



**HAL**  
open science

## Vers une généralisation du diagnostic prénatal non-invasif des maladies monogéniques ? État des lieux et perspectives

Camille Verebi, Victor Gravrand, Mathilde Pacault, Marie-Pierre Audrezet, Nathalie Couque, Marie-Claire Vincent, France Leturcq, Vassilis Tsatsaris, Thierry Bienvenu, Juliette Nectoux

### ► To cite this version:

Camille Verebi, Victor Gravrand, Mathilde Pacault, Marie-Pierre Audrezet, Nathalie Couque, et al.. Vers une généralisation du diagnostic prénatal non-invasif des maladies monogéniques ? État des lieux et perspectives. *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie*, In press, 10.1016/j.gofs.2023.07.005 . hal-04185485

**HAL Id: hal-04185485**

**<https://hal.science/hal-04185485>**

Submitted on 25 Aug 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# **Vers une généralisation du diagnostic prénatal non-invasif des maladies monogéniques ? État des lieux et perspectives**

## **Towards a generalization of non-invasive prenatal diagnosis of single-gene disorders? Assesment and outlook**

Camille Verebi a,b, Victor Gravrand a, Mathilde Pacault c, Marie-Pierre Audrezet c, Nathalie Couque d, Marie-Claire Vincent e, France Leturcq a, Vassilis Tsatsaris f, Thierry Bienvenu a,b, Juliette Nectoux a,\*

a Service de médecine génomique des maladies de système et d'organe, Fédération de génétique et de médecine génomique, AP-HP centre, université Paris Cité, hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France

b Université de Paris Cité, Institute of Psychiatry and Neuroscience of Paris (IPNP), Inserm UMR1266, « Genetic vulnerability to addictive and psychiatric disorders » team, Paris, France

c Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité, centre hospitalier régional universitaire, Brest, France d Service de génétique, AP-HP, hôpital Robert-Debré, 75019 Paris, France

e Génétique moléculaire et cytogénomique, centre hospitalier universitaire de Montpellier, 34000 Montpellier, France

f Gynécologie-obstétrique, Maternité Port-Royal, AP-HP centre, université Paris Cité, hôpital Cochin, 75014 Paris, France

### **Mots clés :**

Diagnostic prénatal non-invasif Maladies monogéniques DPNI-MM ADN circulant ADN foetal circulant cffDNA

**\* Auteur correspondant.**

### **Adresse e-mail**

: JulietteNectoux\*[juliette.nectoux@aphp.fr](mailto:juliette.nectoux@aphp.fr)">JulietteNectoux\*[juliette.nectoux@aphp.fr](mailto:juliette.nectoux@aphp.fr) ()

--

## **Objectifs. –**

Si le dépistage des aneuploïdies foetales et le diagnostic prénatal non-invasif des maladies monogéniques (DPNI-MM) reposent tous deux sur l'étude de l'ADN foetal libre dans la circulation maternelle, leur progression s'est révélée asynchrone. Le développement du DPNI-MM fut plus long, non seulement parce qu'il représente une manne commerciale moins attractive pour les industriels, mais aussi parce qu'il implique le plus souvent la mise au point **de tests sur mesure, spécifiques à chaque variant pathogène.**

## **Méthode. –**

Nous avons réalisé une revue de la littérature du DPNI-MM concernant les différentes indications et technologies impliquées. Nous présentons son implantation actuelle et son développement en France.

## **Résultat. –**

Le DPNI-MM est proposé en routine en France depuis plusieurs années par les laboratoires du réseau français de DPNI-MM, mais reste majoritairement limité à l'exclusion des variants paternels ou de novo, on parle de DPNI d'exclusion. Il est encore difficile d'étudier la transmission de variants maternels à partir de l'analyse de l'ADN libre circulant, du fait de la coexistence et prédominance de séquences d'ADN similaires d'origine maternelle. Différentes stratégies, directes ou indirectes, sont en cours d'évaluation pour établir le statut foetal quelle que soit l'origine parentale de la maladie ou son mode de transmission. L'émergence sur le marché de solutions commerciales de dépistage des maladies monogéniques vient compléter l'arsenal des méthodes d'explorations prénatales de ces maladies.

## **Conclusion. –**

La multitude des technologies et des protocoles proposés peut complexifier les informations délivrées au moment des consultations antenatales mais la maîtrise des connaissances et des enjeux éthiques du DPNI permettra d'assurer un service rendu optimal et une meilleure prise en charge des grossesses à risque de transmission de maladie monogénique.

---

## **Keywords:**

Non-invasive prenatal diagnosis Single-gene disorders SGD-NIPD Cell-free DNA Cell-free fetal DNA

---

## **Objectives. –**

The screening of fetal aneuploidies and non-invasive prenatal diagnosis of monogenic diseases (NIPD-MD) both rely on the study of free fetal DNA in maternal circulation, but their respective rise was unequal. Development of NIPD-MD has taken longer as it represents a less attractive commercial dynamic for industry, but also because it usually involves the **development of tailored tests specific to each pathogenic variant.**

## **Methods. –**

We have carried out a review of the literature on the various indications and technologies involved in the use of NIPD-MM. We present its current implementation and its development **in France.**

## **Results. –**

To date, NIPD-MD has been routinely offered in France for several years by the laboratories of the French NIPD-MD network but remains mostly limited to the exclusion of paternal or de novo variants, the exclusion DPNI-MD. Indeed, it is still difficult to study the transmission of maternal variants from circulating free DNA analysis, due to its biological complexity: coexistence and predominance of similar DNA sequences of maternal origin. Different strategies, either direct or indirect, are being evaluated to establish fetal status regardless of the parental origin of the disease or its transmission mode. The emergence of commercial screening solutions for monogenic diseases complements the arsenal of prenatal exploration **tools for these diseases.**

## **Conclusion. –**

The multitude of existing technologies and protocols may complicate the information provided during antenatal consultations, but mastery of know-how and knowledge of ethical issues of NIPD-MD will ensure optimal service and better management of pregnancies at risk of transmitting monogenic disease.

