



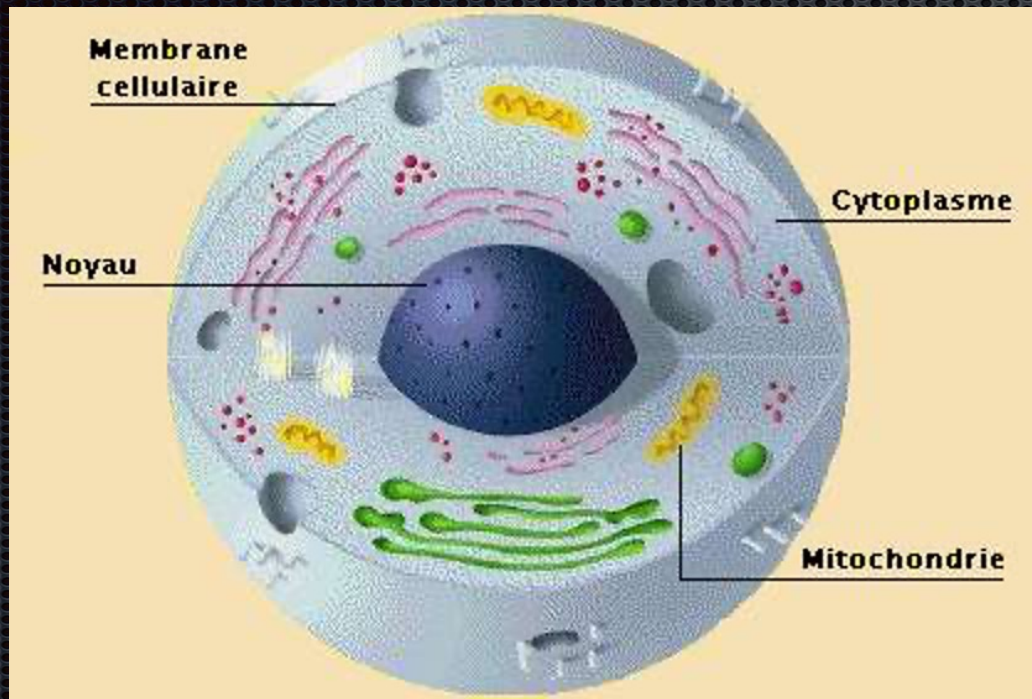
*Quand faire un examen génétique en **PRENATAL***

Georges HADDAD

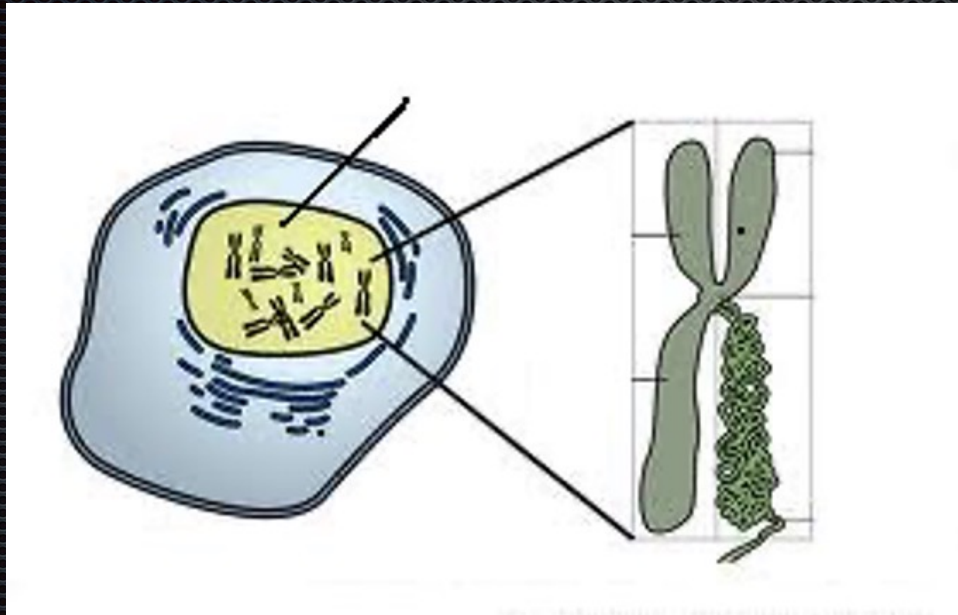


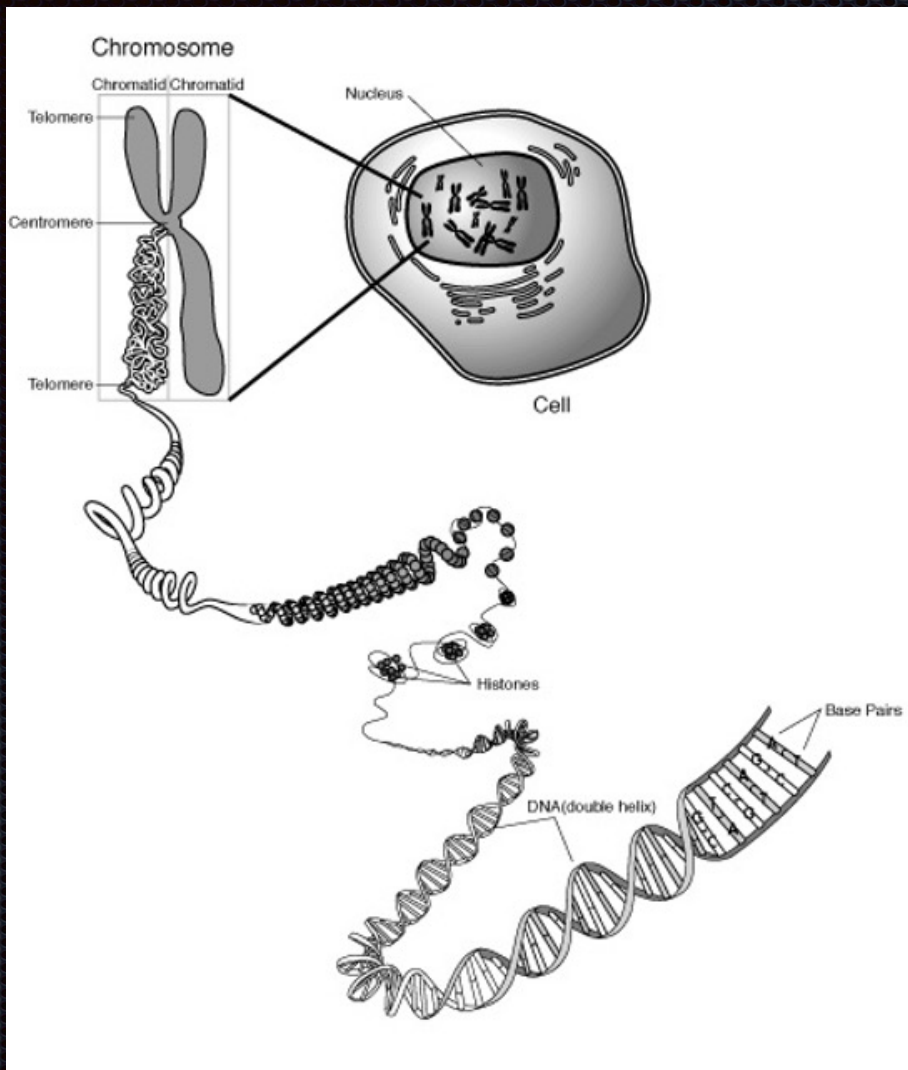
**COLLÈGE FRANÇAIS
D'ÉCHOGRAPHIE
FOETALE**

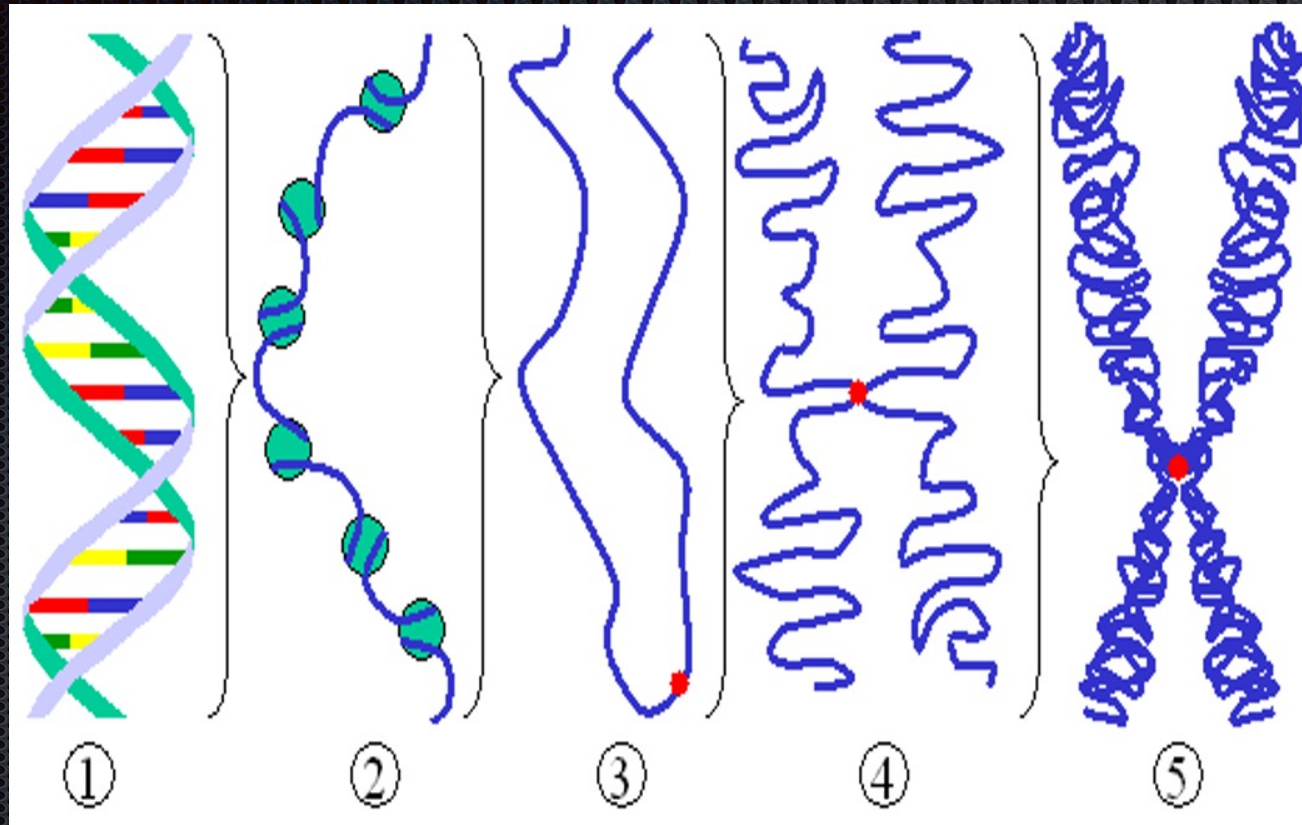
- Toutes les cellules animales sont constituées des mêmes parties principales.



