

Titre : Validation d'une méthode non-invasive de Diagnostic Prénatal (DPN-NI) de la Trisomie 21 par analyse génétique des cellules trophoblastiques circulantes (CFTC)

Investigateur coordonnateur : Prof. Patrizia Paterlini Bréchet, Praticien Hospitalier, Laboratoire de Biochimie A, Hôpital Necker Enfants Malades, 149 rue de Sèvres 75743 Paris

Responsable Scientifique : Prof. Patrizia Paterlini Bréchet, Unité INSERM 807, Faculté de Médecine Necker, 156 rue de Vaugirard, 75015 Paris

Promoteur : Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, DRCD, Carré Historique de l'Hôpital Saint Louis – 1 avenue Claude Vellefaux 75475 PARIS Cédex 10

Unité de Recherche Clinique – Paris Centre (Pr Jean-Marc Treluyer, Dr Raphaël Serreau), Pavillon Blumenthal, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 rue de Sèvres 75743 Paris

Biostatistique et Information médicale (Pr Paul Landais), responsable : Dr Jean-Philippe Jaïs, Hôpital Necker Enfants Malades, 149 rue de Sèvres 75743 Paris

Centres d'investigation:

1. Hôpital Necker Enfants Malades, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris. Investigateur du Centre Prof. Patrizia PATERLINI BRECHOT

2. Hôpital de Poissy Saint-Germain, 10, rue du Champ-Gaillard – 78300 POISSY - Investigateur du Centre : Dr Patrick ROZENBERG -

3. CHU de Nice - Hôpital de l'Archet 2 - BP 3079 - 06202 NICE Cédex 3 - Investigateur principal du centre : Pr André BONGAIN

Résumé

Justification de la recherche : En France environ 36.000 amniocentèses sont réalisées chaque année, ce qui implique la perte iatrogène d'environ 700 enfants sains par an. Ces chiffres illustrent l'importance du développement d'une méthode non invasive de Diagnostic Prénatal (DPN-NI) de la Trisomie 21.

Notre équipe a obtenu des résultats importants et compétitifs dans le domaine du Diagnostic Prénatal non invasif (DPN-NI) [1] [2] [3] et réalisé la première validation clinique d'une méthode non invasive pour le DPN d'une maladie génétique, l'Amyotrophie Spinale[4]. Nous avons ensuite étudié la cinétique d'apparition des CFTC dans le sang maternel[5].

Objectif : validation clinique d'une méthode non invasive de DPN de la Trisomie 21.

Méthode : Nous avons mis au point une méthode de DPN-NI de la Trisomie 21 par CGH (Comparative Genomic Hybridization) appliqués aux CFTC isolées selon la taille cellulaire. Il s'agit d'une approche élective pour le DPN-NI des aneuploïdies car elle permet l'identification de gains et pertes de matériel chromosomique au niveau du génome entier, avec une résolution spatiale d'environ 10 megabases. Les cellules présumées fœtales isolées par ISET (Isolation by Size of Epithelial trophoblastic cells) sont microdisséquées au microscope à laser, leur ADN est analysé par génotypage STR pour identifier celles ayant un génome fœtal. Nous avons mis au point l'application de la méthode CGH aux cellules uniques fixées et isolées par ISET avec lecture du résultat sur métaphases. La mise au point de la lecture sur CGH array est en cours en collaboration avec le Prof Christoph Klein (University of Regensburg, Allemagne) qui réalise la CGH array sur cellules uniques de façon routinière[6]. Une méthode de PCR quantitative spécifique du chromosome 21 sera également appliquée à l'ADN des CFTC et évaluée comparativement à la méthode CGH array.

Deux centres de dépistage participent à cette étude : Poissy et Nice. Ces centres réalisent par an plus de 1000 amniocentèses et plus de 60 biopsies de villosités choriales (BVC) chez des femmes à risque élevé ($> 1/250$) d'aneuploïdie. Les femmes incluses subiront un prélèvement de sang de 20 ml avant l'acte invasif. Le sang sera traité par la méthode ISET dans les 3 heures après le prélèvement et le filtre sera stocké à $- 20^{\circ}\text{C}$. La technique ISET-Trisomie 21 sera réalisée en aveugle sur les cas diagnostiqués (par la méthode invasive) et sur les cas témoins dont les filtres codés seront envoyés au laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Necker par les centres de dépistage. Nous avons prévu 2 ans d'inclusion, avec un nombre attendu de plus de 100 cas de trisomie 21.