---

# **1. Introduction**

Les maladies monogéniques à transmission mendélienne regroupent un ensemble de maladies rares et hétérogènes représentant un enjeu de santé publique majeur puisque ce sont près de 3 millions de personnes atteintes par l'une des 8000 maladies rares connues à ce jour en France. Pour la plupart, aucun traitement préventif ou curatif n'est disponible et le diagnostic prénatal tient alors une place clé dans la prise en charge médicale des familles à risque de transmission d'une maladie monogénique incurable et d'une particulière gravité. Avec l'apparition de thérapies innovantes

nécessitant une administration précoce en période néonatale, ou pouvant être proposées dès le stade in utero, le diagnostic prénatal prend une dimension thérapeutique. Les méthodes classiques d'exploration du matériel génétique foetal recourent à des prélèvements dits « invasifs » tels que la ponction de villosités chorales ou de liquide amniotique. La réalisation de ces gestes et le parcours de diagnostic prénatal génèrent une angoisse parentale importante en raison du risque accru de perte fœtale, bien que ce risque demeure très faible [1]. Il est cependant raisonnable de considérer qu'une alternative non-invasive équivalente en termes de spécificité, de sensibilité et de délais d'exécution soit préférable. De plus, différentes études montrent que la méthode non-invasive – c'est-à-dire un prélèvement sanguin maternel au cours de la grossesse – est préférée par les patientes et les prescripteurs lorsqu'elle est disponible [2,3].

## **2. Les caractéristiques biologiques de l'ADN libre circulant foetal (cffDNA)**

L'étude non-invasive de matériel génétique d'origine fœtale a été rendue possible par la découverte en 1997 de la présence d'ADN issu du chromosome Y dans le plasma de prélèvements de sang de femmes enceintes d'un fœtus de sexe masculin [4]. L'ensemble du génome, foetal comme maternel, est représenté dans le plasma de la femme enceinte sous forme d'ADN libre circulant (cfDNA pour cell-free DNA) : une fraction maternelle majoritaire et une fraction fœtale minoritaire (cffDNA) [5]. Contrairement à l'ADN nucléaire, le cfDNA est très fragmenté : dans un travail récent, Dennis Lo a montré que le profil de fragmentation des molécules d'ADN plasmatique correspond à une taille distincte mais aussi des sites de coupure spécifiques liés à des motifs nucléotidiques particuliers [6]. La distribution des fragments de cfDNA maternel présente un pic de taille à 166 pb alors que celui du cffDNA est à 143 bp [5]. Le profil de méthylation de ces cfDNA est également propre à l'origine du tissu. Ces différences de tailles de fragments ainsi que les propriétés physico-chimiques spécifiques des brins de cfDNA selon l'origine maternel ou foetal du tissu ont été utilisées dans la détection de pathologies telles que la pré-éclampsie ou le diabète gestationnel ou pour optimiser les outils du diagnostic prénatal non-invasif des maladies mono-géniques (DPNI-MM) [7].

## **3. Un cffDNA détectable très précocement**

Le cffDNA, d'origine trophoblastique, est détectable dès 5 semaines d'aménorrhée (SA) [8] et sa concentration permet la détermination du sexe foetal dès 7 SA et la réalisation d'un DPNI-MM dès 10 SA. Contrairement au dépistage prénatal non-invasif des aneuploïdies, le DPNI-MM d'exclusion concerne un risque de transmission de maladie génétique monogénique connue dans la famille et ne requièrent pas de confirmation par un prélèvement invasif. En effet, le risque d'apparition ou de disparition somatique d'un variant connu confine au placenta est infinitésimal [9] alors que le risque d'anomalie chromosomique localisée est bien plus important [10]. Cette différence de risque est à l'origine de la dichotomie diagnostic prénatal non-invasif des maladies mono-géniques/dépistage prénatal non-invasif des aneuploïdies, et explique la nécessité de contrôler un dépistage positif par une ponction de liquide amniotique ou l'étude des amniocytes donnera un meilleur reflet des chromosomes portés par l'enfant à naître.