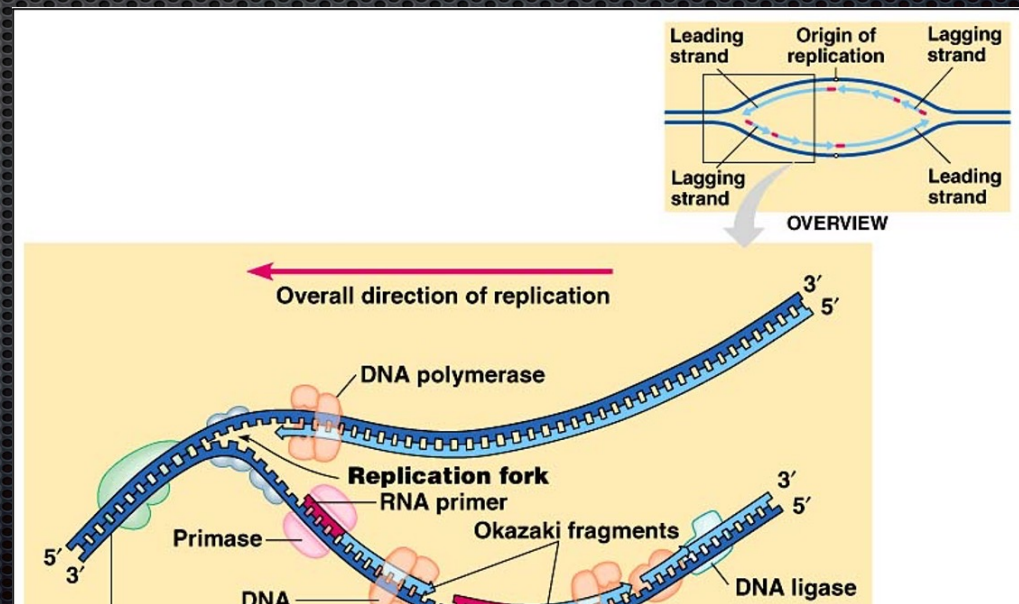
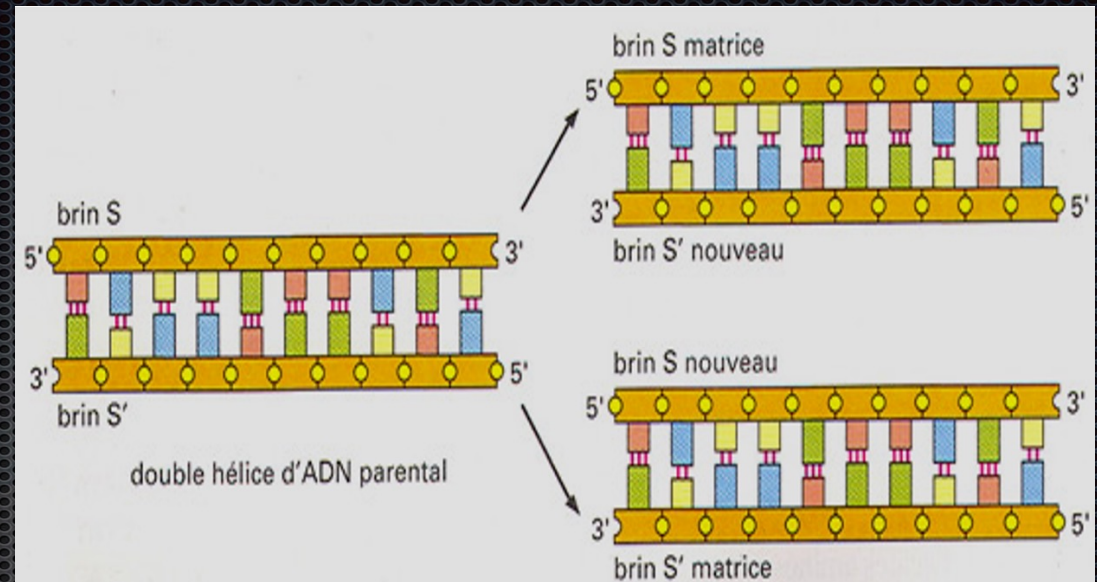
- Le noyau contient le matériel génétique de chaque individu. C'est dans le noyau que l'on trouve les chromosomes.





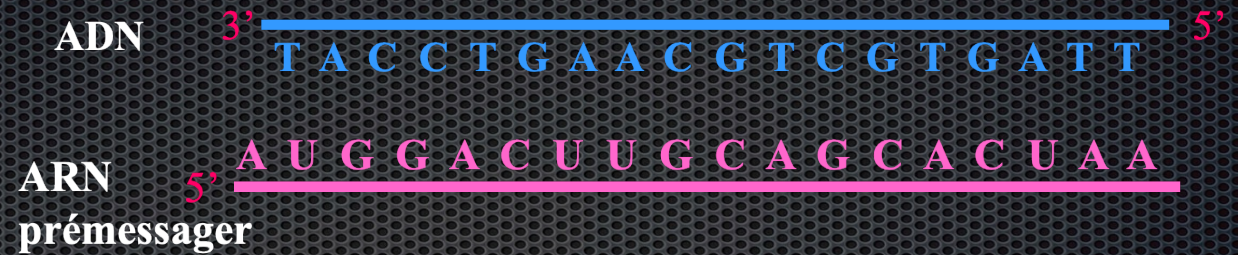


La réplication ou Duplication



La transcription

ADN → ARN prémessageur



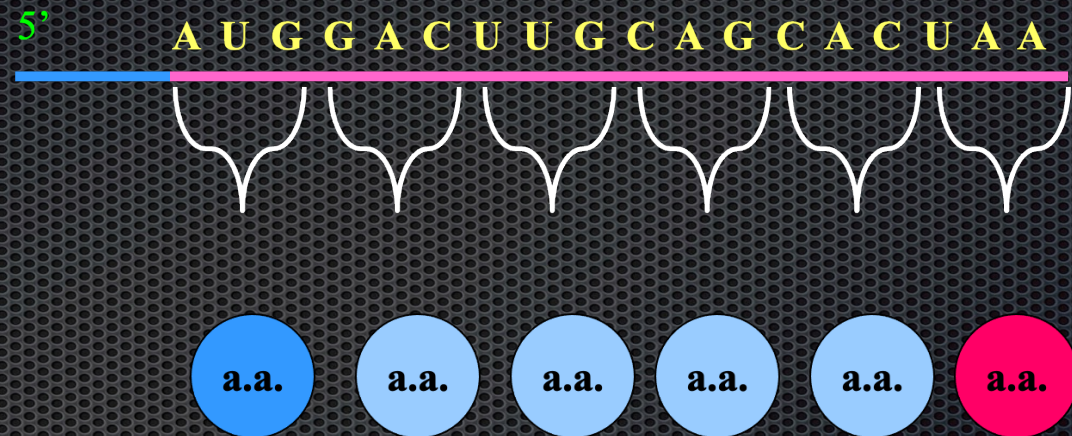
Maturation de l'ARN



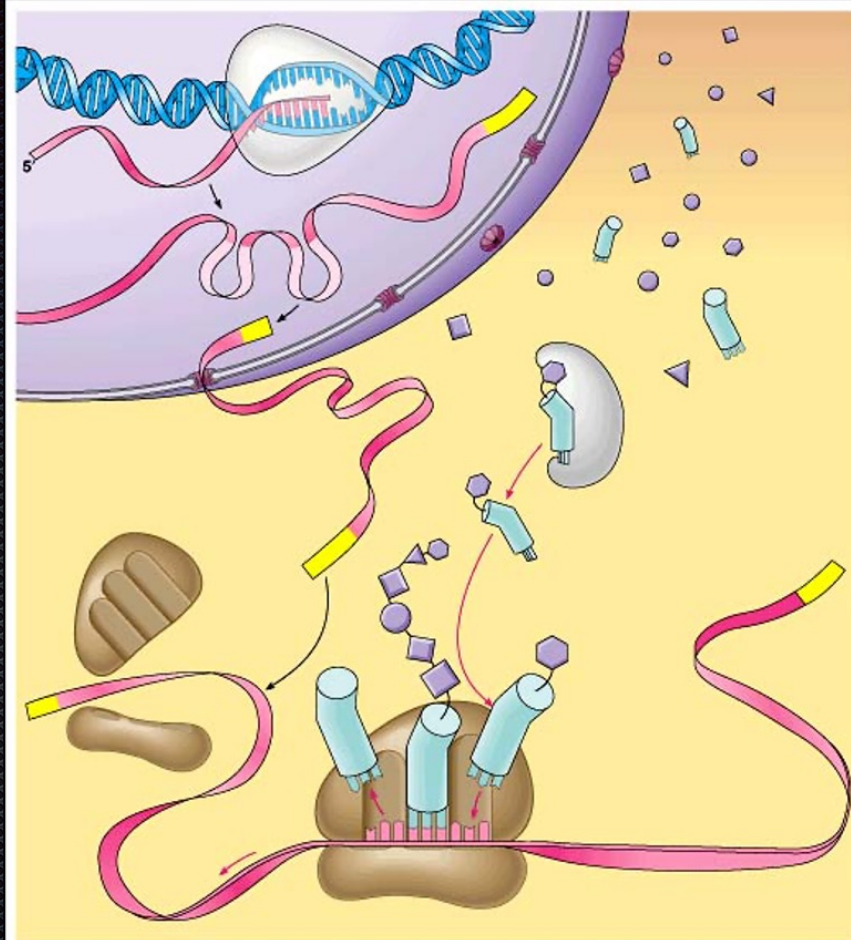
La traduction

		Second base				
		U	C	A	G	
First base (5' end)	U	UUU Phe UUC UUA Leu UUG	UCU UCC Ser UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC UGA Stop UGG Trp	Third base (3' end)
	C	CUU Leu CUC CUA CUG	CCU CCC Pro CCA CCG	CAU His CAC CAA Gln CAG	CGU CGC Arg CGA CGG	
	A	AUU Ile AUC AUA AUG Met or start	ACU ACC Thr ACA ACG	AAU Asn AAC AAA Lys AAG	AGU Ser AGC AGA Arg AGG	
	G	GUU Val GUC GUA GUG	GCU GCC Ala GCA GCG	GAU Asp GAC GAA Glu GAG	GGU GGC Gly GGA GGG	

