au point ces tests au CHU de Lyon.**

- Néanmoins, avant leur transfert en diagnostic, ces tests nécessitent des mises au point minutieuses à partir d’échantillons plasmatiques de femmes enceintes, afin d’adapter au mieux les protocoles utilisés. C’est le but de cette étude de faisabilité et de mise au point technique pour laquelle nous sollicitons votre concours.

Aucune autre analyse, biochimique ou génétique, ne sera effectuée lors de cette étude. L’échantillon de sang ne sera pas conservé après l’étude.

- **Que va-t-on me demander de faire ?**

- **Il n’y a pas de consultation ni de prise de sang supplémentaire du fait de l’étude.** Seuls deux tubes de sang de 7 mL supplémentaire vous seront prélevés lors d’un bilan sanguin normalement prévu dans le cadre du suivi de votre grossesse.
- **Le suivi et la prise en charge de votre grossesse ne seront en rien changés par votre participation à l’étude.**

- **Qui aura accès au résultat de l’étude ?**

- **Personne, en-dehors des organisateurs de l’étude.**

Le résultat du test ne vous sera pas communiqué puisqu’il s’agit d’une mise au point technique.

Vos données personnelles seront anonymisées.

- **Quels sont mes droits ?**

- **Vous êtes libre d’accepter ou de refuser.** Cela ne changera ni votre prise en charge ni le suivi de la grossesse. De même, vous pouvez retirer votre consentement à tout moment, quelles que soient vos raisons. Le fait de ne plus participer à cette recherche ne portera pas atteinte à vos relations avec le médecin.

Nous vous sommes très reconnaissants de l’aide que vous apportez ainsi à la Recherche Médicale.

**Diagnostic prénatal non invasif à partir de l'ADN fœtal circulant
dans le sang maternel:
étude de faisabilité et de mise au point technique au CHU de Lyon**

Responsable de l'étude : Professeur Damien Sanlaville, Service Laboratoire de Cytogénétique Constitutionnelle,
Centre de Biologie et de Pathologie Est, 6° étage, 59, Bd Pinel 69677 Bron Cedex
tél : 04.72.12.96.39

Je soussignée, Mme, Mlle (*Rayer la mention inutile*) :

Nom : Prénom :

Date de naissance : Adresse :

.....

déclare avoir pris connaissance de la notice d'information et avoir bien compris les bénéfices, risques et déroulement de l'étude qui m'ont été précisés par le Pr /Dr
concernant l'étude ci-dessus mentionnée et à laquelle j'accepte de participer.

Il m'a été précisé que je suis libre d'accepter ou de refuser de participer à cette recherche, sans que cela ne modifie mes relations avec l'équipe médicale. Je pourrai, à tout moment, si je le désire, interrompre ma participation en le signalant au médecin chargé de cette étude, sans encourir la moindre responsabilité et sans aucun préjudice pour la qualité des soins qui me sont prodigués.

Je certifie être actuellement bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale.

Mon consentement ne décharge pas les responsables de la recherche de leurs responsabilités. Je conserve tous mes droits garantis par la loi. Pour tout complément d'information ou pour signaler la survenue d'un événement éventuellement indésirable, je peux contacter le médecin chargé de l'étude.

Cette étude a reçu un avis favorable du Comité de Protection des Personnes (...) en date du ...

Les données qui me concernent collectées au cours de cette étude resteront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation que par des personnes qui collaborent à la recherche ; toutes ces personnes étant soumises au secret professionnel.

J'ai reçu copie du présent document, ai été informé (e) qu'une copie serait conservée dans le dossier médical et une autre par le Professeur Damien Sanlaville, et j'y consens.

Je consens à participer à la recherche (loi 2004-806 du 9 août 2004) c'est-à-dire au prélèvement de 2 tubes de sang (au total 10 à 15 mL) et à ce que ce prélèvement donne lieu par la suite à une caractérisation génétique (Code Civil). **J'ai bien compris qu'aucun résultat ne me sera communiqué puisque cette étude porte sur une mise au point technique.**

Les produits biologiques restants seront détruits au terme de cette étude.