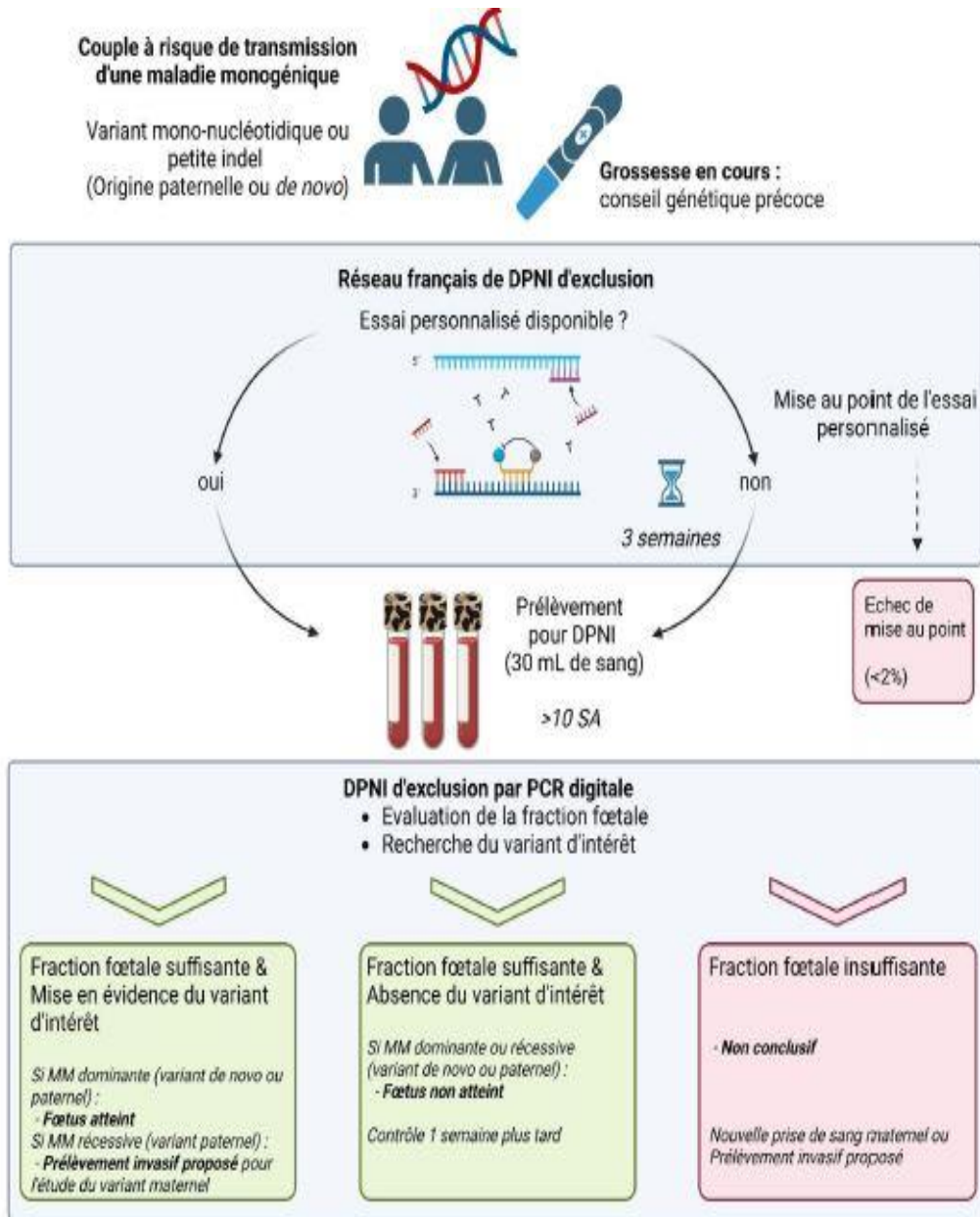


Fig. 1. Diagnostic prénatal non-invasif des maladies monogéniques par détection qualitative de séquences ou de variants absents du génome maternel en pratique diagnostique courante. Créée avec Biorender.com.

#### 4. Une analyse applicable dans de nombreuses circonstances

Au moment du prélèvement de sang maternel, le cfDNA est spécifique de la grossesse en cours, du fait de sa demi-vie moyenne courte de 16 minutes. Il est donc très rapidement éliminé de la circulation sanguine maternelle après l'accouchement et devient indétectable au bout de 2 jours post-partum [11]. La fraction fœtale (f) est le pourcentage de cfDNA au sein du cfDNA total retrouvé dans le plasma maternel et peut être calculée selon la formule suivante :  $f = \text{cfDNA} / \text{cfDNA total}$ . Plusieurs facteurs influencent cette f : l'âge gestationnel, l'indice de masse corporel (IMC) maternel, les aneuploïdies, un état pathologique maternel entraînant une libération accrue de cfDNA, tel que la pré-éclampsie, et le nombre de fœtus

[12]. En dehors de toute condition pathologique, il est rapporté que l'IMC influence de façon majeure les taux de cfDNA maternel, la fraction fœtale étant inversement proportionnelle à l'IMC [13]. Les grossesses multiples présentent des f « combinées » supérieures aux grossesses singleton mais les f « par fœtus » sont inférieures à celle d'une grossesse simple. L'étude du cffDNA reste pertinente dans le cas des grossesses gémellaires monochoriales car les fœtus jumeaux sont presque toujours monozygotes et que peu de variants post-zygotiques acquis au cours de leur développement les distinguent [14]. L'interprétation des résultats d'un DPNI peut cependant se compliquer en cas de décès d'un fœtus au cours d'une grossesse multiple, le placenta d'un jumeau évanescant libérant du cffDNA pendant plus de 3 mois [13]. Du cfDNA pouvant être libéré par un organe greffé, les greffes d'organes représentent un risque de faux positif mais les f estimés dans ce contexte sont souvent aberrantes au regard des valeurs attendues et permettent alors de déceler l'interférence [15].

## **5. Considérations et contraintes préanalytiques**

La quantité de cffDNA étant limitée, il est important d'identifier et de contrôler les facteurs préanalytiques permettant de garantir des résultats de test robustes et fiables. Alors que le cfDNA total dans le sang maternel est stable jusqu'à 24 heures à température ambiante, sa quantité augmente considérablement après 24 heures en raison de la lyse des cellules maternelles, aboutissant ainsi à la dilution du cffDNA dans le cfDNA total. Par conséquent, il est recommandé d'utiliser des tubes spécifiques pour le prélèvement sanguin de la femme enceinte permettant de minimiser la lyse cellulaire et la dégradation de l'ADN. D'autres contraintes techniques résultent du caractère fragmenté du cfDNA : il est par exemple nécessaire de concevoir des amorces pour l'amplification d'un fragment de petite taille par PCR. Ceci est aisément applicable dans un contexte de maladie génétique impliquant un variant ponctuel ou une petite indel (insertion et/ou délétion de quelques nucléotides), mais n'est pas envisageable dans le contexte de maladies impliquant des grands réarrangements (par exemple, amyotrophie spinale proximale liée à SMN1) ou des expansions de triplets (par exemple, syndrome de l'X fragile, maladie de Huntington ou la dystrophie myotonique de Steinert). Finalement, un facteur essentiel pour tout test prénatal non-invasif est de s'assurer de la présence effective de cffDNA dans l'échantillon testé, soit par le biais de marqueurs épigénétiques dont l'état de méthylation diffère entre l'ADN d'origine fœtale (placentaire) et maternelle tels que gène RASSF1A, soit par détection de variants absents du génome maternel, comme les variants génomiques d'origine paternelle.

Au total, on comprend aisément que, dans ce contexte particulier du diagnostic prénatal non-invasif, la détection et l'étude du cffDNA nécessitent d'avoir recours à des technologies suffisamment sensibles, spécifiques et précises, telles que le séquençage de nouvelle génération (NGS) ou la PCR digitale (dPCR).

## **6. Applications (1) : la détection qualitative de séquences ou de variants absents du génome maternel**

Les applications du DPNI-MM intéressent l'étude d'une cible préalablement connue, telle qu'une séquence d'ADN ou un variant pathogène d'intérêt. Les premières applications du DPNI-MM proposées en pratique diagnostique courante furent les recherches d'événements absents du génome maternel, comme la recherche de séquences spécifiques du chromosome Y pour la détermination du sexe foetal [8], de l'antigène RHD chez les femmes à risque d'allo-immunisation [16,17], de variants de novo récurrents tels que les variants FGFR3 impliqués dans l'achondroplasie [18,19], ainsi que de variants paternels dans les maladies autosomiques récessives ou dominantes [20–22]. Le principe en est relativement simple : le génome maternel n'interférant pas dans ce contexte, la cible recherchée (séquence spécifique du chromosome Y, gène RHD ou variant paternel) visible dans le cfDNA serait portée par le foetus, d'où les premiers DPNI-MM d'exclusion. L'implantation des DPNI-MM d'exclusion en pratique diagnostique se fait pas à pas depuis 20 ans en suivant l'évolution des techniques analytiques en termes de sensibilité, spécificité, précision et rapidité et a connu un essor particulier ces dernières années avec l'arrivée des techniques de NGS et dPCR.