ARNm → Polypeptide

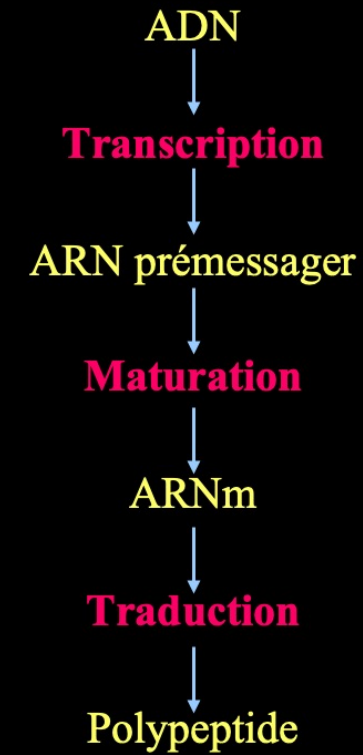


LA RELATION ENTRE GÈNES ET PROTÉINES



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Gène → protéine

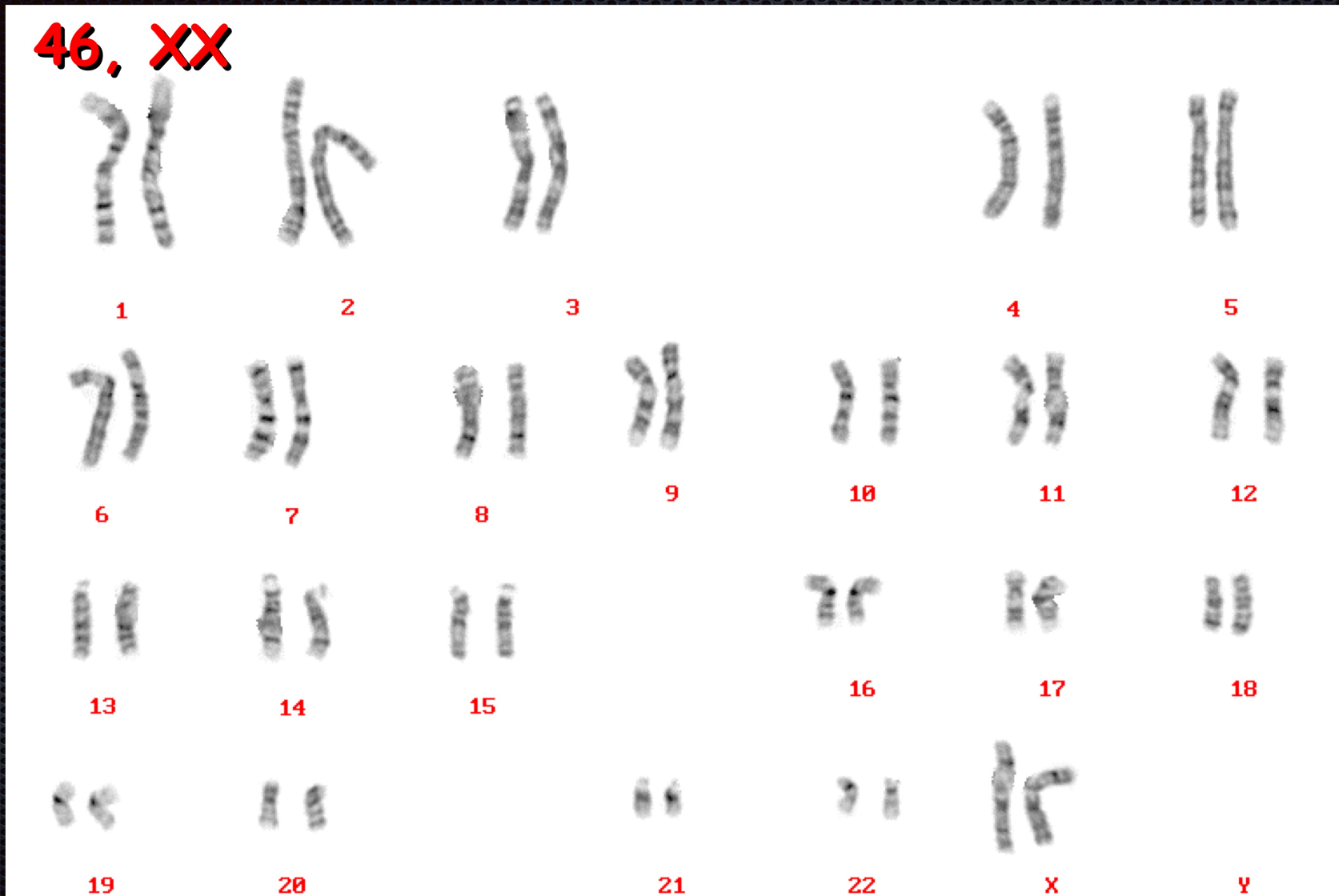


Campbell – Fig. 17.26

CARYOTYPE

CARYOTYPE NORMAL (GTG)

46, XX





Applications en GYN OBS

Reproduction: Aménorrhée primaire, Azoospermie
FCS à répétition

CGH array

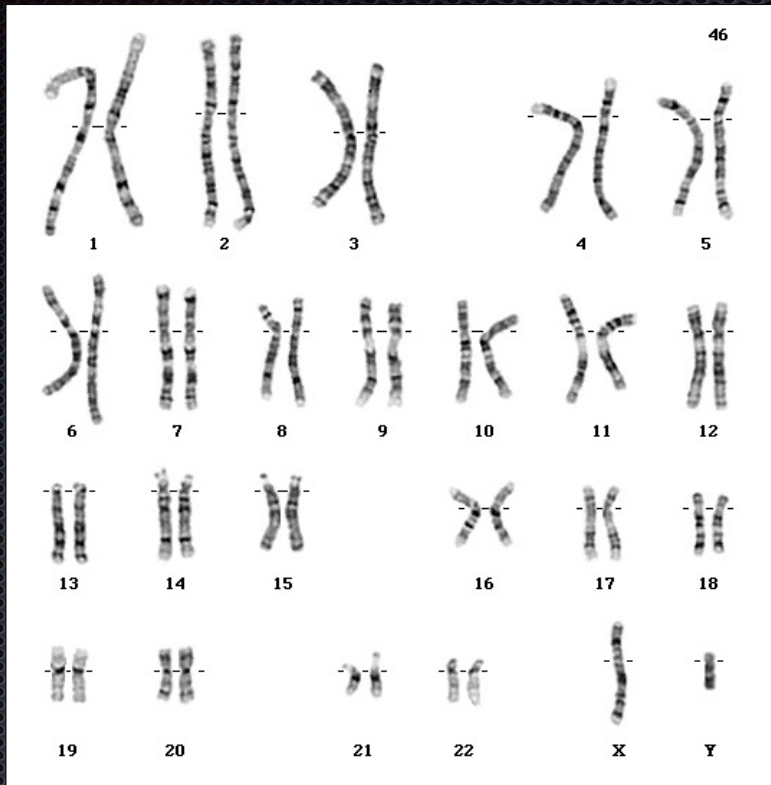
TERMINOLOGIE

Array comparative genomic hybridization
(CGH array, array CGH, a-CGH ou aCGH)

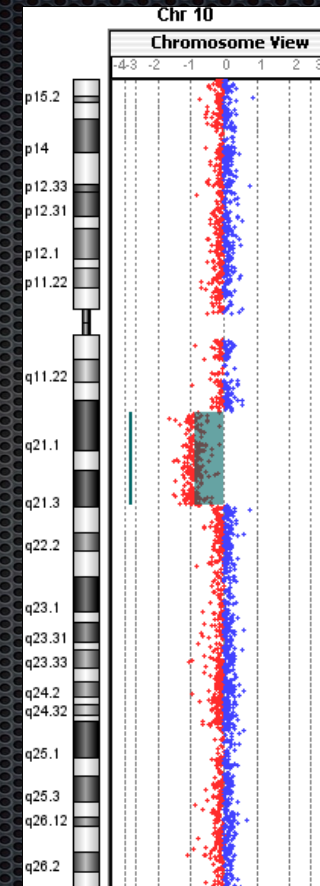
Caryotype moléculaire

HGC sur micro réseau d'ADN

Analyse Chromosomique sur Puce à ADN



Caryotype
 Étude globale du génome
 Résolution: 5-10 Mb
 ($5 \cdot 10^6$ paires de bases)



CGH array
 Étude globale du génome
 Résolution: 1kb – 1 Mb
 (1000 paires de bases pdb - 10^6 pdb)

CGH array

Étude globale du génome

Résolution: 1 kb – 1 Mb

(1000 paires de bases – 10^6 paires de bases)



Chromosome 7

159 Mb

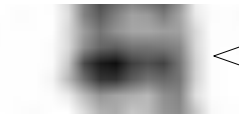
($158 \cdot 10^6$ paires de bases)

chromosome entier

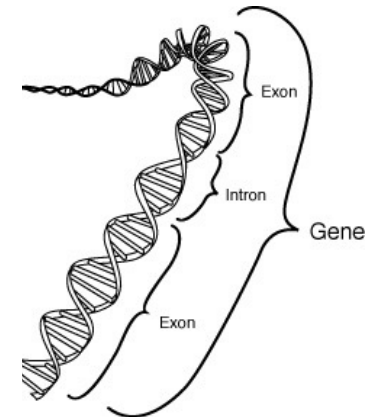
5-10 Mb

($5\text{-}10 \cdot 10^6$ paires de bases)