L'investigateur

Fait à

Le | | | | |

Signature de l'investigateur


Le (La) participant(e)

Fait à

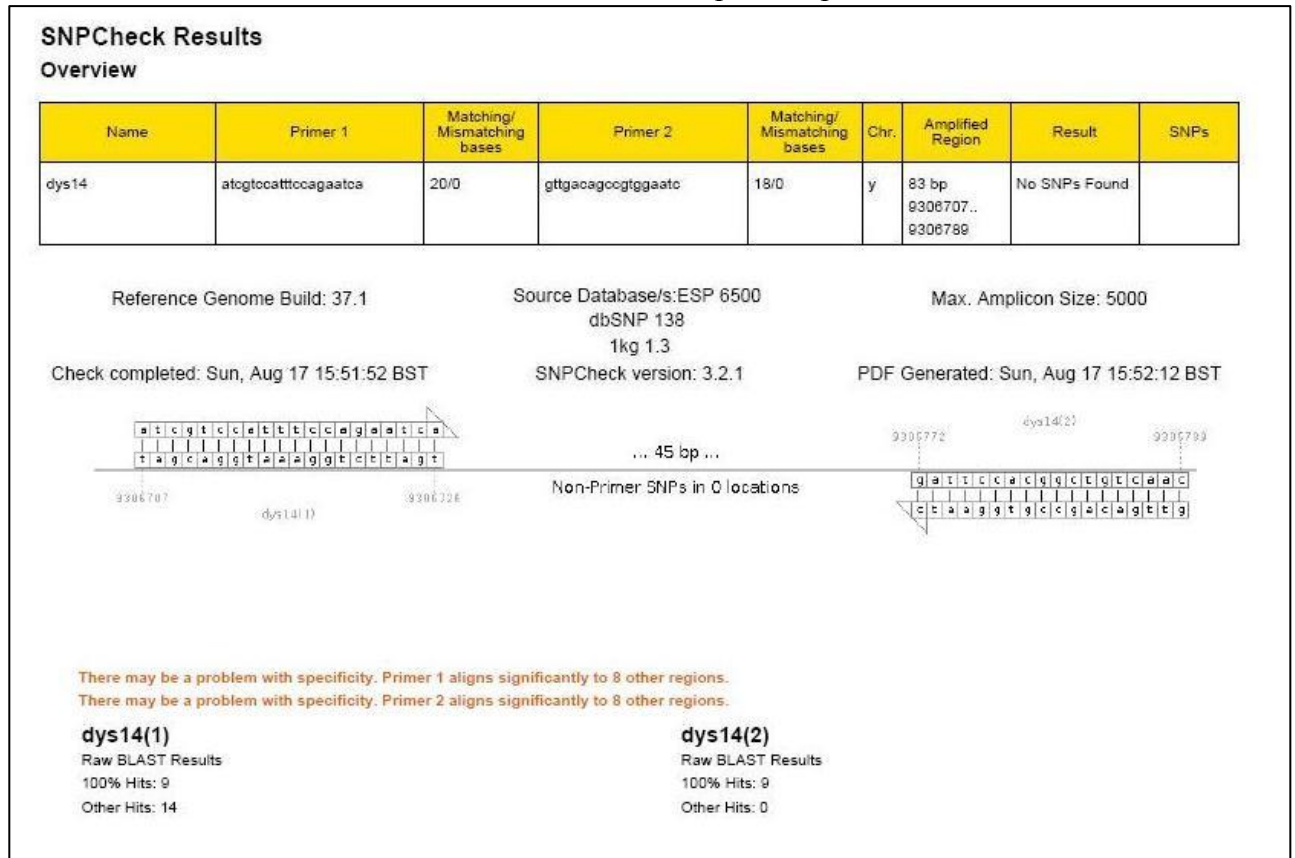
Le | | | | |

Signature du (de la) participant (e)