La première indication à bénéficier d'une approche non-invasive fut la détermination du sexe foetal. La première méthode utilisée pour le diagnostic en pratique clinique a été la PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) ciblant SRY et DYS14 en 2002 en France, à l'hôpital Américain de Paris, publiée depuis par une équipe anglaise [23]. Cette indication fut validée en 2009 par la Haute Autorité de santé (HAS), ce qui a permis son inscription à la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM). Cette détermination du sexe foetal est réalisée dans le but d'identifier les foetus de sexe masculin pour des grossesses à risque de transmission de maladies liées à l'X, permettant ainsi de rassurer les familles en cas de foetus de sexe féminin et s'affranchir d'un geste invasif inutile. La détermination du sexe foetal est également utilisée pour initier des traitements par dexaméthasone pour les grossesses à risque d'hyperplasie congénitale des surrénales chez un foetus de sexe féminin afin de limiter les risques de virilisation [24,25].

La détermination non-invasive du génotype rhésus foetal fut validée par la HAS en 2011 avec un passage à la NABM en 2017, ce qui a facilité son implantation et son accès universel au niveau national. Prescrit systématiquement pour chaque patiente enceinte RhD-, le génotypage RhD foetal sur sang maternel permet (1) à titre prophylactique, chez les femmes non immunisées, de déterminer les modalités de prise en charge de la grossesse et de limiter le recours aux immunoglobulines, (2) à titre thérapeutique, chez les femmes déjà immunisées, de déterminer les grossesses devant bénéficier d'une prise en charge spécifique [26]. Comme pour la détermination du sexe foetal, on observe une cohabitation de deux techniques sur le territoire. Une RT-qPCR commerciale ciblant les exons 5, 7 et 10 du gène



RHD (Institut de technologies Jacques Boy, enregistrement CE IVD), notamment utilisé par l'Établissement français du sang et dans le secteur privé. Et d'autre part, une extension de la pratique diagnostique avec l'utilisation de la dPCR qui offre un panel plus large d'exploration des incompatibilités : antigènes rhésus, Kell et plaquettaires.

Dernièrement l'éventail des indications du DPNI d'exclusion s'est élargi aux couples à risque de transmettre une maladie monogénique sévère et incurable dans les cas suivants (i) variants pathogènes paternels impliqués dans des maladies dominantes, (ii) variants pathogènes paternels impliqués dans des maladies récessives, à condition que les 2 parents soient porteurs de variants différents et (iii) variants pathogènes survenus de novo lors de précédentes grossesses. Les premières techniques utilisées reposaient sur une digestion enzymatique spécifique du variant recherché (RED-PCR), notamment pour la recherche des variants les plus fréquemment impliqués dans l'achondroplasie [27]. Des approches non-invasives pionnières ont également été développées dans les années 2000 par une équipe espagnole pour des diagnostics prénataux de maladies telles que la maladie de Huntington, la rétinopathie pigmentaire liée à l'X et l'acidémie propionique [28]. D'autres laboratoires étrangers, ont mis au point et incrémenté dans leur routine diagnostique le DPNI par séquençage NGS d'un panel de capture ciblant des gènes d'intérêt, avec une spécificité de 96,0 à 100 % et une sensibilité de 87,5 à 96,2 % selon les études [29,30]. Cette approche présente l'avantage de tester simultanément de multiples variants dans un gène donné, mais n'est cependant applicable qu'aux gènes relevant d'une indication fréquente de diagnostic prénatal, puisqu'il est nécessaire de concevoir et mettre au point en amont la capture d'un panel de gènes cibles ; ce qui nécessite un délai de plusieurs mois. De plus, des faux positifs et faux négatifs liés à cette méthode ont été rapportés, probablement liés à la combinaison de phénomènes d'allèle drop-out – qui favorisent un allèle plutôt qu'un autre dans le séquençage – et de la fragmentation non aléatoire du cfDNA [6], pouvant mener à la non-visualisation d'allèles fœtaux à une position génomique donnée malgré une f suffisante. Les approches NGS en DPNI-MM imposent une grande profondeur de lecture (production d'une grande quantité de données de séquençage) et donc un surcout, pour détecter avec une sensibilité suffisante les variants à faible fraction allélique. Palliant les inconvénients du NGS et répondant aux exigences de sensibilité et spécificité des tests de DPNI, les méthodes basées sur la dPCR se sont fortement développées ces dernières années. Cette approche est variant dépendant et nécessite la mise au point personnalisée de couples d'amorces et de sondes, spécifiques du variant paternel ou de novo recherché. En pratique, si les couples sont demandeurs d'un DPNI-MM d'exclusion, ils informent le prescripteur dès qu'une grossesse est démarrée. Le laboratoire prend en charge la conception et la validation des essais personnalisés, qui se font en 2 à 3 semaines et sont associées à un taux relativement faible d'échec, d'environ 2 % [22]. Dès validation des contrôles qualités par le laboratoire, le prescripteur est informé et peut recontacter la patiente pour un prélèvement de sang maternel à partir de 10SA. Soit le variant d'intérêt n'est pas détecté dans le plasma maternel, le fœtus est alors déclaré non porteur du variant : un échantillon de sang de confirmation est recommandé par souci d'identitovigilance, mais il n'est pas nécessaire de procéder à un test

invasif car il s'agit d'un test de diagnostic et non de dépistage (Fig. 1). Soit le variant d'intérêt est détecté dans le plasma maternel, le fœtus est alors déclaré porteur du variant. Il n'y a pas besoin de confirmation en cas de maladie dominante mais il faut faire un test invasif pour rechercher le variant maternel en cas de maladie récessive. Dans de rares cas, la fraction fœtale trop faible pour aboutir à un résultat fiable et un échantillon de sang maternel supplémentaire est demandé. Les résultats sont rendus en une semaine, afin de ne pas entraîner de retard dans la prise en charge de la grossesse, quel que soit le résultat du DPNI d'exclusion. Cinq ans après sa mise en place, cet examen a été proposé pour plus de 137 maladies monogéniques et des essais spécifiques sont disponibles pour plus de 269 variants (Table S1). À ce jour, aucun résultat faux positif ou de faux négatif n'a été rapporté [22].