Bande chromosomique sur
caryotype standard

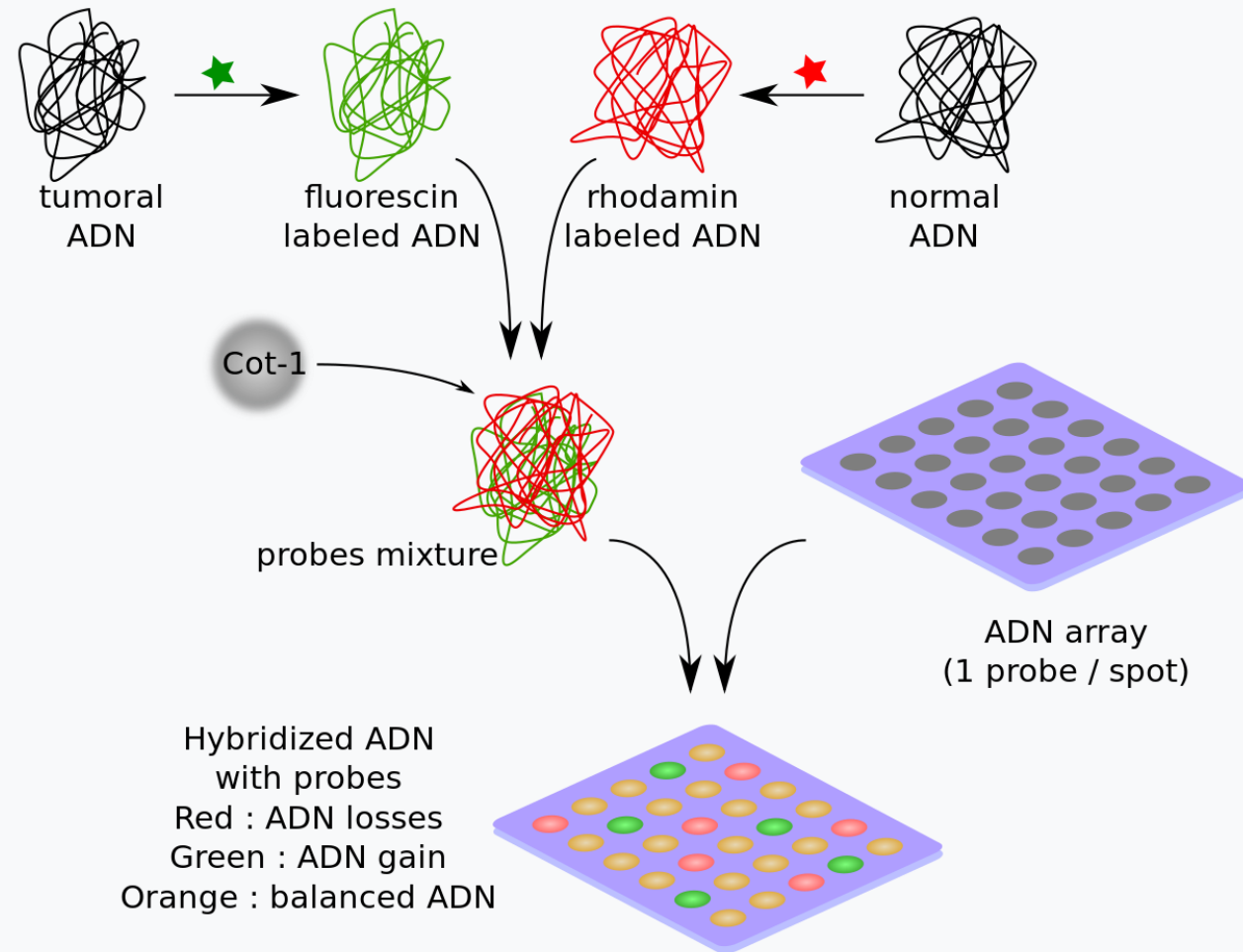


~9 gènes / Mb



~ 0.03 Mb (30
000 paires de bases)

Gène



Principe de la puce d'hybridation génomique comparative



Avantages de la CGH array

Détection de plus de **12%** d'anomalies chromosomiques cryptiques

(non visibles sur le caryotype) chez les foetus ayant des malformations
congénitales

CNVs (Copy Number Variants)

Segment d'ADN > 1kb présent en un nombre variable de copies en
comparaison d'un génome de référence

Le terme de CNV est apparu avec le développement de la CGH array

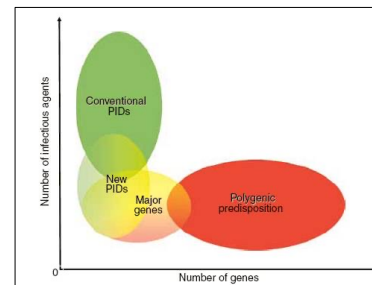
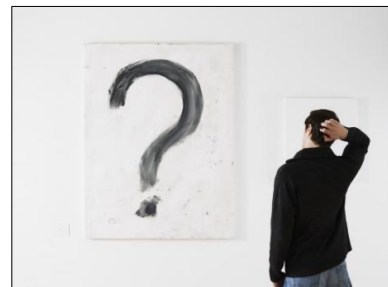
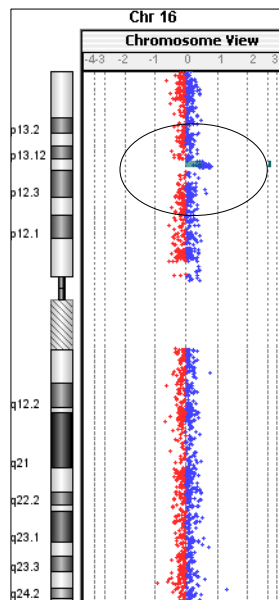
Avantages de la CGH array en prénatal

- Une recherche plus rapide des anomalies chromosomiques
 - Examen réalisé à partir de cellules amniotiques ou de villosités chorales non cultivées
 - Résultat en moins de 7 jours
- Détection d'anomalies chromosomiques cryptiques pathogènes
- Meilleure caractérisation du déséquilibre génomique identifié (taille et contenu en gènes)

Limites de la CGH array en prénatal

Détection d'anomalies chromosomiques (CNVs)

- Impact clinique difficile à prédire
- Facteurs de susceptibilité à des troubles neuropsychiatriques / à un déficit intellectuel / à l'autisme....
- Découverte fortuite et non reliées au phénotype



1773 foetus

Indications	Nombre de foetus	%CNV pathogènes
Hypoplasie cérébelleuse	n=30	16.7%
Holoprosencéphalie	n=53	15.1%
Anomalies squelettiques	n=60	13.3%
Pieds bots / mains bottes	n=59	13.6%

Détection d'anomalies chromosomiques cryptiques / difficiles à visualiser sur le caryotype

Patiente âgée de 27 ans G1 P0 Frère spina bifida
12 SA1/2: Clarté nucale à 3.4 mm
Risque combiné 1/120
DPNI négatif

24 SA : Foetus EPF>99 ème centile, pyélectasie bilatérale



ACPA : Délétion 22q13 5,3 MB Sd de Phelan McDermid de Novo

Dans environ 38% des cas, l'étude du caryotype foetal et /ou ACPA permet de déterminer la cause du trouble

Mais dans « plus de 60% de ces grossesses il n'y a pas de diagnostic et aucun élément pouvant orienter un conseil génétique

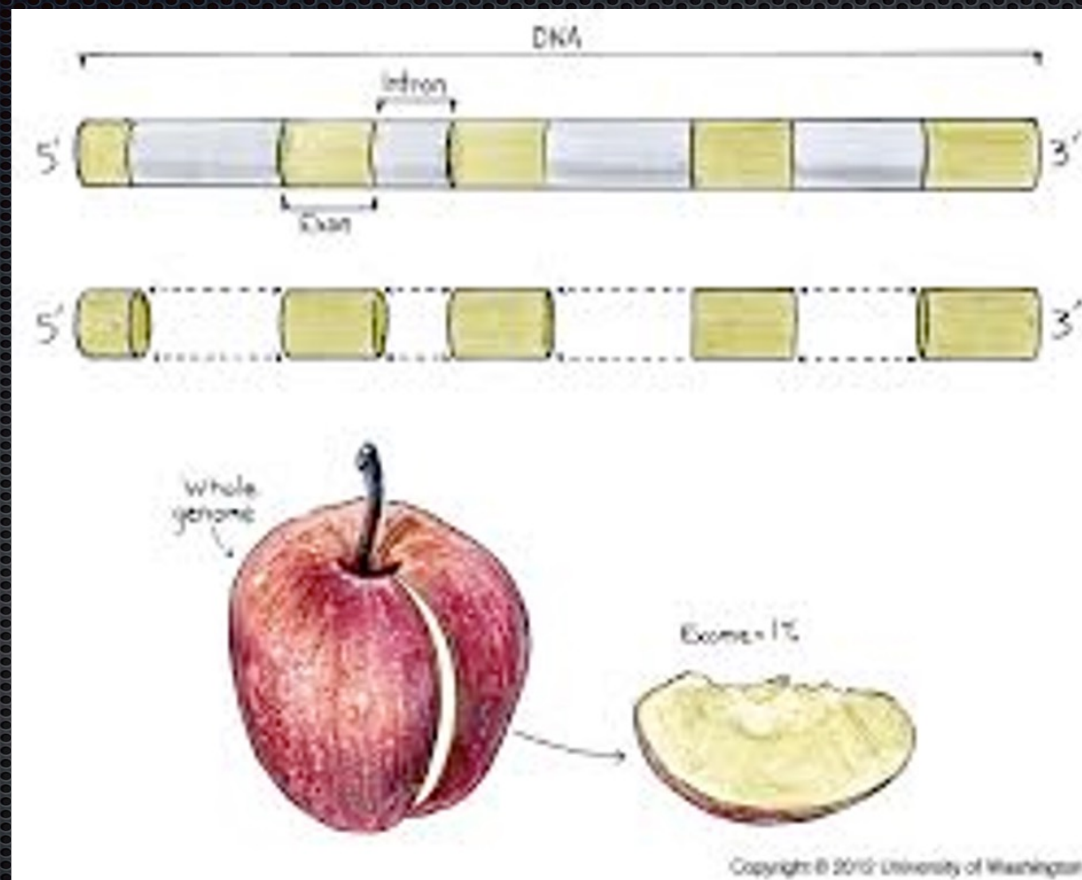
Séquençage EXOME

WES

Un exome est une partie du matériel génétique (génom) qui contient des exons.

C'est la partie du génome qui détermine l'anatomie.