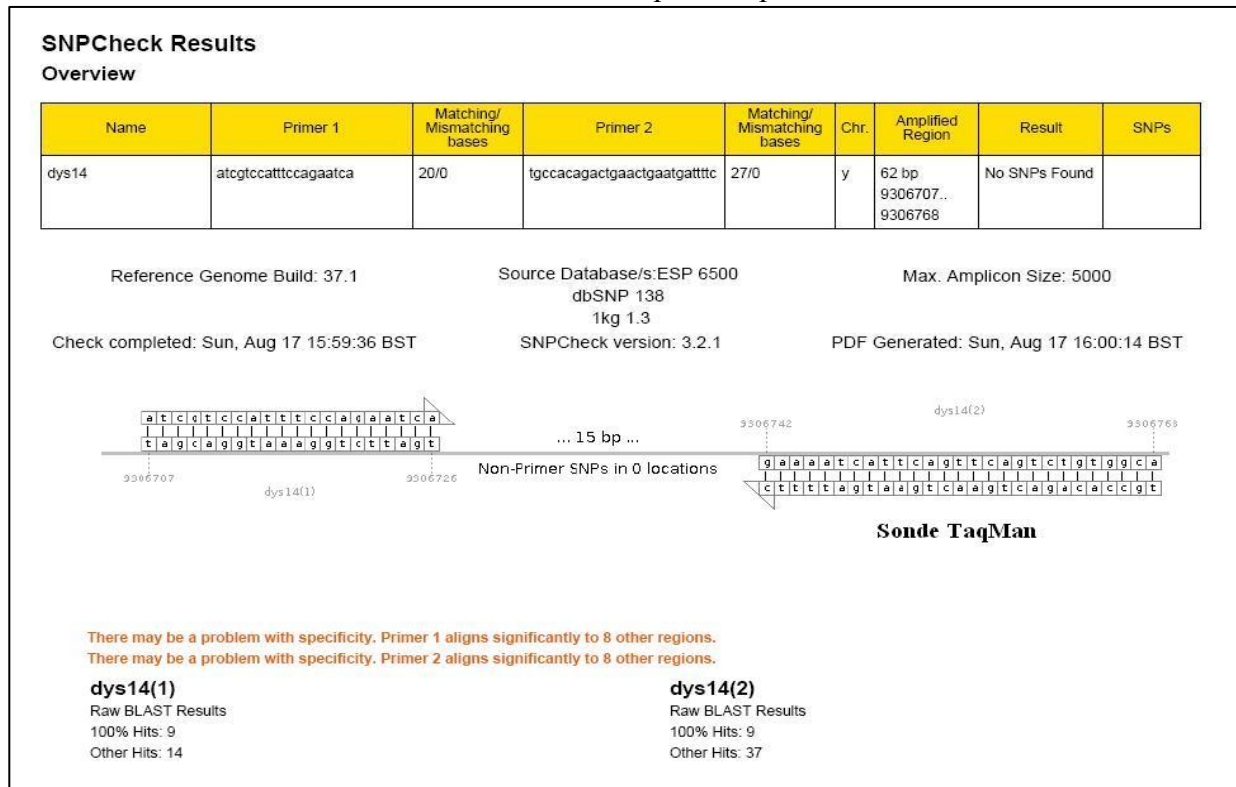
version 1 du 05/04/13

<h2>Étude « Diagnostic pré-natal de sexe sur sang maternel »</h2> <p>Etude de faisabilité</p>	 <p>Hôpitaux de Lyon</p>
<p>Dans le cadre de l'étude « Diagnostic pré-natal de sexe sur sang maternel », nous sollicitons votre laboratoire.</p>	A REMETTRE AU LABORATOIRE LORS DU PRELEVEMENT
<p>Etape 1 : renseignements sur la patiente</p>	<p>Etape 3 : contacter HEH</p>
<p>Nom de la patiente :</p> <p>Prénom :</p> <p>Date de naissance :/...../.....</p> <p>Date des dernières règles (SA) :/...../.....</p>	<p>✓ Une fois le prélèvement effectué, vous pouvez nous contacter par mail de préférence ou par téléphone.</p> <p>✓ Nous viendrons chercher le prélèvement</p>
<p>Etape 2 : prélèvement</p>	<p>Dr Philippe Joly Coordonateur de l'étude Laboratoire Pathologies de l'Hémoglobine Hôpital Edouard Herriot, Lyon philippe.joly@chu-lyon.fr 06 19 86 01 85</p>
<p>✓ Prélever 1 tube sec avec gel séparateur 5 mL (bouchon jaune) ✓ A défaut, prélever 2 tubes secs (bouchon rouge)</p> <p>Centrifuger le tube et mettre au frigo</p>	<p>Jean-Baptiste Campergue Interne Hôpital Edouard Herriot, Lyon jean-baptiste.campergue@chu-lyon.fr 06 23 64 79 44</p>

Annexe 5 – Contrôle des SNP sur les amorces utilisées pour amplifier DYS14



Annexe 6 - Contrôle des SNP sur la sonde utilisée pour amplifier DYS14



Annexe 7 - Contrôle des SNP sur les amorces utilisées pour amplifier SRY

SNPCheck Results

Overview

Name	Primer 1	Matching/ Mismatching bases	Primer 2	Matching/ Mismatching bases	Chr.	Amplified Region	Result	SNPs
sry	GGCAACGTCAGGATAG AGTGA	22/0	tgctgatctctgagtttcgatt	23/0	y	115 bp 2655371.. 2655485	SNPs found in 3 locations	rs10489495 7 rs10489497 0 rs10489495 9