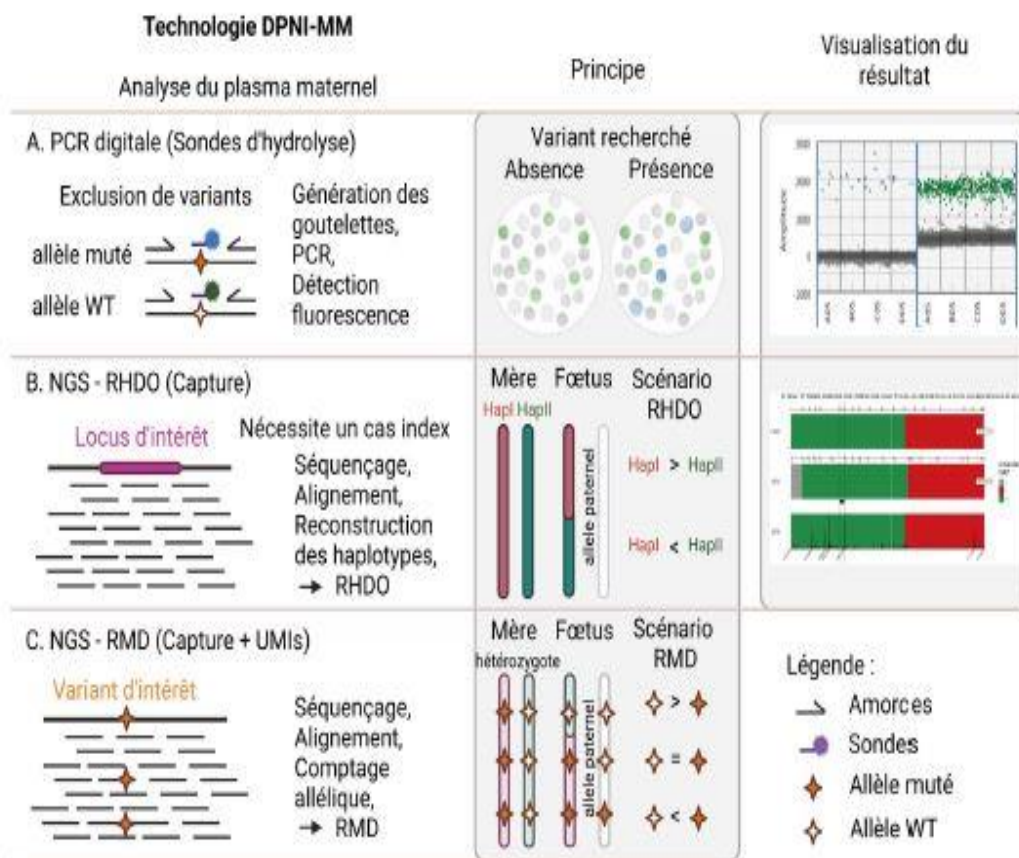


Fig. 2. Aspect technologique du diagnostic prénatal non-invasif des maladies monogéniques. A. Schéma décrivant l'approche d'exclusion de variants par PCR digitale. B. Schéma décrivant l'approche dosage relatif d'haplotype (RHDO) par séquençage haut-débit (NGS). C. Schéma décrivant l'approche dosage relatif des mutations (RMD) par séquençage haut-débit (NGS) avec identifiants moléculaires uniques (UMIs). Créée avec Biorender.com.

Afin de développer l'offre de DPNI-MM et faciliter son accès aux patientes, plusieurs laboratoires de génétique moléculaire du service public français se sont organisés en réseau, de finissant ainsi le réseau français du DPNI d'exclusion des maladies monogéniques. Ce réseau permet une organisation de l'activité au niveau national avec le partage des connaissances, l'uniformisation des protocoles et la mise en place de contrôles qualité sous

forme d'échanges inter laboratoires. Cependant, à l'échelle mondiale, malgré quelques initiatives ponctuelles limitées à des pays principalement européens, l'implantation du DPNI-MM en routine diagnostique reste lente et peu répandue.

## **7. Applications (2) : la détection quantitative de séquences également présentes dans le génome maternel**

Afin de pouvoir proposer un DPNI dans le contexte des maladies monogéniques liées au chromosome X, mais aussi des maladies dominantes transmises par la mère ou des maladies récessives pour lesquelles les deux parents sont porteurs du même variant, il est nécessaire de pouvoir étudier les variants foetaux qui sont également présents dans l'ADN génomique maternel. Dans le cas d'une pathologie récessive pour laquelle les deux parents seraient porteurs d'un même variant par exemple, le rapport entre le nombre total de copies de l'allèle mutant (M) et de l'allèle normal (N) dans le plasma maternel devrait être équilibré ( $M = N$ ) si le génotype du fœtus (M,N) est identique à celui de la mère (M,N). En revanche, le rapport allélique sera déséquilibré si le génotype du fœtus est différent du génotype maternel. Si le fœtus a hérité des deux allèles parentaux normaux (N,N), il y aura dans le plasma maternel une quantité supplémentaire de l'allèle normal apporté par le fœtus, ce qui entraînera la sur-représentation de l'allèle normal dans le plasma maternel ( $N > M$ ). Inversement, si le fœtus a hérité des allèles mutants parentaux (M,M), il y aura une sur-représentation de l'allèle muté dans le plasma maternel ( $M > N$ ). En pratique, le déséquilibre allélique dans le plasma est testé statistiquement pour l'existence d'une sur-représentation significative de l'un des deux allèles, sachant la fraction fœtale et le mode de transmission. La capacité discriminatoire de ces tests dépend alors de la fraction fœtale circulante.

Afin de relever ce défi, deux approches principales ont été développées, à savoir le dosage relatif des mutations (RMD) et l'analyse du dosage relatif des haplotypes (RHDO) (Fig. 2). La principale différence entre ces deux approches de comptage moléculaire réside dans leur nature : le RMD implique la détection directe et spécifique du variant pathogène d'intérêt, tandis que le RHDO implique la construction préalable des haplotypes maternels et paternels possibles dans la région, qui sont ensuite quantifiés dans le plasma maternel afin d'en déduire l'héritabilité fœtale. Le RMD ne nécessite qu'un échantillon de sang maternel, tandis que le RHDO repose sur l'étude des échantillons des parents ainsi que d'un cas index. Le RMD a été appliqué avec succès au DPNI de la b-thalassémie [31], de la drépanocytose [32] mais aussi de maladies liées à l'X comme l'hémophilie [33]. Néanmoins, le nombre de cibles disponibles des allèles mutants et normaux dans le plasma maternel étant limité, cette approche se traduit par une robustesse statistique insuffisante, associée une forte proportion de cas non conclusifs, voire de cas incorrectement classifiés [32]. L'analyse RMD est donc restée à la phase de preuve de concept, étant évaluée dans un nombre limité d'études, avec un nombre limité de patients, et n'a jamais été mise en oeuvre en pratique clinique à notre connaissance.