Etude des séquences codantes, 1% du génome
Site principale des mutations

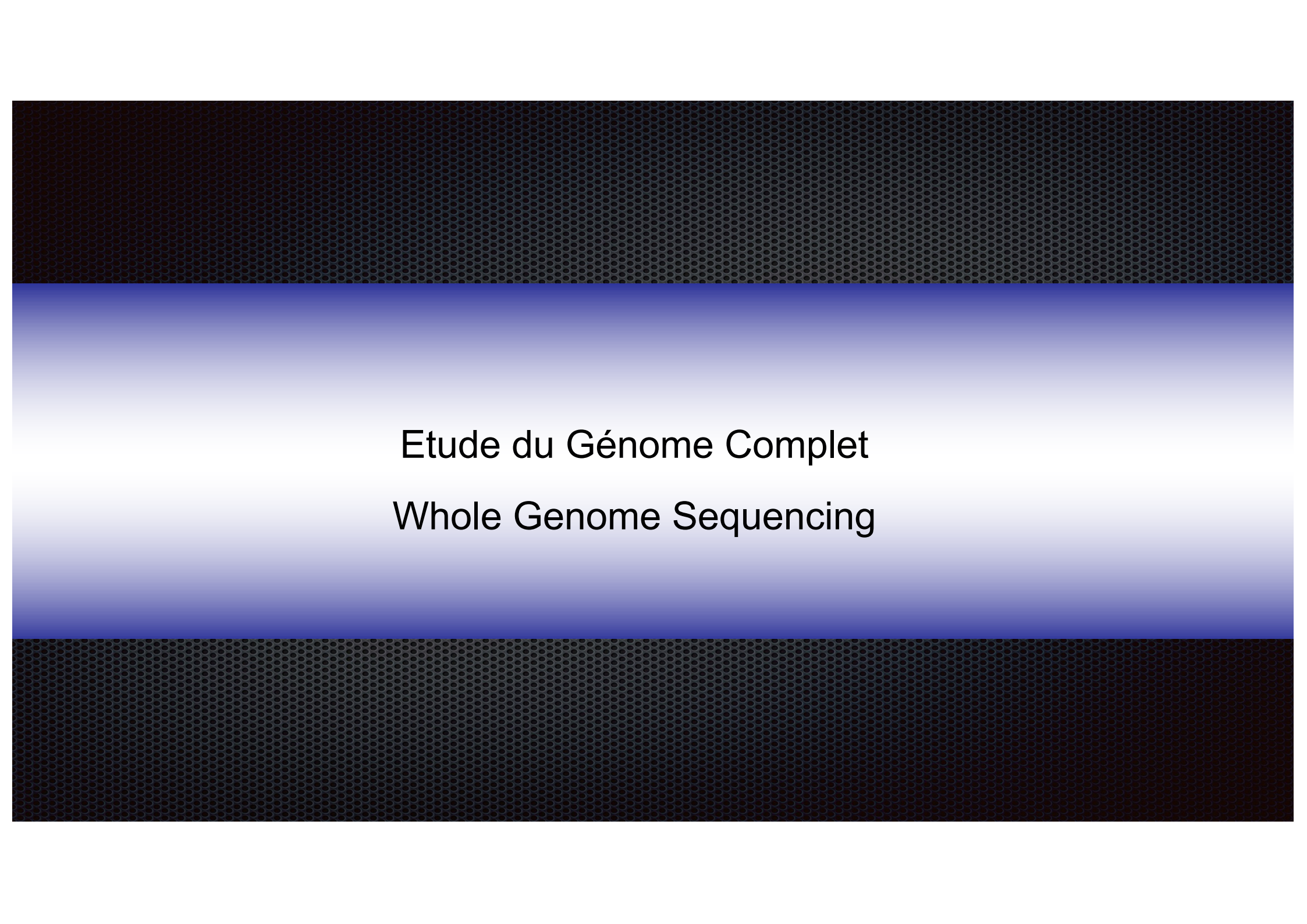


Le séquençage de l'exome entier (WES) est le séquençage des exons qui comportent tous les gènes codant pour les protéines du génome.

Le séquençage de l'exome entier comprend deux étapes:

- La première consiste à cibler les séquences dans l'exome humain uniquement. (En génétique humaine, ces régions cibles représentent environ 60 millions de paires de bases, soit environ 1 % du génome humain de référence.)
- La deuxième étape consiste à séquencer l'ADN à l'aide de n'importe quelle plateforme de séquençage d'ADN à haut débit et à analyser les résultats.

Le WES permet de rechercher des variations ponctuelles
au niveau de la séquence codante de tous les gènes identifiés
dans le génome humain
ainsi que les délétions ou duplications (CNV),
avec une performance comparable à celle de l'analyse par ACPA.

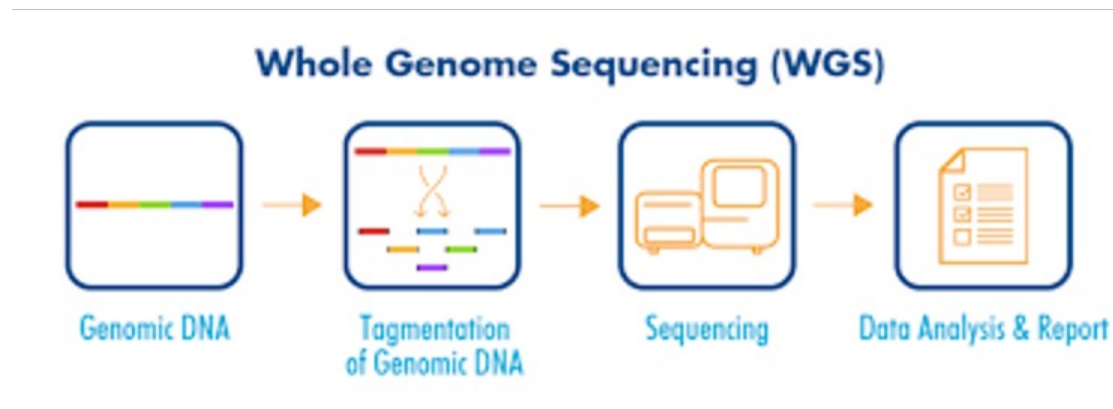


Etude du Génome Complet

Whole Genome Sequencing

Intérêt du whole génome

- ▣ Recherche les mutations rares, hors des exons
 - Mutations du promoteur
 - Mutations introniques



Whole Genome Sequencing

- All you need to know



Whole Genome Sequencing vs Exome Sequencing

More Information Online WWW.DIFFERENCEBETWEEN.COM

	Whole Genome Sequencing	Exome Sequencing
DEFINITION	A technique that sequences the precise nucleotide order of the entire genome.	A technique that sequences the nucleotide order of the protein-coding genes (exome).
COST	High cost	Low cost
SEQUENCING INTRONS	Yes	No
TIME	Time-consuming	Comparatively lesser time is spent to perform exome sequencing.
USE	To look for genetic aberrations (g., single nucleotide variants, deletions, insertions and copy number variants).	Detection of rare and common genetic variants in humans.

Next-Generation Sequencing

Le NGS est particulièrement avantageux pour le séquençage ciblé, où des régions d'intérêt spécifiques sont amplifiées et séquencées de manière sélective.

Le NGS, ou aussi séquençage à haut débit: Utilisation de plateformes de séquençage massivement parallèles qui peuvent séquencer simultanément des millions de fragments d'ADN.

Exemples
Indication +++ dans les MOC, Rasopathies,

NGS vs WGS

More Information Online WWW.DIFFERENCEBETWEEN.COM

	NGS	WGS
DEFINITION	NGS is a massively parallel second-generation sequencing technology that is high throughput, low cost, and speedy	WGS is a comprehensive method of analyzing the entire genomic DNA of a cell at a single time by using various sequencing techniques
GENERATION OF THE SEQUENCING TECHNIQUE	Consists of only second-generation sequencing methods	Consists of first, second, and third generations sequencing methods
SPECIFIC SEQUENCING TECHNIQUES	Illumina sequencing, Roche 454 sequencing and ion torrent sequencing	Sanger sequencing, short gun sequencing, next generation sequencing, SMRT sequencing, pyrosequencing, and nanopore sequencing
PROCESS	Involves three basic steps: DNA fragmentation, sequencing the libraries, and data analysis	Involves identifying the order of bases of the whole genome in a single process, comparing the DNA sequence to a standard reference, and identifying the variations
SEQUENCING WHOLE OR PART OF THE GENOME	Does not sequence the whole genome	Entails sequencing all of an organism's chromosomal DNA
COST	Low cost method compared to WGS	High cost method compared to NGS
SPECIFIC SEQUENCING TECHNIQUES	De novo genome sequencing, whole-genome sequencing, transcriptome analysis, small RNA and micro RNA sequencing, targeted resequencing, whole-exome sequencing, etc.	Gene sequencing at SNP level to pinpoint functional variants in association studies, therapeutic intervention in personalized medicine, evolutionary biology, comparative genomic analysis, mutations and rearrangements studies, rare variant association studies, predicting disease susceptibility and drug response, etc.

Limites et difficultés

Patiente âgée de 42 ans G5 P3

1 garçon et 2 filles (respectivement 20; 18 et 12 ans)