Reference Genome Build: 37.1

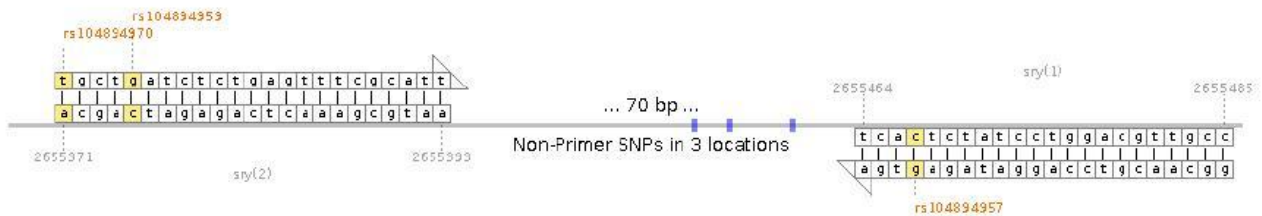
Source Database/s:ESP 6500
dbSNP 138
1kg 1.3

Max. Amplicon Size: 5000

Check completed: Sun, Aug 17 19:51:12 BST

SNPCheck version: 3.2.1

PDF Generated: Sun, Aug 17 19:51:52 BST



Annexe 8 – Contrôle des SNP sur les sondes utilisées pour amplifier SRY

SNPCheck Results

Overview

Name	Primer 1	Matching/ Mismatching bases	Primer 2	Matching/ Mismatching bases	Chr.	Amplified Region	Result	SNPs
sry	CATGAACGCATTCATCGT GTGGTCTC	26/0	agagccatcttgcgcctctgatcg	24/0	y	51 bp 2655406.. 2655456	SNPs found in 3 locations	rs10489496 5 rs10489496 8 rs10489496 9

Reference Genome Build: 37.1

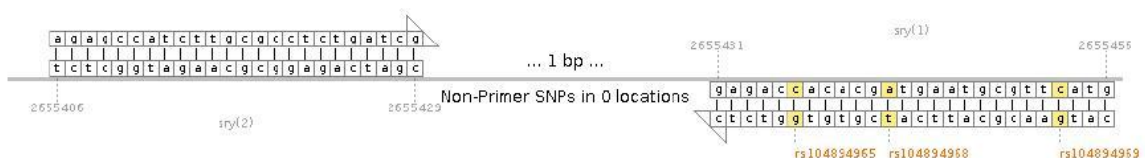
Source Database/s:ESP 6500
dbSNP 138
1kg 1.3

Max. Amplicon Size: 5000

Check completed: Sun, Aug 17 20:07:42 BST

SNPCheck version: 3.2.1

PDF Generated: Sun, Aug 17 20:09:07 BST



sry(2)

Raw BLAST Results
100% Hits: 1
Other Hits: 2

sry(1)

Raw BLAST Results
100% Hits: 1
Other Hits: 0

Annexe 9 – Contrôle de la spécificité par un blaste de la séquence amplifiée sur DYS 14

Primer-BLAST Primer-Blast results

► NCBI/Primer-BLAST: results: Job id=Vk2qC4D8yc4CjwGXSpOeEYFPGVIGfS [more...](#)

Primer pair 1	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATCGTCCATTCCAGAATCA	20	54.43	40.00	4.00	1.00
Reverse primer	GTTGACAGCCGTGGAATC	18	56.12	55.56	4.00	3.00

Products on target templates

>NC_000024.10 Homo sapiens chromosome Y, GRCh38 Primary Assembly

product length = 83
Features associated with this product:
[testis-specific Y-encoded protein 10](#)

Forward primer 1 ATCGTCCATTCCAGAATCA 20
Template 9530025 9530044

Reverse primer 1 GTTGACAGCCGTGGAATC 18
Template 9530107 9530090

product length = 83
Features flanking this product:
40897 bp at 5' side: [testis-specific Y-encoded protein 1 isoform TSPY-S](#)
18131 bp at 3' side: [testis-specific Y-encoded protein 10](#)

Forward primer 1 ATCGTCCATTCCAGAATCA 20
Template 9509712 9509731

Reverse primer 1 GTTGACAGCCGTGGAATC 18
Template 9509794 9509777

product length = 83
Features flanking this product:
20615 bp at 5' side: [testis-specific Y-encoded protein 1 isoform TSPY-S](#)
38413 bp at 3' side: [testis-specific Y-encoded protein 10](#)

Forward primer 1 ATCGTCCATTCCAGAATCA 20
Template 9489430 9489449

Reverse primer 1 GTTGACAGCCGTGGAATC 18
Template 9489512 9489495

product length = 83
Features associated with this product:
[testis-specific Y-encoded protein 1 isoform TSPY-L](#)

Forward primer 1 ATCGTCCATTCCAGAATCA 20
Template 9469098 9469117

Reverse primer 1 GTTGACAGCCGTGGAATC 18
Template 9469180 9469163

product length = 83
Features associated with this product:
[testis-specific Y-encoded protein 3](#)