Pour la méthode RHDO, des milliers de positions génomiques aux abords du variant pathogène d'intérêt sont prises en compte dans la reconstruction des haplotypes. Il est donc nécessaire d'avoir, en plus du plasma maternel, l'ADN nucléaire maternel, l'ADN nucléaire paternel ainsi que l'ADN d'un apparenté qui peut être un 1er enfant du couple (atteint ou non atteint) ou un apparenté proche porteur du variant d'intérêt. Cette méthode indirecte permet de déterminer le statut fœtal – atteint ou non – avec des performances diagnostiques de très haute sensibilité ou de spécificité. Une étude française préliminaire menée sur des familles incluses dans la cohorte française DANNI a permis d'évaluer la faisabilité technique et les performances diagnostiques de cette approche, montrant un résultat conclusif et concordant avec le statut foetal attendu dans 67/70 (96 %) des cas de DPNI-MM, non conclusif dans 3/70 (4 %) des cas et conclusif discordant dans 0/70 (0 %) des cas [34]. La qualité du résultat dépend de la fraction fœtale  $f$ , de la qualité du séquençage et du nombre de positions analysées informatives. Cette méthode présente l'avantage d'être théoriquement applicable à tous les modes de transmission (autosomique récessive, autosomique dominante ou liée à l'X) et à tous les types de variations génomiques pathogéniques. Toutefois, la nécessité de disposer d'un apparenté porteur du variant d'intérêt peut être problématique dans certaines situations ou dans le cas des grossesses issues de dons de gamètes.

Cette approche a été appliquée avec succès au DPNI-MM de l'hyperplasie congénitale des surrénales, de l'hémophilie et du déficit en cobalamine C [24,35,36]. Elle est actuellement proposée en pratique clinique par le NHS britannique pour la dystrophie musculaire de Duchenne, l'amyotrophie spinale et la mucoviscidose [37–40]. Cependant, un contrôle robuste des erreurs statistiques et une description explicite des contrôles de qualité pour évaluer la qualité de l'analyse n'ont pas encore été pleinement pris en compte. C'est pourquoi plusieurs laboratoires français se sont associés pour développer une procédure universelle et adaptable de RHDO améliorée (eRHDO), en cours d'évaluation grâce à un financement PHRC national. Ce projet ambitieux a pour objectif d'évaluer la performance diagnostique du DPNI-MM dans plusieurs pathologies et avec des conditions de réalisation du test différentes, spécifiques à l'environnement de chaque laboratoire. Si le projet est couronné de succès, la France pourrait alors être le second pays, après le Royaume-Uni, à proposer en pratique clinique le DPNI de très nombreuses maladies génétiques. Pour s'affranchir de la nécessité de disposer d'un cas index, des initiatives de séquençage particulier ont été implémentées ou sont en cours d'évaluation comme l'approche Targeted Locus Amplification [41] ou le séquençage longread avec les technologies Oxford Nanopore Technologies (Oxford, GB) ou Pacific Bioscience (Menlo Park, USA) [42]. Jusqu'à présent les qualités de séquençage (6 à 8 % d'erreurs de séquençage [43]) non optimales constituent un frein à son transfert en diagnostic et demandent une amélioration pour le DPNI.

## **8. Dépistage commercial**

Des tests commerciaux de dépistage prénatal non-invasif sont proposés par la société Natera (San Carlos, USA) et Billion to One (Menlo Park, USA) : respectivement un panel de 30 gènes explorant 25 pathologies avec anomalies du développement ou un kit de dépistage

associant détection d'aneuploïdie, recherche d'antigènes foetaux et de pistage de 4 maladies récessives. La disponibilité commerciale de ces kits sur le web offre une extension du service de pistage prénatal des maladies monogéniques à des grossesses à faible risque non actuellement concernées par le test diagnostique de DPNI-MM. L'utilisation non supervisée de ces tests, hors cadre d'une prise en charge adaptée en service de soin compétent, soulève des inquiétudes. En effet, il est essentiel de s'assurer que les patientes sont correctement informées des risques de faux négatifs ou de faux positifs, mais également de notions complexes telles que les variants de signification incertaine, ou encore la pénétrance incomplète ou l'expressivité variable associées à certaines pathologies. En cas de résultat positif, il est de plus impératif de confirmer ces résultats par un test diagnostique, et ce jusqu'à ce que des données suffisantes soient disponibles pour démontrer la sensibilité, la spécificité et la valeur prédictive positive de ces tests de dépistage.

## 9. Conclusions

En France, le diagnostic prénatal et l'interruption médicale de grossesse peuvent être proposés s'il y a un risque à priori que l'enfant à naître soit atteint d'une affection d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic. Le développement de nouveaux traitements spécifiques pour les maladies rares « fréquentes », tels que les modulateurs CFTR dans la mucoviscidose [44], les thérapies de modification de l'épissage, les thérapies de remplacement de gènes, ou les thérapies géniques in utero de plus en plus efficaces [45], rend encore plus pertinente l'approche non-invasive du diagnostic prénatal des maladies monogéniques. Lorsque cette approche est disponible, l'implémentation du DPNI-MM répond aux attentes des couples et des prescripteurs : elle permet de diminuer l'anxiété des couples liée aux possibles complications des gestes invasifs (0,2 % et 0,3 % de complications pour les ponctions de villosités choriales ou de liquide amniotique, respectivement), apportant un résultat conclusif dans 96 % des cas, sans entraîner de retard dans la prise en charge de la grossesse. La mise en place d'un réseau national de DPNI-MM permet d'assurer une égalité d'accès sur le territoire du DPNI-MM d'exclusion de variants de novo et paternels dans les maladies autosomiques récessives ou dominantes. A l'horizon, plusieurs méthodes supplémentaires encore en développement pour le DPNI-MM permettront encore d'accroître le nombre de grossesses éligibles. Même si les performances diagnostiques des DPNI-MM dépendent notamment de la fraction fœtale  $f$  qui doit être suffisante dans le plasma, la validation des performances optimales doit être obligatoire pour toute méthode employée. Une information précise est nécessaire sur les conditions d'applications de certains tests et notamment sur la possibilité de découverte de données incidentes, tels que des cancers maternels. La possibilité d'un choix éclairé est une notion clé en santé dans le droit français inscrit dans la loi no 2002-303 du 4 mars 2002 [46]. En effet, la France donne la priorité aux droits reproductifs mais ces notions d'autonomie peuvent varier dans le temps et d'un pays à l'autre [47]. La validation des indications du DPNI-MM par la Haute Autorité de santé en

France et l'inscription des tests à la nomenclature des actes de biologie favorisent l'accès égalitaire et l'implantation des tests au niveau national. Une meilleure connaissance des enjeux éthiques et technologiques du DPNI alimentera les prises de décisions politiques et sociétales pour apporter un service rendu croissant et une meilleure prise en charge des grossesses.