12 SA+2: Clarté nucale à 4.4 mm, suspicion Cardiopathie

PVC ; ACPA RAS

18 SA1/2: D Faciale, rétrognatisme, Fente palatine, microtie, colobome rétinien;

Crosse aortique droite, cardiomégalie

hypospadias,

23 SA : Hypotrophie rénale bilatérale, LA en nette diminution, Image liquidienne anormale intra-abdominale

dyskinésie calleuse, hétérotopies péri-ventriculaires

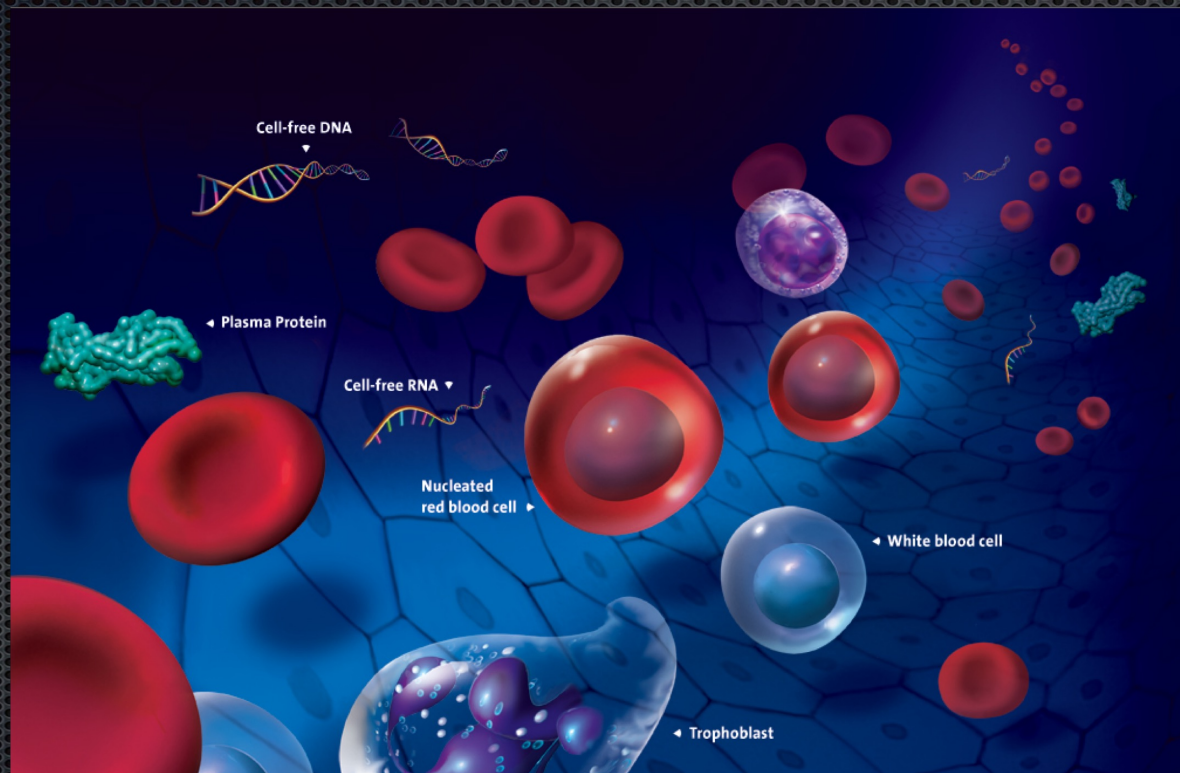
Pas de désir ni de demande d'IMG (acceptée dès 18 SA par le CPDPN)

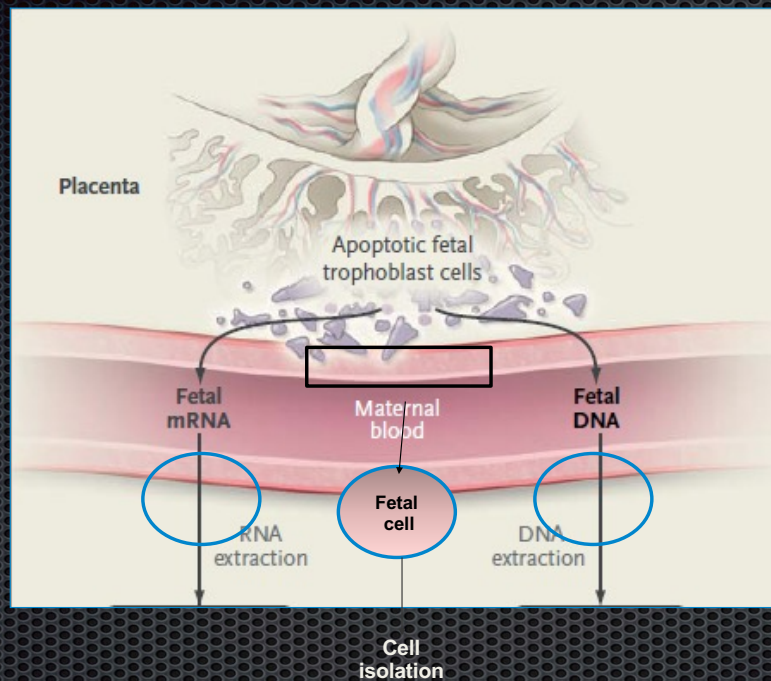
Exome en trio : RAS pour le Conjoint et sur LA

mais découverte d'une mutation BRCA 2 chez la patiente

DPNI

Notion connue depuis le début du XXème siècle



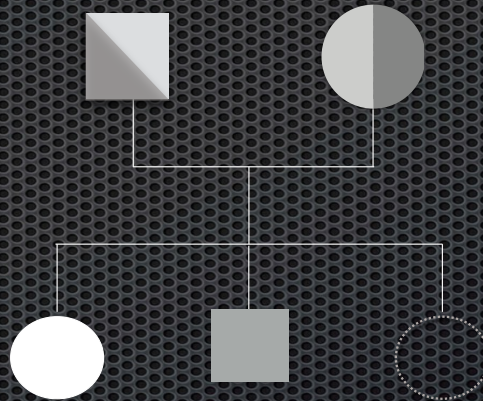


- ❑ Source: Cellules trophoblastiques
- ❑ Detection $\approx$ 5-6 SA
- ❑ Disparition rapide après accouchement
- ❑ Ne persistent pas après une grossesse

According Bodurtha J, Strauss JF III. *N Engl J Med* 2012;366:64-73.
 According J.M Costa

- *Mais le développement de la PCR en 1989-90 et surtout la mise en évidence de la séquence SRY dans le sang maternel de gestantes d'un fœtus de sexe masculin a permis de confirmer ces hypothèse et d'ouvrir la voie à cette piste de recherche*

**voire aussi pour débuter un traitement maternel dans le cas
d'hyperplasie congénitale des surrénales**



ANALYSE PAR SÉQUENCAGE PARRALLÈLE MASSIF (MPS)



TCCGCCAGGCCATGAGGGAC●GGAAATGGCTGAT
x9 10+6/sample

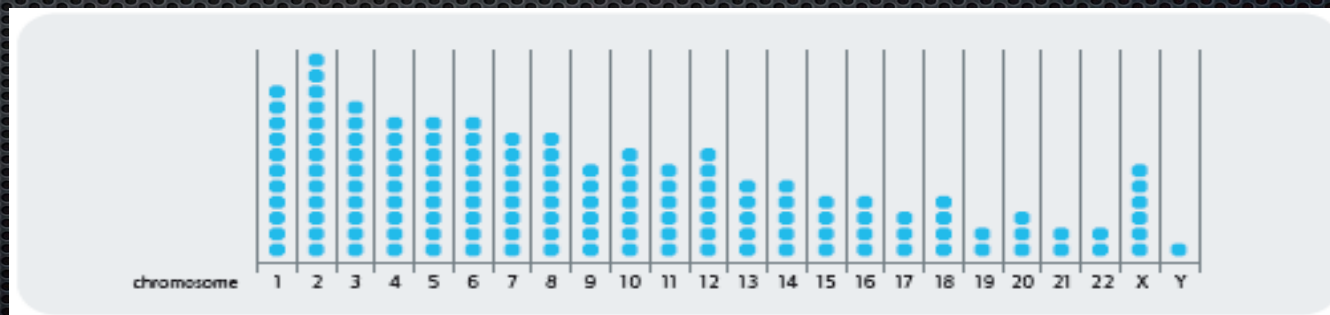
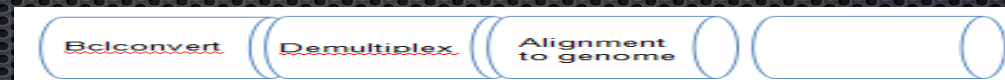
Calcul de la fraction du Ch 21

= % seq de 21 par rapport au total du séquençage de tous les chromosomes

Puis Calcul du Z-score

= $\frac{\%21_{\text{moyenne de l'échantillon}} - \%21_{\text{reference}}}{\text{DS}}$
mediane%21reference

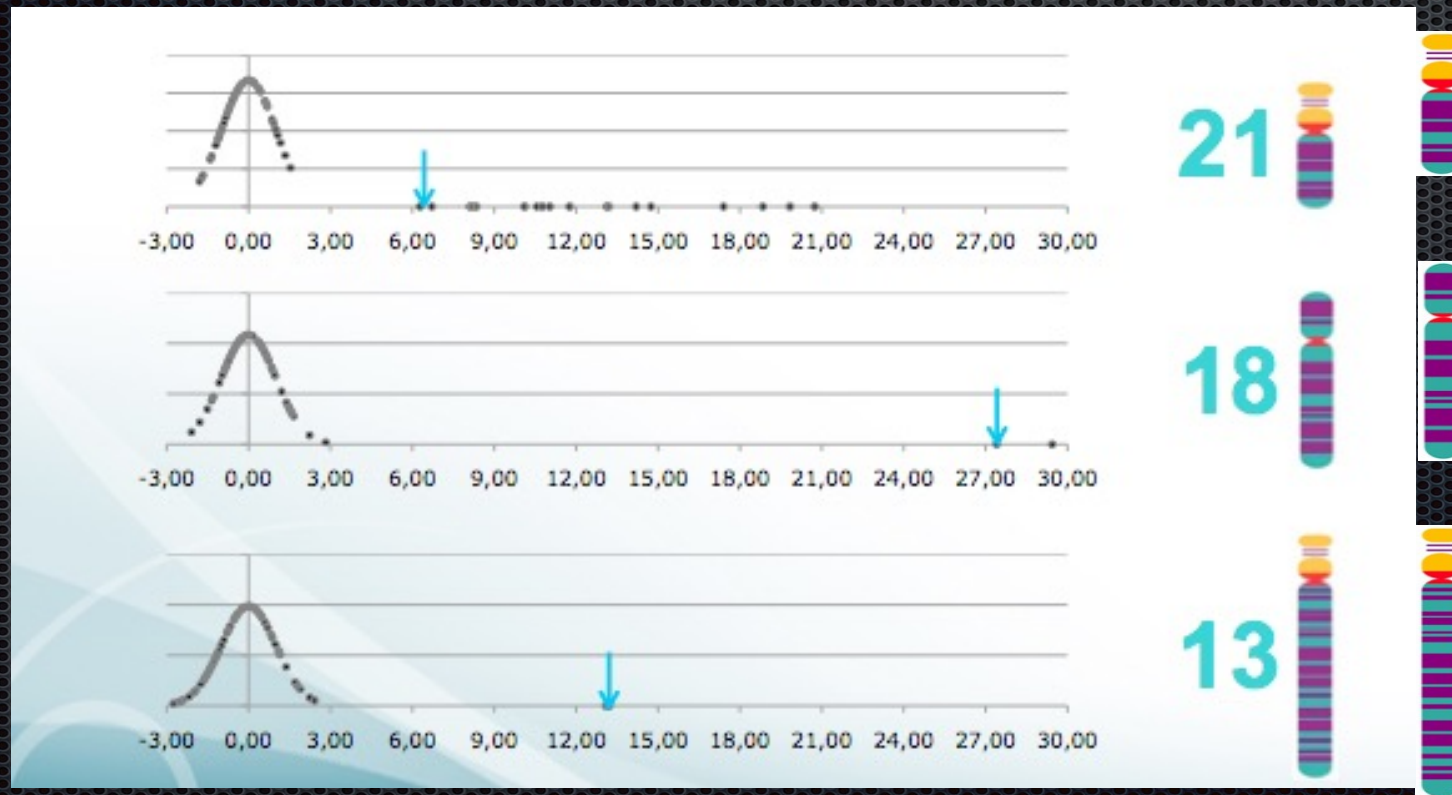
Interpretation



According J.M Costa

ANALYSE PAR SÉQUENCAGE PARRALLÈLE MASSIF (MPS)