Nombre de sujets : Nous prévoyons d'appliquer la méthode ISET en aveugle à 100 cas de trisomie 21 et 300 cas témoins avec caryotype normal, ce qui va permettre de détecter une sensibilité supérieure à 97% et une spécificité supérieure à 99% (IC 95% [70-100]).

Critères de jugement : la validation sera évaluée par ouverture de l'aveugle et comparaison des résultats obtenus par la méthode invasive (amniocentèse ou BVC) et la méthode non invasive.

Calendrier du projet :

Mois 1 à 6 : mise au point de la lecture CGH array, préparation des inclusions

Mois 7 à 30 (2 ans) : inclusion des femmes enceintes

Mois 8 à 34 : réalisation des tests non invasifs

Mois 35 à 36 : ouverture de l'aveugle, évaluation des données, analyses

statistiques

Résultats attendus et perspectives :

Le succès déjà obtenu de l'étude de validation clinique de la méthode ISET pour le DPN-NI de l'amyotrophie spinale nous permet d'être optimistes sur le succès de l'application de la même approche au DPN-NI de la trisomie 21. Ce projet représente un défi international et un enjeu majeur de la médecine obstétricale moderne et de la recherche française.

1. Introduction

1.1 Situation du problème

Découverte en 1958 par le Professeur Jérôme Lejeune, la trisomie 21 (ou syndrome de Down) est l'**anomalie chromosomique la plus fréquente**. Associée à la dysmorphie, retard psychomoteur, et aux malformations diverses, elle est **la première cause d'handicap mental dans le monde**. On compte 50.000 personnes trisomiques en France, 400.000 en Europe et 8 millions dans le monde (fréquence : 1 pour 700 nouveau-nés). **Actuellement, environ 900 enfants trisomiques naissent en France chaque année**. On connaît trois types de Trisomie 21 :

- La trisomie libre : touche environ 95 % des personnes ayant une trisomie 21. Elle est caractérisée par un chromosome supplémentaire à la 21e paire dans toutes les cellules. Cette erreur de distribution des chromosomes survient lors de la première division cellulaire (la méiose).

- La trisomie mosaïque : touche environ 2 % des personnes trisomiques. Dans ce cas, l'erreur de distribution survient lors de la deuxième division cellulaire, ce qui fait en sorte que toutes les cellules ne sont pas affectées par la présence d'un troisième chromosome.

- La trisomie par translocation : touche 3 % des enfants ayant une trisomie 21. Ce type de trisomie est plus complexe, car une partie du chromosome 21 a une cassure et se rattache à un autre chromosome, habituellement le chromosome 14.

Le taux de prévalence de naissance d'un enfant trisomique augmente avec l'âge de la mère : 1 sur 2000 environ à 20 ans, 1 sur 200 à 38 ans, 1 sur 16 à 48 ans. Jusqu'à récemment, la seule stratégie de dépistage de la trisomie 21 était de proposer une amniocentèse pour caryotype pour toutes les femmes sélectionnées sur le seul critère de risque que représente un âge maternel supérieur ou égal à 38 ans au moment de la conception. Cependant, cette stratégie de dépistage a des limites, **car la plus grande proportion (2/3) des naissances d'enfants porteurs de trisomie 21 survient chez les femmes de moins de 35 ans**. C'est pourquoi depuis le début des années 90, d'autres stratégies de dépistage ont été proposées, et notamment le dépistage par les marqueurs biochimiques (hCG, AFP et oestriol) dans le sérum maternel. La Haute Autorité de Santé a récemment recommandé de proposer aux femmes enceintes un dépistage combiné du 1^{er} trimestre de grossesse, réalisé entre 11+0 et 13+6 semaines d'aménorrhée, associant la mesure de la clarté nucale par échographie obstétricale et le dosage des marqueurs sériques du 1^{er} trimestre[7]. Toutefois, la sensibilité de ces tests de dépistage est d'environ 80% pour 5% de faux positifs[8, 9]. Le diagnostic de trisomie 21 ou d'aneuploïdie est ensuite réalisé sur une population définie à risque élevé (>1/250) par caryotype fœtal effectué sur prélèvement invasif (amniocentèse ou biopsie de villosités chorales) associé à risque de pertes fœtales (0,5 à 2%). La valeur prédictive positive des tests combinés du premier trimestre est comprise entre 1/10 et 1/20, ce qui indique que 10 à 20 prélèvements invasifs sont nécessaires pour obtenir le DPN d'un cas de trisomie 21. Les progrès significatifs dans la sélection des populations à risque de trisomie 21 ont eu des effets néfastes: 1. un taux excessif d'amniocentèses (taux national : 11%)[7] et donc de caryotypes ; 2. avec augmentation des fausses couches iatrogènes; 3. Une source accrue d'anxiété maternelle et médicale ; 4. une morbidité maternelle accrue[10] liée à l'interruption médicale de grossesse (IMG) et 5. le diagnostic manqué de 20% des fœtus trisomiques par défaut de sensibilité de la stratégie décrite