### **Déclaration de liens d'intérêts**

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

### **Contribution**

CV : rédaction du manuscrit original, correction, investigations. VG : correction du manuscrit, investigations. MP : correction du manuscrit, investigations, financement. MPA : correction du manuscrit, investigations, financement. NC : correction du manuscrit, investigations, financement. MCV : correction du manuscrit, investigations, financement. FL : correction du manuscrit, investigations. VT : correction du manuscrit. TB : correction du manuscrit. JN : **conceptualisation, correction du manuscrit, investigations, financement.**

### **Remerciements**

Nous remercions les patients, les associations de patients et les professionnels de santé conseillères en génétique, généticiennes, obstétriciennes, sages-femmes, infirmières et techniciennes de laboratoire de nous avoir accompagné tout au long de nos développements. L'étude DANNI, à Paris-Cochin, a reçu le soutien financier de l'Agence de la Biomédecine (R13188KK (2013)), de l'association Vaincre la Mucoviscidose (RC2013500852 (2013), RC20160501598 (2016), RC20200502668 (2020)) et de l'Association française contre les Myopathies (AFM AO2019-N819832 (2019)). L'étude NID, à Brest, a reçu le soutien financier de l'Agence de la Biomédecine (R18155NN (2018)) et de l'association Gaétan Saleün (PA-CPR-11/17). L'équipe de Montpellier a reçu le soutien financier de l'Agence de la Biomédecine (ABM 2012, 2015, 2017 et 2020) et du et PHRC interrégional 2016 GIRCI SOOM. L'équipe de Paris Robert-Debré a reçu le soutien financier de l'Agence de la Biomédecine (ABM 2014). Annexe A. Matériel complémentaire Le matériel complémentaire accompagnant la version en ligne de cet article est disponible sur <http://www.sciencedirect.com> et [doi:10.1016/j.gofs.2023.07.005](https://doi.org/10.1016/j.gofs.2023.07.005).

## **RÉFÉRENCES**

[1] Salomon LJ, Sotiriadis A, Wulff CB, Odibo A, Akolekar R. Risk of miscarriage following amniocentesis or chorionic villus sampling: systematic review of literature and updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2019;54(4):442–51.

- [2] Hill M, Compton C, Karunaratna M, Lewis C, Chitty L. Client views and attitudes to non-invasive prenatal diagnosis for sickle cell disease, thalassaemia and cystic fibrosis. *J Genet Counsel* 2014;23(6):1012–21.
- [3] Lewis C, Hill M, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis for single gene disorders: experience of patients: non-invasive prenatal diagnosis for single gene disorders. *Clin Genet* 2014;85(4):336–42.
- [4] Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet* 1997;350(9076):485–7.
- [5] 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* [Internet] 2010;2(61) [cited 2022 Aug 4, Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3001720>].
- [6] Lo YMD, Han DSC, Jiang P, Chiu RWK. Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies. *Science* 2021;372(6538):eaaw3616.
- [7] Rasmussen M, Reddy M, Nolan R, Camunas-Soler J, Khodursky A, Scheller NM, et al. RNA profiles reveal signatures of future health and disease in pregnancy. *Nature* 2022;601(7893):422–7.
- [8] Guibert J, Benachi A, Grebille AG, Ernault P, Zorn JR, Costa JM. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18(8):1733–6.
- [9] Drury S, Mason S, McKay F, Lo K, Boustred C, Jenkins L, et al. Implementing Non-Invasive Prenatal Diagnosis (NIPD) in a National Health Service Laboratory; from dominant to recessive disorders. In: Gahan PB, Fleischhacker M, Schmidt B, editors. *Circulating nucleic acids in serum and plasma – CNAPS IX* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 71–5 [cited 2023 Jan 27, *Advances in Experimental Medicine and Biology*; vol. 924). Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-42044-8\\_14](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-42044-8_14)].
- [10] Eggenhuizen GM, Go A, Koster MPH, Baart EB, Galjaard RJ. Confined placental mosaicism and the association with pregnancy outcome and fetal growth: a review of the literature. *Hum Reprod Update* 2021;27(5):885–903.
- [11] Yu SC, Lee SW, Jiang P, Leung TY, Chan KA, Chiu RW, et al. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clinical Chemistry* 2013;59(8):1228–37.
- [12] Hui L, Bianchi DW. Fetal fraction and non-invasive prenatal testing: what clinicians need to know. *Prenat Diagn* 2020;40(2):155–63.
- [13] Bevilacqua E, Chen K, Wang Y, Doshi J, White K, de Marchin J, et al. Cell-free DNA analysis after reduction in multifetal pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2020;55(1):132–3.

- [14] Jonsson H, Magnusdottir E, Eggertsson HP, Stefansson OA, Arnadottir GA, Eiriksson O, et al. Differences between germline genomes of monozygotic twins. *Nat Genet* 2021;53(1):27–34.
- [15] Balaguer N, Mateu-Brull E, Naja RP, Nagi JB, Mila´n M. Chromosome Y as a marker for sex discrepancies in patients with organ transplants: a case report. *Mol Cytogenet* 2021;14(1):3.
- [16] Vivanti A, Benachi A, Huchet FX, Ville Y, Cohen H, Costa JM. Diagnostic accuracy of fetal rhesus D genotyping using cell-free fetal DNA during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2016;215(5):606.e1–5.
- [17] Orhant L, Rondeau S, Vasson A, Anselem O, Goffinet F, Allach El Khattabi L, et al. Droplet digital PCR, a new approach to analyze fetal DNA from maternal blood: application to the determination of fetal RHD genotype. *Ann Biol Clin* 2016;74(3):269–77.
- [18] Orhant L, Anselem O, Fradin M, Becker PH, Beugnet C, Deburgrave N, et al. Droplet digital PCR combined with minisequencing, a new approach to analyze fetal DNA from maternal blood: application to the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia. *Prenat Diagn* 2016;36(5):397–406.
- [19] Vivanti AJ, Costa JM, Rosefort A, Kleinfinger P, Lohmann L, Cordier AG, et al. Optimal non-invasive diagnosis of fetal achondroplasia combining ultrasonography with circulating cell-free fetal DNA analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2019;53(1):87–94.
- [20] Guissart C, Tran Mau Them F, Debant V, Viart V, Dubucs C, Pritchard V, et al. A broad test based on fluorescent-multiplex PCR for non-invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Fetal Diagn Ther* 2019;45(6):403–12.
- [21] Gruber A, Pacault M, El Khattabi LA, Vaucouleur N, Orhant L, Bienvenu T, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of paternally inherited disorders from maternal plasma: detection of NF1 and CFTR mutations using droplet digital PCR. *Clin Chem Lab Med* 2018;56(5):728–38.
- [22] Pacault M, Verebi C, Lopez M, Vaucouleur N, Orhant L, Deburgrave N, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders by paternal mutation exclusion: 3 years of clinical experience. *BJOG* 2022;20 [1471-0528.17201].
- [23] Hill M, Finning K, Martin P, Hogg J, Meaney C, Norbury G, et al. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. *Clin Gen* 2011;80(1):68–75.
- [24] New MI, Tong YK, Yuen T, Jiang P, Pina C, Chan KCA, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *J Clin Endocrinol Metabolism* 2014;99(6):E1022–30.