Un Z-score de 3 signifie que la valeur de la mesure est déportée de 3 DS de la cible.
La probabilité de trouver ce chiffre de façon physiologique (non pathologique) est de 0,17% pour une population normale

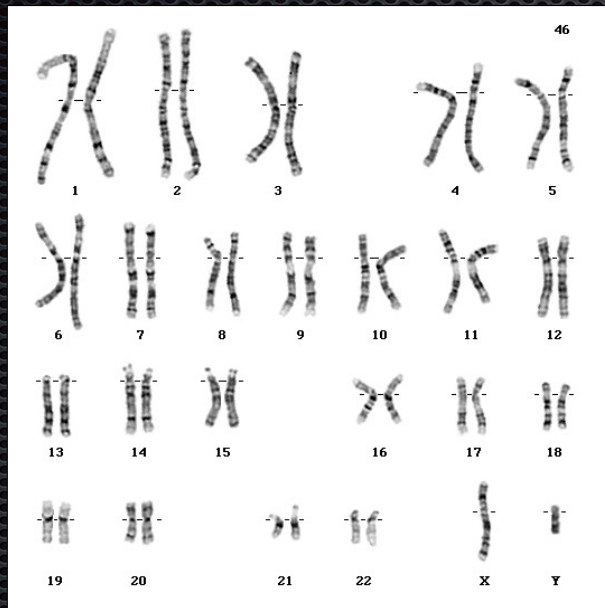


According J.M Costa

Tests d'ADN libre circulant pour le dépistage des aneuploïdies

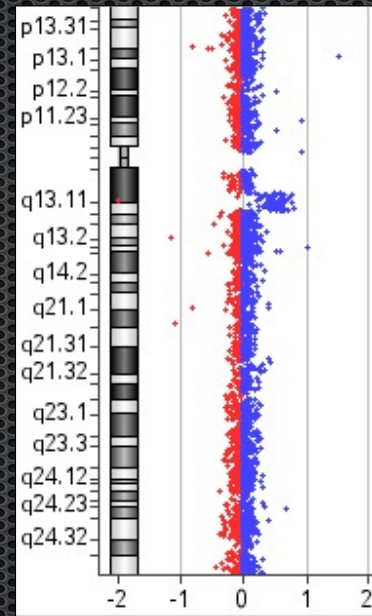
Pas une étude globale du génome contrairement au caryotype et à la CGHarray

Caryotype



Étude **globale** du génome

CGHarray



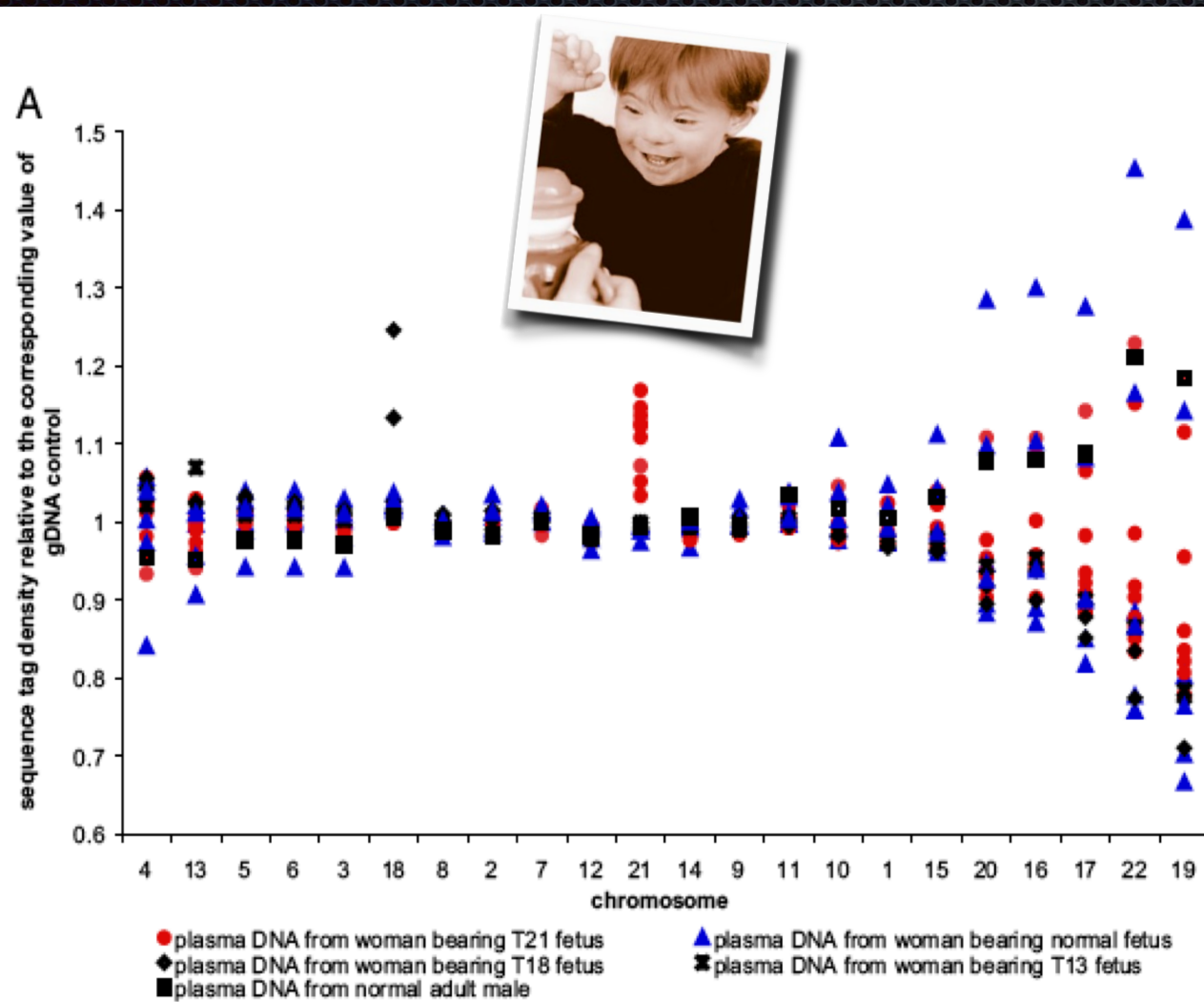
Étude **globale** du génome

ADN foetal lc



Étude **ciblée** du génome

T21/T18/T13/ dysgonosomies +/- Sd
microdélétionnels



Séquencage haut débit

Technique fiable aussi pour la trisomie 13 et 18

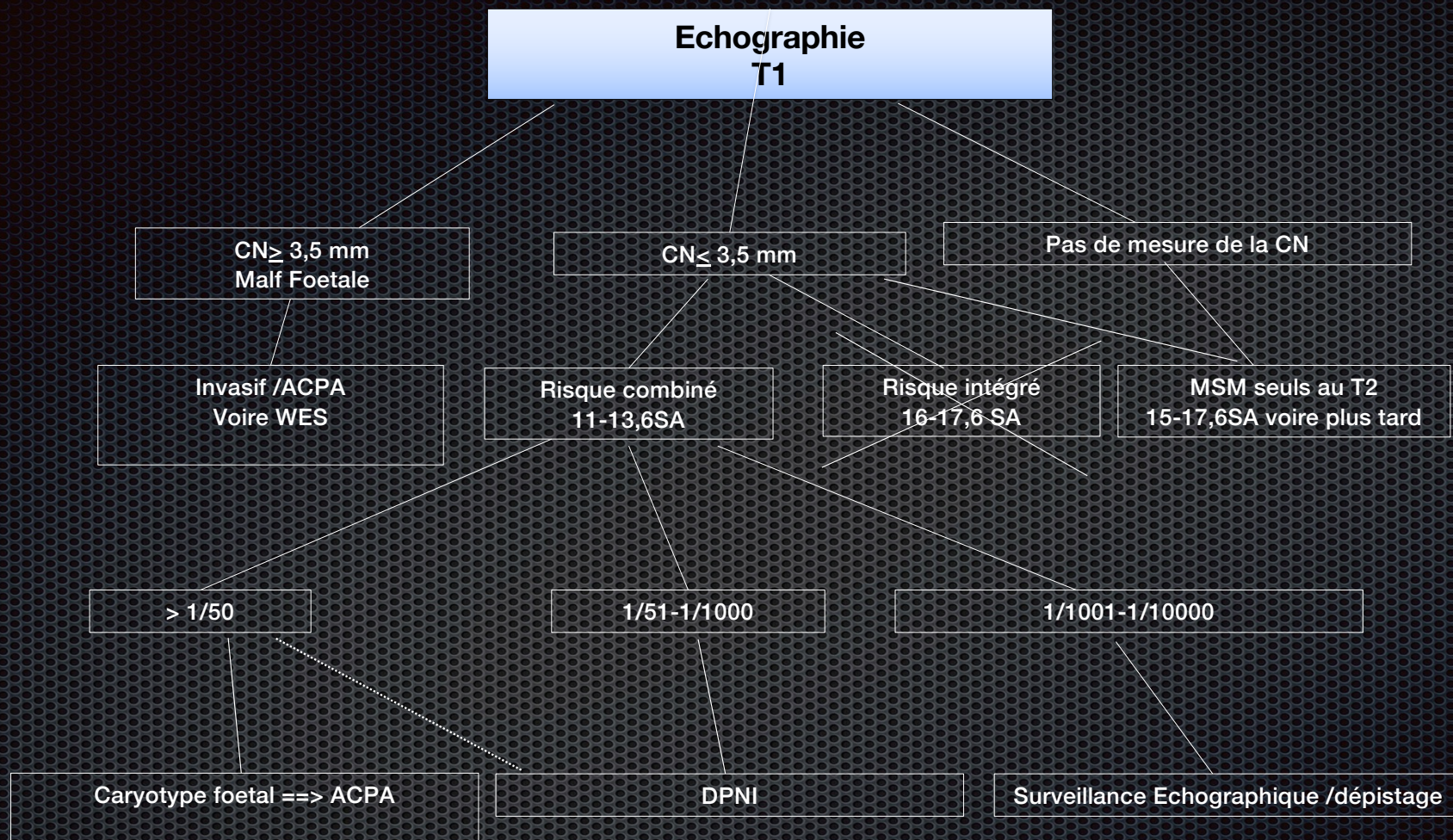
Puis pour les CNVs surtout si > 7 Mb
Délétion et duplication