Forward primer 1 ATCGTCCATTCCAGAATCA 20
Template 9400566 9400585

product length = 83
Features flanking this product:
20563 bp at 5' side: [testis-specific Y-encoded protein 8 isoform X1](#)
18164 bp at 3' side: [testis-specific Y-encoded protein 3](#)

Forward primer 1 ATCGTCCATTCCAGAATCA 20
Template 9380220 9380239

Reverse primer 1 GTTGACAGCCGTGGAATC 18
Template 9380302 9380285

product length = 83
Features associated with this product:
[testis-specific Y-encoded protein 8](#)

Forward primer 1 ATCGTCCATTCCAGAATCA 20
Template 9359942 9359961

Reverse primer 1 GTTGACAGCCGTGGAATC 18
Template 9360024 9360007

product length = 83
Features associated with this product:
[testis-specific Y-encoded protein 4](#)

Forward primer 1 ATCGTCCATTCCAGAATCA 20
Template 9339627 9339646

Reverse primer 1 GTTGACAGCCGTGGAATC 18
Template 9339709 9339692

product length = 83
Features associated with this product:
[testis-specific Y-encoded protein 2](#)

Forward primer 1 ATCGTCCATTCCAGAATCA 20
Template 6248362 6248381

Reverse primer 1 GTTGACAGCCGTGGAATC 18
Template 6248444 6248427

product length = 83
Features flanking this product:
20455 bp at 5' side: [testis-specific Y-encoded protein 10 isoform X1](#)
3159170 bp at 3' side: [probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y](#)

Forward primer 1 ATCGTCCATTCCAGAATCA 20
Template 9550195 ..A..... 9550214

Reverse primer 1 GTTGACAGCCGTGGAATC 18
Template 9550277A..... 9550260

>AC_000156.1 Homo sapiens chromosome Y, alternate assembly HuRef, whole genome shotgun sequence

product length = 83
Features flanking this product:
1012757 bp at 5' side: [uncharacterized protein LOC101930512](#)
842457 bp at 3' side: [uncharacterized protein LOC648761](#)

Forward primer 1 ATCGTCCATTCCAGAATCA 20
Template 6730699 ..A..... 6730718

Reverse primer 1 GTTGACAGCCGTGGAATC 18
Template 6730781A..... 6730764

Annexe 10 – Contrôle de la spécificité par un blaste de la séquence amplifiée sur SRY

Primer pair 1		Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer		GGCAACGTCCAGGATAGAGTGA	22	61.79	54.55	5.00	1.00
Reverse primer		TGCTGATCTCTGAGTTTCGCATT	23	60.62	43.48	7.00	1.00
Products on target templates							
>NC_000024.10 Homo sapiens chromosome Y, GRCh38 Primary Assembly							
product length = 115							
Features associated with this product:							
sex-determining region Y protein							
Forward primer	1	GGCAACGTCCAGGATAGAGTGA	22				
Template	2787444	2787423				
Reverse primer	1	TGCTGATCTCTGAGTTTCGCATT	23				
Template	2787330	2787352				
>AC_000156.1 Homo sapiens chromosome Y, alternate assembly HuRef, whole genome shotgun sequence							
product length = 115							
Features associated with this product:							
sex-determining region Y protein							
Forward primer	1	GGCAACGTCCAGGATAGAGTGA	22				
Template	8489	8468				
Reverse primer	1	TGCTGATCTCTGAGTTTCGCATT	23				
Template	8375	8397				

Références bibliographiques

1. Mujezinovic F, Alfircvic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2007 Sep;110(3):687–94.
2. O Lapaire WH. Georg Schmorl on trophoblasts in the maternal circulation. *Placenta.* 2007;28(1):1–5.
3. Attwood HD, Park WW. Embolism to the Lungs by Trophoblast. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* 1961 Aug 1;68(4):611–7.
4. Walknowska J, Conte F, Grumbach M. PRACTICAL AND THEORETICAL IMPLICATIONS OF FETAL/MATERNAL LYMPHOCYTE TRANSFER. *The Lancet.* 1969 Jun;293(7606):1119–22.
5. Schröder J, Chapelle A de la. Fetal Lymphocytes in the Maternal. *Blood.* 1972 Feb 1;39(2):153–62.
6. Selypes A, Lorencz R. A noninvasive method for determination of the sex and karyotype of the fetus from the maternal blood. *Hum Genet.* 1988 Aug;79(4):357–9.
7. Herzenberg LA, Bianchi DW, Schroder J, Cann HM, Iverson GM. Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Mar;76(3):1453–5.
8. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JH, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 May;87(9):3279–83.
9. Steele CD, Wapner RJ, Smith JB, Haynes MK, Jackson LG. Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal peripheral blood: a review. *Clin Obstet Gynecol.* 1996 Dec;39(4):801–13.
10. Bohmer RM. Fetal cells from maternal blood: purpose, biological questions, technical challenges. *Intervirol.* 1998;41(4-5):226–31.
11. Bianchi DW. From Michael to microarrays: 30 years of studying fetal cells and nucleic acids in maternal blood. *Prenat Diagn.* 2010 Jul;30(7):622–3.
12. Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis using fetal cells in maternal blood. *J Clin Pathol.* 1994 Dec;47(12):1060–5.
13. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997 Aug 16;350(9076):485–7.
14. Lo YMD, Chan KCA, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FMF, et al. Maternal plasma

- DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*. 2010 Dec 8;2(61):61ra91.
15. Dennis Lo YM, Chiu RWK. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nat Rev Genet*. 2007 Jan;8(1):71–7.
 16. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. 1998 Apr;62(4):768–75.
 17. Chiu RWK. Noninvasive prenatal testing by maternal plasma DNA analysis: Current practice and future applications. *Scand J Clin Lab Investig Suppl*. 2014;74(244):48–53.
 18. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*. 1999 Jan;64(1):218–24.
 19. Invernizzi P, Biondi ML, Battezzati PM, Perego F, Selmi C, Cecchini F, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Hum Genet*. 2002 Jun;110(6):587–91.
 20. Rijnders RJP, Christiaens GCML, Soussan AA, van der Schoot CE. Cell-free fetal DNA is not present in plasma of nonpregnant mothers. *Clin Chem*. 2004 Mar;50(3):679–681; author reply 681.
 21. Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouannic JM, Ernault P, Dumez Y. First trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Gynécologie Obstétrique Fertil*. 2002 Dec;30(12):953–7.
 22. Cremonesi L, Galbiati S, Foglieni B, Smid M, Gambini D, Ferrari A, et al. Feasibility study for a microchip-based approach for noninvasive prenatal diagnosis of genetic diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Jun;1022:105–12.
 23. Birch L, English CA, O’Donoghue K, Barigye O, Fisk NM, Keer JT. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem*. 2005 Feb;51(2):312–20.
 24. Benachi A, Steffann J, Gautier E, Ernault P, Olivi M, Dumez Y, et al. Fetal DNA in maternal serum: does it persist after pregnancy? *Hum Genet*. 2003 Jul;113(1):76–9.
 25. Smid M, Galbiati S, Vassallo A, Gambini D, Ferrari A, Viora E, et al. No evidence of fetal DNA persistence in maternal plasma after pregnancy. *Hum Genet*. 2003 May;112(5-6):617–8.
 26. Chan KCA, Zhang J, Hui ABY, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2004 Jan;50(1):88–92.
 27. Chan KCA, Yeung S-W, Lui W-B, Rainer TH, Lo YMD. Effects of preanalytical

- factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem*. 2005 Apr;51(4):781–4.
28. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. *Clin Chem*. 2010 Aug;56(8):1279–86.
29. Yu SCY, Chan KCA, Zheng YWL, Jiang P, Liao GJW, Sun H, et al. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jun 10;111(23):8583–8.
30. Lui YYN, Chik K-W, Chiu RWK, Ho C-Y, Lam CWK, Lo YMD. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem*. 2002 Mar;48(3):421–7.
31. Lui YYN, Woo K-S, Wang AYM, Yeung C-K, Li PKT, Chau E, et al. Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. *Clin Chem*. 2003 Mar;49(3):495–6.
32. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn*. 2007 May;27(5):415–8.
33. Chiu RWK, Lo YMD. Clinical applications of maternal plasma fetal DNA analysis: translating the fruits of 15 years of research. *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC*. 2013 Jan;51(1):197–204.
34. Arnold DM, Smith JW, Kelton JG. Diagnosis and management of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfus Med Rev*. 2008 Oct;22(4):255–67.
35. Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chow KCK, Chui DHK, Lo YMD. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet*. 2002 Sep 28;360(9338):998–1000.
36. Ding C, Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chan L, Chan AYY, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of beta-thalassemia by mass spectrometric analysis of fetal DNA in maternal plasma. *Am J Hum Genet*. 2003 Nov;73(5).
37. Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y, Lau VYM, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 23;105(51):20458–63.
38. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 21;105(42):16266–71.
39. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich

- M, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2011 Nov;13(11):913–20.
40. Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Mar;204(3):205.e1–11.
 41. Chiu RWK, Akolekar R, Zheng YWL, Leung TY, Sun H, Chan KCA, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ*. 2011;342:c7401.
 42. Levine RJ, Qian C, Leshane ES, Yu KF, England LJ, Schisterman EF, et al. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Mar;190(3):707–13.
 43. Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *JAMA J Am Med Assoc*. 2011 Aug 10;306(6):627–36.
 44. Costa J-M, Benachi A, Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *N Engl J Med*. 2002 May 9;346(19):1502.
 45. Wright CF, Wei Y, Higgins JPT, Sagoo GS. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. *BMC Res Notes*. 2012;5:476.
 46. Efrat Z, Perri T, Ramati E, Tugendreich D, Meizner I. Fetal gender assignment by first-trimester ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2006 Jun;27(6):619–21.
 47. Hsiao CH, Wang HC, Hsieh CF, Hsu JJ. Fetal gender screening by ultrasound at 11 to 13(+6) weeks. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008;87(1):8–13.
 48. Mazza V, Di Monte I, Pati M, Contu G, Ottolenghi C, Forabosco A, et al. Sonographic biometrical range of external genitalia differentiation in the first trimester of pregnancy: analysis of 2593 cases. *Prenat Diagn*. 2004 Sep;24(9):677–84.
 49. Tardy V. Management of pregnancies at risk of 21-hydroxylase or 11-hydroxylase deficiency using fetal sex determination in maternal serum proposed in France since 2002: how to limit prenatal exposure to dexamethasone. *Horm Res*. 2009;70(suppl 3):348.
 50. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med*. 2003 Aug 21;349(8):776–88.
 51. Forest MG, Morel Y, David M. Prenatal Treatment of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Trends Endocrinol Metab*. 1998 Jan 9;9(7):284–9.

52. New MI, Carlson A, Obeid J, Marshall I, Cabrera MS, Goseco A, et al. Prenatal diagnosis for congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Dec;86(12):5651–7.
53. Hirvikoski T, Nordenström A, Lindholm T, Lindblad F, Ritzén EM, Wedell A, et al. Cognitive functions in children at risk for congenital adrenal hyperplasia treated prenatally with dexamethasone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Feb;92(2):542–8.
54. Morel Y, Tardy V, Costa J-M, Forest MG, David M. [21 hydroxylase deficiency: new strategies emerging from molecular studies]. *Ann Endocrinol.* 2003 Dec;64(6):456–70.
55. Tardy-Guidollet V, Menassa R, Costa J-M, David M, Bouvattier-Morel C, Baumann C, et al. New management strategy of pregnancies at risk of congenital adrenal hyperplasia using fetal sex determination in maternal serum: French cohort of 258 cases (2002-2011). *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Apr;99(4):1180–8.
56. Hyett JA, Gardener G, Stojilkovic-Mikic T, Finning KM, Martin PG, Rodeck CH, et al. Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy. *Prenat Diagn.* 2005 Dec;25(12):1111–6.
57. Martinhago CD, de Oliveira RM, Tomitão Canas M do C, Vagnini LD, Alcantara Oliveira JB, Petersen CG, et al. Accuracy of fetal gender determination in maternal plasma at 5 and 6 weeks of pregnancy. *Prenat Diagn.* 2006 Dec;26(13):1219–23.
58. Deng Z, Wu G, Li Q, Zhang X, Liang Y, Li D, et al. Noninvasive genotyping of 9 Y-chromosome specific STR loci using circulatory fetal DNA in maternal plasma by multiplex PCR. *Prenat Diagn.* 2006 Apr;26(4):362–8.
59. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Direct quantification of fetal cells in maternal blood by real-time PCR. *Prenat Diagn.* 2006 Sep;26(9):850–4.
60. Boon EMJ, Schlecht HB, Martin P, Daniels G, Vossen RHAM, den Dunnen JT, et al. Y chromosome detection by Real Time PCR and pyrophosphorolysis-activated polymerisation using free fetal DNA isolated from maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2007 Oct;27(10):932–7.
61. Liu F-M, Wang X-Y, Feng X, Wang W, Ye Y-X, Chen H. Feasibility study of using fetal DNA in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007;86(5):535–41.
62. Bustamante-Aragones A, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Trujillo-Tiebas MJ, Diego-Alvarez D, Vallespin E, et al. Foetal sex determination in maternal blood from the seventh week of gestation and its role in diagnosing haemophilia in the foetuses of female carriers. *Haemoph Off J World Fed Hemoph.* 2008 May;14(3):593–8.