La mise au point d'un test fiable et sans risque pour la mère pourrait permettre son application à toutes les femmes enceintes, la réduction significative de la naissance d'enfants trisomiques non souhaités par les parents et une meilleure préparation de la famille à la naissance d'un enfant trisomique.

1.2 Analyse de la littérature et connaissances scientifiques actuelles

Comme rappelé au point 1.1, à l'heure actuelle, la stratégie adoptée pour détecter, de façon certaine, un handicap génétique chez l'enfant à naître fait appel à l'étude des cellules fœtales obtenues par amniocentèse ou choriocentèse, deux méthodes associées à un risque non négligeable de fausse-couche (jusqu'à 1-2%). Une alternative consisterait à identifier et isoler des cellules fœtales rarissimes circulant dans le sang maternel. En effet, ces cellules fournissent une source d'ADN fœtal susceptible d'être soumis à l'analyse génétique. Toutefois, le nombre de cellules fœtales circulantes (CFC) est très faible, de l'ordre d'une ou deux cellules par ml, c'est-à-dire une ou deux cellules mélangées à environ 10 millions de cellules leucocytaires et à 5 milliards d'érythrocytes. Parmi les cellules fœtales qui traversent la barrière placentaire, quatre types ont été identifiés et étudiés: **progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes, érythroblastes, cellules trophoblastiques** (cytotrophoblastes et syncytiotrophoblastes). En ce qui concerne les progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes (cellules CD34 et CD38 positives), il a été montré qu'elles **peuvent persister dans le sang maternel jusqu'à 27 ans après une grossesse** ou une fausse-couche [11]. De ce fait, leur isolement n'est pas utile pour le diagnostic prénatal de la grossesse en cours. Ce problème ne concerne pas les érythroblastes ni les cellules trophoblastiques.

1.2.1 Les études qui ont ciblé les cellules fœtales circulantes (en dehors des études de notre équipe)

Compte-tenu de la rareté des cellules fœtales dans le sang périphérique maternel, la première difficulté, dans l'optique de développer un test **diagnostique prénatal non invasif (DPN-NI)**, concerne l'isolement de ces cellules. La plupart des protocoles d'enrichissement ont été fondés sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les antigènes membranaires des cellules fœtales. Il n'existe pas de réel consensus quant à la technique d'enrichissement cellulaire la plus efficace, de telle façon que plusieurs programmes d'évaluation ont été réalisés [12]. Des travaux ont été menés pour développer de nouveaux marqueurs cellulaires plus spécifiques [13-17]. Néanmoins, il s'est avéré que ces protocoles comprenant plusieurs étapes d'isolement peuvent endommager les cellules fœtales et donner lieu à des pertes cellulaires significatives. Des techniques de micromanipulation/microdissection ont été proposées pour l'analyse génétique des cellules fœtales. L'intérêt de ces approches, dont la faisabilité a été montrée pour le diagnostic de drépanocytose et beta-thalassémie [18], est en fait limité, pour ce qui concerne leur application en routine, par la difficulté à concentrer les cellules fœtales circulantes. L'isolement de ces cellules par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) et/ou par MACS (Magnetic Activated Cell Sorter) a fait l'objet d'un programme multicentrique financé dans le passé par le National Institute of Health aux USA à la hauteur d'environ 50 millions de dollars (D. Bianchi, communication personnelle). Les résultats de cette étude, menée sur un total de 2744 échantillons de sang pendant 5 ans, ont montré que ces approches ne sont pas utiles pour isoler les cellules fœtales circulantes [19] car la sensibilité obtenue (41.4%) n'est pas supérieure à celle des tests hormonaux réalisés sur le sérum maternel. Ainsi, pour des raisons de coût et de complexité, aucune de ces approches n'est considérée

applicable aujourd'hui à large échelle. La détection prénatale par FISH de cellules fœtales avec trisomie 21 dans le plasma maternel a été décrite. Cette approche est intéressante, mais les cellules fœtales sont rares dans le plasma (1 sur 500 à 1 sur 2000) et sont principalement apoptotiques [20]. L'utilisation de cette technique est de ce fait limitée par sa sensibilité et par des aspects techniques (perméabilisation des cellules).