- [25] Tardy-Guidollet V, Menassa R, Costa JM, David M, Bouvattier-Morel C, Bau-mann 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 Metabolism* 2014;99(4):1180–8.
- [26] Clausen FB, Rieneck K, Krog GR, Bundgaard BS, Dziegiel MH. Non-invasive antenatal screening for fetal RHD in RhD negative women to guide targeted anti-D Prophylaxis. In: Levy B, editor. *Prenatal diagnosis* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019. p. 347–59 [cited 2023 Jan 27. *Methods in Molecular Biology*; vol. 1885. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8889-1\\_23](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8889-1_23)].
- [27] Chitty LS, Khalil A, Barrett AN, Pajkrt E, Griffin DR, Cole TJ. Safe, accurate, prenatal diagnosis of thanatophoric dysplasia using ultrasound and free fetal DNA. *Prenat Diagn* 2013;33(5):416–23.
- [28] Bustamante-Aragone's A, Rodriguez de Alba M, Perlado S, Trujillo-Tiebas MJ, Arranz JP, Di'az-Recasens J, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of single-gene disorders from maternal blood. *Gene* 2012;504(1):144–9.
- [29] Chitty LS, Mason S, Barrett AN, McKay F, Lench N, Daley R, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia and thanatophoric dysplasia: next-generation sequencing allows for a safer, more accurate, and comprehensive approach. *Prenat Diagn* 2015;35(7):656–62.
- [30] Xiong L, Barrett AN, Hua R, Ho S, Jun L, Chan K, et al. Non-invasive prenatal testing for fetal inheritance of maternal b-thalassaemia mutations using targeted sequencing and relative mutation dosage: a feasibility study. *BJOG* 2018;125(4):461–8.
- [31] Lun FMF, Chiu RWK, Chan KCA, Leung TY, Lau TK, Lo YMD. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2008;54(10):1664–72.
- [32] Barrett AN, McDonnell TCR, Chan KCA, Chitty LS, Digital PCR. Analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia. *Clin Chem* 2012;58(6):1026–32.
- [33] Tsui NBY, Kadir RA, Chan KCA, Chi C, Mellars G, Tuddenham EG, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood* 2011;117(13):3684–91.
- [34] Pacault M, Verebi C, Champion M, Orhant L, Perrier A, Girodon E, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders with enhanced relative haplotype dosage analysis for diagnostic implementation. *PLoS One* 2023.
- [35] Hudecova I, Jiang P, Davies J, Lo YMD, Kadir RA, Chiu RWK. Non-invasive detection of F8 int22h-related inversions and sequence variants in maternal plasma of hemophilia carriers. *Blood* 2017;130(3):340–7.

- [36] Han L, Chen C, Guo F, Ye J, Peng Z, Qiu W, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of cobalamin C (cblC) deficiency through target region sequencing of cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2020;40(3):324–32.
- [37] Hanson B, Scotchman E, Chitty LS, Chandler NJ. Non-invasive prenatal diagnosis (NIPD): how analysis of cell-free DNA in maternal plasma has changed prenatal diagnosis for monogenic disorders. *Clin Sci* 2022;136(22):1615–29.
- [38] Parks M, Court S, Bowns B, Cleary S, Clokie S, Hewitt J, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy by relative haplotype dosage. *Eur J Hum Genet* 2017;25(4):416–22.
- [39] Parks M, Court S, Cleary S, Clokie S, Hewitt J, Williams D, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by relative haplotype dosage. *Prenat Diagn* 2016;36(4):312–20.
- [40] Chandler NJ, H, Drury S, Mellis R, Hill M, McKay FJ, et al. Non-invasive prenatal diagnosis for cystic fibrosis: implementation, uptake, outcome, and implications. *Clin Chem* 2020;66(1):207–16.
- [41] Vermeulen C, Geeven G, de Wit E, Verstegen MJAM, Jansen RPM, van Kra-nenburg M, et al. Sensitive monogenic noninvasive prenatal diagnosis by targeted haplotyping. *Am J Hum Genet* 2017;101(3):326–39.
- [42] Jiang F, Liu W, Zhang L, Guo Y, Chen M, Zeng X, et al. Non-invasive prenatal testing for (-thalassemia by targeted nanopore sequencing combined with relative haplotype dosage (RHDO): a feasibility study. *Sci Rep* 2021;11(1):5714.
- [43] Delahaye C, Nicolas J. Sequencing DNA with nanopores: troubles and biases. Andre´ s-Leo´ n E, editor. *PLoS One* 2021;16(10):e0257521.
- [44] Guo J, Garratt A, Hill A. Worldwide rates of diagnosis and effective treatment for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2022 [S1569199322000315].
- [45] Carlon MS, Vidovic´ D, Birket S. Roadmap for an early gene therapy for cystic fibrosis airway disease. *Prenatal Diagnosis* 2017;37(12):1181–90.
- [46] Comite´ Consultatif National d’Éthique. Avis no 120. Questions éthiques associées au développement des tests génétiques foetaux sur sang maternel. 25/04/ 2013:1-50.
- [47] Perrot A, Horn R. The ethical landscape(s) of non-invasive prenatal testing in England, France and Germany: findings from a