63. Vecchione G, Tomaiuolo M, Sarno M, Colaizzo D, Petraroli R, Matteo M, et al. Fetal sex identification in maternal plasma by means of short tandem repeats on chromosome x. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Aug;1137:148–56.
64. Wagner J, Dzijan S, Pavan-Jukić D, Wagner J, Lauc G. Analysis of multiple loci can increase reliability of detection of fetal Y-chromosome DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2008 May;28(5):412–6.
65. Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaidis K, Holzgreve W, Hahn S. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2005 Sep;51(9):1598–604.
66. Illanes S, Denbow ML, Smith RP, Overton TG, Soothill PW, Finning K. Detection of cell-free fetal DNA in maternal urine. *Prenat Diagn.* 2006 Dec;26(13):1216–8.
67. Davalieva K, Dimcev P, Efremov GD, Plaseska-Karanfilska D. Non-invasive fetal sex determination using real-time PCR. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet.* 2006 Jun;19(6):337–42.
68. Chiu RW, Poon LL, Lau TK, Leung TN, Wong EM, Lo YM. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem.* 2001 Sep;47(9):1607–13.
69. Daniels G, Finning K, Martin P, Summers J. Fetal blood group genotyping: present and future. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Sep;1075:88–95.
70. Benachi A, Delahaye S, Leticee N, Jouannic J-M, Ville Y, Costa J-M. Impact of non-invasive fetal RhD genotyping on management costs of rhesus-D negative patients: results of a French pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012 May;162(1):28–32.
71. Finning K, Martin P, Daniels G. A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Jun;1022:119–23.
72. Minon J-M, Schaaps J-P, Retz M-C, Dricot J-F, Foidart J-M, Senterre J-M. [Prenatal determination of fetal RHD in maternal plasma: two-years experience of routine clinical use]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod.* 2005 Sep;34(5):448–53.
73. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol.* 2012 May;119(5):890–901.
74. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem.* 2014 May 24;

75. Shen Y, Yan Y, Liu Y, Zhang S, Yang D, Zhang P, et al. A significant effect of the TSPY1 copy number on spermatogenesis efficiency and the phenotypic expression of the gr/gr deletion. *Hum Mol Genet.* 2013 Apr 15;22(8):1679–95.
76. Sekizawa A, Kondo T, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Saito H, et al. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2001 Oct;47(10):1856–8.
77. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* 2000 Jun;107(6):766–9.
78. Pertl B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet.* 2000 Jan;106(1):45–9.
79. Chim SSC, Tong YK, Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chan LYS, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 11;102(41):14753–8.
80. Chan KCA, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RWK, Leung TN, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem.* 2006 Dec;52(12):2211–8.
81. De Jong A, Dondorp WJ, de Die-Smulders CEM, Frints SGM, de Wert GMWR. Non-invasive prenatal testing: ethical issues explored. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2010 Mar;18(3):272–7.
82. Bianchi DW. At-Home Fetal DNA Gender Testing: Caveat Emptor. *Obstet Gynecol.* 2006 Feb;107(2, Part 1):216–8.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Jean-Baptiste CAMPERGUE

Mise au point technique de la détermination du sexe foetal dans le sang maternel aux Hospices Civils de Lyon.

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2014, 93 p.

RESUME

La découverte de l'ADN plasmatique en 1997 a ouvert la voie au diagnostic prénatal non invasif, qui permet d'éviter le risque de fausse couche lié au prélèvement invasif.

La détermination du sexe foetal pour les maladies liées à l'X et dans les grossesses à risque d'hyperplasie congénitale des surrénales a représenté la première application clinique car elle repose sur la recherche d'une séquence d'ADN normalement absente du plasma maternel : le chromosome Y. Le but de notre travail de thèse consistait à mettre au point le test de dépistage non-invasif du sexe foetal, appelé communément « test SRY » aux Hospices Civils de Lyon en vue d'une utilisation ultérieure en routine.

En nous inspirant d'une revue assez exhaustive de la littérature, nous avons mis au point 2 techniques de PCR en temps réel, une en technique « Taqman » et une en avec une technique FRET ciblées respectivement sur la séquence répétée DYS14 du chromosome Y et sur le gène SRY. Pour valider notre technique, 49 sérums de femmes enceintes (entre 5,14 et 38 semaines d'aménorrhées ; médianes 7,9) ont été collectés. Le résultat du test SRY sur nos deux techniques a été comparé au sexe réel de l'enfant.

Notre test répond aux préconisations d'experts puisqu'il montre une sensibilité et une spécificité de 100% à partir de 6,5 SA. Le test mis au point lors de ce travail apparaît donc apte à une utilisation en routine.

MOTS CLES

Diagnostic prénatal non invasif
ADN plasmatique
Sexe foetal

JURY

Mme Christine VINCIGUERRA, Professeur
M Damien SANLAVILLE, Professeur
M. Philippe JOLY, Docteur en Pharmacie
M. Jérôme MASSARDIER, Docteur en Médecine

DATE DE SOUTENANCE

Mercredi 1er octobre 2014

ADRESSE DE L'AUTEUR

36 bis rue Saint Antoine – 69003 LYON