1.2.2 Les études qui ont ciblé les cellules fœtales collectées au niveau cervical (en dehors des études de notre équipe)

Des cellules d'origine fœtale peuvent être collectées par prélèvement transcervical ou au niveau du col de l'utérus (études réalisées avant IVG) [21], toutefois elles sont assez rares, et l'invasivité de certains types de prélèvement n'a pas été étudiée (il pourrait déterminer des fausses-couches). Aucun test diagnostique utilisant ces cellules fœtales n'a jamais été proposé.

1.2.3 Les études qui ont ciblé l'ADN fœtal circulant libre dans le plasma

Une proportion d'ADN fœtal (environ 3.4 % d'ADN maternel [22]) est aussi présente dans le plasma maternel et accessible pour le dépistage génétique. La proportion de l'ADN fœtal dans le plasma peut être augmentée en ajoutant de la formaldéhyde au prélèvement sanguin. Les indications actuelles pour son utilisation concernent la détermination du sexe fœtal et le génotypage RHD[23, 24], qui ciblent des séquences absentes dans l'ADN maternel. Deux travaux récents ont exploré l'utilisation des acides nucléiques d'origine fœtale libres dans le plasma pour le diagnostic d'aneuploïdie.

Le **travail de Dennis Lo** et collaborateurs[25] utilise le génotypage par SNP (Single Nucleotide Polymorphism) et la quantification des transcrits du gène *PLAC4* situé sur le chromosome 21, exprimés de façon prévalente au niveau du placenta et dont une proportion passe dans le plasma[26]. La méthode implique l'extraction des ARNs à partir du plasma, l'amplification par RT-PCR d'un locus SNP (rs8130833) sur le chromosome 21 (informatif dans seulement 45% de la population) et l'analyse quantitative par spectrométrie de masse des produits d'amplification. Les Auteurs ont défini les variations du ratio entre les deux allèles quantifiés chez les femmes avec fœtus euploïde et, par comparaison, ont effectué le diagnostic de trisomie 21 quand le ratio dépassait ces limites (par excès quantitatif d'un allèle ou de l'autre). La méthode a permis de classer correctement 9 cas sur 10 de trisomie 21 et 55 cas sur 57 de euploïdie avec une sensibilité de 90%, une spécificité de 96,5% et un taux de faux positifs de 2,98%.

Cette méthode, qui a pu être mise au point actuellement avec un seul marqueur (rs8130833), hétérozygote dans 45% des sujets, cible environ la moitié de la population. Si des extensions peuvent être développées par la combinaison de plusieurs marqueurs, elle pourrait être applicable à environ 95% de la population caucasienne.

Techniquement, l'approche est basée sur l'amplification quantitative des ARNs placentaires transférés dans le plasma maternel. Un des points critiques est représenté par la nécessité que ce transfert maintienne la proportionnalité quantitative des transcrits provenant des deux ou trois allèles du gène *PLAC4*. Si ceci est le cas, les transcrits exprimés par les deux allèles identiques seront en quantité supérieure par rapport aux transcrits issus de l'autre allèle dans le plasma des femmes avec fœtus trisomique. Toutefois, de façon surprenante, la quantité globale des ARNs du gène *PLAC4* dans le plasma des mères avec fœtus trisomique n'était pas supérieure par rapport à celle détectée dans le plasma des femmes avec fœtus normal ([25] Figure 4d). Il faut donc imaginer que des problèmes relatifs au nombre de copies des transcrits du gène exprimés par allèle et/ou à leur amplifiabilité et/ou à leur passage dans le

plasma maternel pourraient expliquer ce résultat et constituer un point critique pour la mise au point de la méthode en prévision de sa diffusion à large échelle.