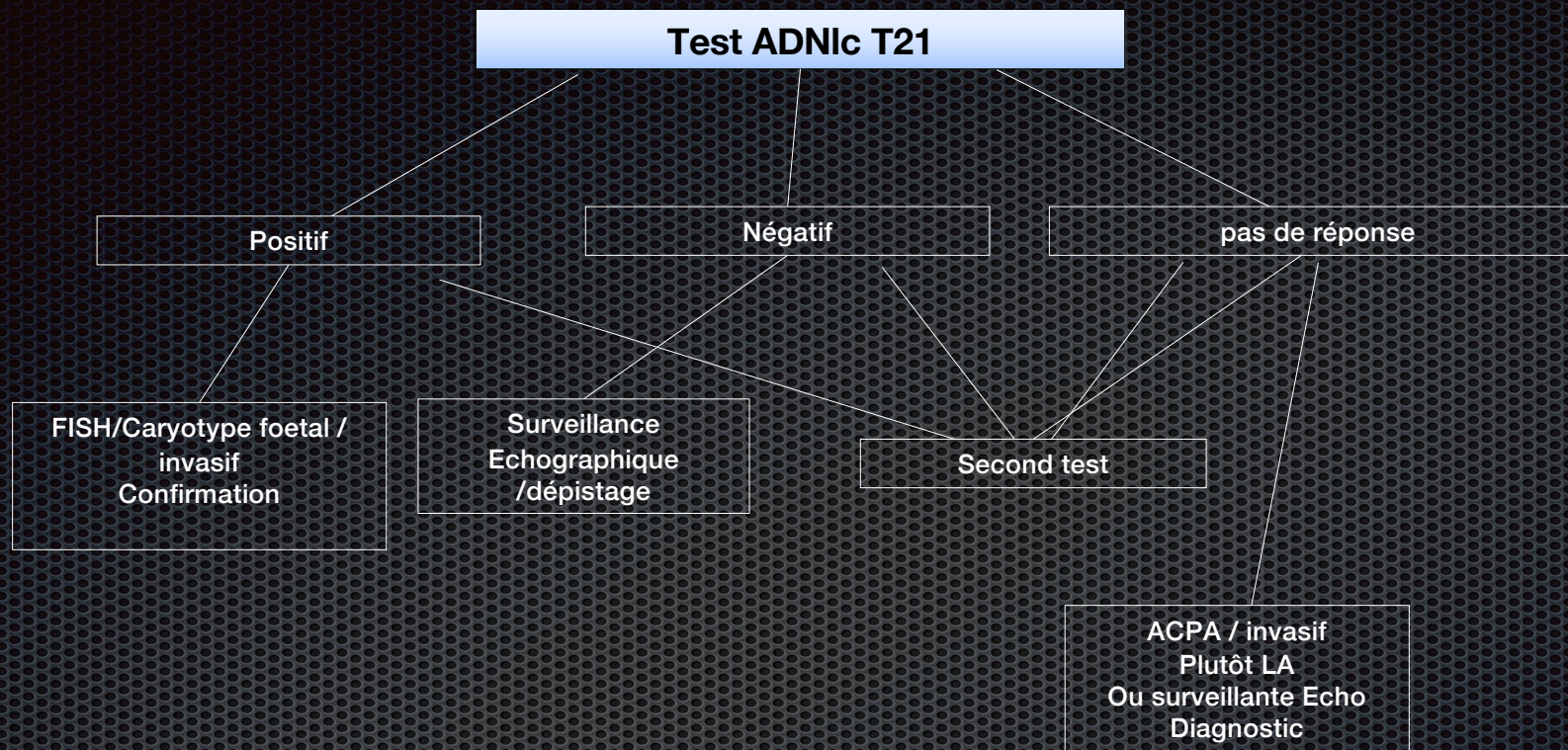
Et par conséquence d'autres anomalies foetales

Les anomalies des gonosomes

T16, T22

1p-, 22q-, 4p-, 8q-...



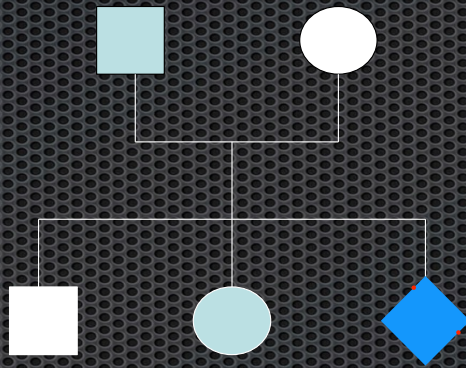


- *DPNI possible :*
 - *Grossesse multiples*
 - *ATCD grossesse avec An Chromosomique autosomique foetale*
 - *Selon conseil génétique parent porteur d'une TR*

- *Si grossesse de découverte tardive :*
 - *Pensez aux MSM tardifs (Jusqu'à 35 SA) ET DPNI si risque $\geq 1/1000$*

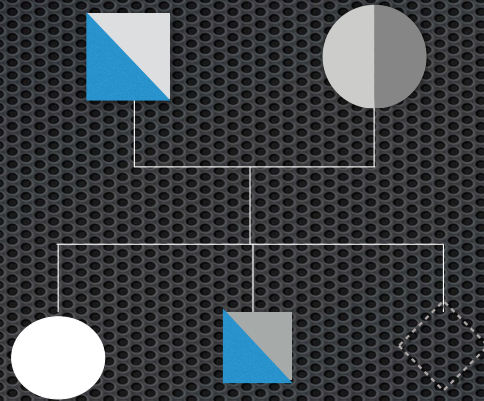
Elargissement des indications notamment dans
les indications de maladies monogéniques

pathologie dominante autosomique portée par le conjoint,



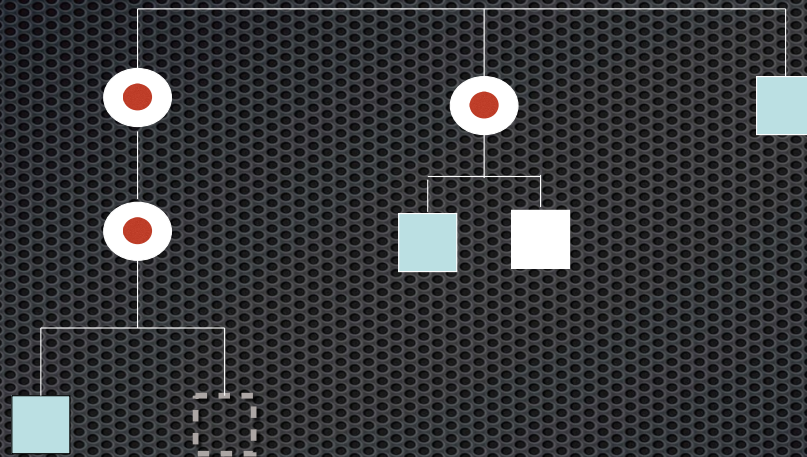
Par exemple STB, NF1.....

*pathologie récessive mais avec des mutations
différentes chez les parents*

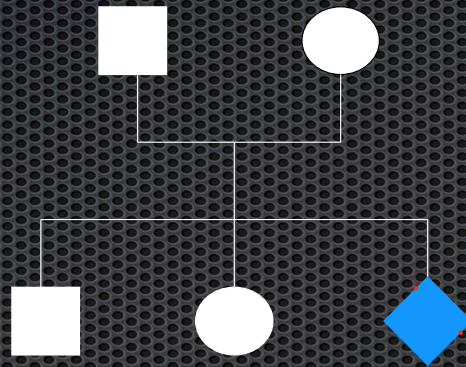


**Par exemple CF, Myopathie des
ceintures**

Maladie récessive liée à l'X



*Aussi sur signes d'appel échographique lors d'une suspicion
d'une pathologie monogénique, fruit d'une néomutation*



Achondroplasie (mutation du gène FGFR3)



En pratique

- Nécessité d'une Consultation pré-conceptionnelle ?

Couple à risque



Test ADN foetal possible dès 6 à 10 SA, en vue d'un diagnostic, d'une thérapeutique ou bien de prévoir la gestion du premier trimestre

- Hyperplasie congénitale des surrénales
- Mucoviscidose
- ATCD d'anomalie chromosomique (Translocation, microdélétion...)

Couple non à risque



Echographie T1

Signes d'appel :
CN > 3,5 mm.
Malformation foetale



Discussion CPDPN ==>
DPN « invasif » : ACPA et surveillance échographique
Si plus d'une anomalie faire WES

Pas de signes d'appel :
Risque combiné :
si $\geq 1/1000$ Informations++++++
Faire DPNI ELARGI

Echographie T2 et T3

```
graph TD; A[Echographie T2 et T3] --> B[RCIU non vasculaire sans malformation ==> CPDPN et ACPA ( Et Viro)]; A --> C[Polymalformations ACPA puis WES Si orientation spécifique : Demande d'un gène ( ex Sd JOUBERT ) NGS :ex Rasopathie, MOC Si pour confirmation DPNI faire FISH];
```

RCIU non vasculaire
sans malformation
==> CPDPN et
ACPA (Et Viro)

Polymalformations
ACPA puis WES
Si orientation spécifique :
Demande d'un gène (ex Sd
JOUBERT)
NGS :ex Rasopathie, MOC
Si pour confirmation DPNI faire
FISH

CONCLUSIONS

- Consultation pré-conceptionnelle
- MSM et DPNI mais si pas de signe d'appel échographique (Si positif FISH)
- SI invasif en vue d'ACPA et/ou WES :
prélèvement en TRIO ++++
- De moins en moins de place pour le Caryotype en première intention
- pluridisciplinarité : l'échographie reste un pivot indispensable (et de plus en plus dès le premier trimestre)

- Globalement de plus en plus de place pour la génétique et la génétique moléculaire
- **En prénatal** : Risque combiné, DPNI, FISH, Caryotype, Génopathie ciblée, ACPA , Exome,NGS
- **Reproduction**: Caryotype , NGS dans IOP, infertilité masculine et féminine
- **Oncogénétique** : Théranostique, prévention pour les apparentés, HBOC et plus
- **Pluridisciplinarité** : Gynéco-Obstétriciens, Oncologues, Echographistes, généticiens, conseillers en génétique, Pédiatre, neurologues, cardiologues, radiologues
....