Le **travail de R. Dhallan et collaborateurs**[27] cible l'ADN fœtal libre dans le plasma, après traitement du sang avec formaldéhyde. Les Auteurs détectent ainsi une proportion moyenne d'ADN fœtal de 34% par rapport à l'ADN libre maternel. Ils ont analysé l'ADN plasmatique du sang maternel par amplification avec des amorces spécifiques de SNPs informatifs sur les chromosomes 13 (référence) et 21. Le produit d'amplification, obtenu avec des amorces biotinilés portant un site de restriction, est capturé sur support solide par liaison avidine-biotine, coupé, marqué avec nucléotides fluorescents, et migré sur gel de séquence. Le signal est pixelisé et quantifié. Le test est basé sur le rapport entre l'intensité du signal de l'allèle paternel et celui de l'allèle maternel à la fois pour les SNPs sur le chromosome 13 et ceux sur le chromosome 21. Un rapport de 0,333 est attendu dans le cas d'euploïdie (ex.: 1T/3C) et de 0,25 (ex.: 1G/4A) dans le cas de trisomie 21. Les Auteurs ont étudié 57 femmes porteuses d'un fœtus euploïde et 3 femmes porteuses d'un fœtus avec trisomie 21. Ils ont correctement identifié 56 cas normaux et 2 des 3 trisomiques (sensibilité : 66,7%, spécificité : 98,2%, taux de faux positifs : 1,6%).

Dans ce travail, qui montre une sensibilité inférieure à celle des tests sérologiques, le nombre des cas avec trisomie 21 est trop bas pour pouvoir évaluer sa performance. L'approche technique est intéressante, mais il est clair que sa fiabilité dépend, comme les Auteurs le remarquent, de la proportion relative de l'ADN fœtal par rapport à l'ADN maternel, qui est variable de cas à cas, et du nombre de SNPs informatifs qui peuvent être détectés sur les chromosomes 13 et 21. Il est intéressant de noter que une différence significative entre les rapports des deux allèles calculés sur le chromosome 13 et sur le chromosome 21 a été trouvée uniquement dans trois cas sur 60 testés (ref. [27]. cas n° 4, 18 et 31, Table 2). Deux de ces cas ont permis le diagnostic correct de trisomie 21 (cas n° 4 et 31), le troisième (N°18) a été interprété comme cas de trisomie 21, mais il s'agissait d'un faux positif (le pourcentage absolu d'ADN fœtal était de 21,7% et le nombre de SNP trouvés sur les deux chromosomes était bas). Enfin un autre cas (cas n°55), pour lequel la quantité d'ADN fœtal était de 31,8% et le nombre de SNPs utilisés plus important, a été interprété comme normal alors qu'il s'agissait de trisomie 21.

Il apparaît clair que, si les acides nucléiques fœtaux libres dans le plasma sont plus faciles à obtenir, leur mélange avec ceux de la mère impose des développements techniques dont la reproductibilité et validation n'est pas aisée (sujet revu par P.Paterlini-Bréchet, Médecine et Sciences, vol 23, 28-30, 2007) .

Le **travail de Fan et al**[28] a récemment proposé le diagnostic d'aneuploïdie fœtale par séquençage à haut débit. Cette technique permet de séquencer plusieurs milliers à plusieurs millions de fragments d'un génome en même temps. Elle repose sur la création d'une banque de fragments constituée de façon aléatoire par fragmentation de l'ADN total plasmatique non pre-amplifié. Les fragments sont ensuite liés à des adaptateurs universels et fixés sur un canal du séquenceur puis amplifiés par cluster et séquencés. Les fragments séquencés sont ensuite analysés et comparés aux séquences chromosomiques de référence. Ceci pourrait permettre d'analyser la quantité d'ADN provenant du chromosome surnuméraire, sans nécessité de différencier l'ADN maternel de l'ADN fœtal. Les Auteurs décrivent l'analyse de 9 cas de trisomie 21, 2 cas de trisomie 18, un cas de trisomie 13 et 6 cas avec fœtus normal. Le résultat du diagnostic par la méthode invasive est connus par les auteurs avant la réalisation de l'étude. L'application du séquençage à haut débit à l'ADN plasmatique libre collecté après la manœuvre invasive chez les 18 cas mentionnés conduit à un diagnostic correct dans tous les cas. Si cette approche semble très attractive, plusieurs interrogations peuvent être posées

suite à la lecture du travail scientifique, à la fois sur la méthodologie, l'analyse statistique et l'évaluation des résultats. Concernant la méthodologie, il faut mentionner le problème de la quantité d'ADN fœtal libre présent dans le plasma de toutes les femmes enceintes et qui pourrait limiter la faisabilité du test. Ce problème a déjà été mentionné en commentaire à l'approche de Dhallan et al. Fan et al effectuent leur analyse sur le plasma collecté après le prélèvement invasif des cellules fœtales, une manœuvre connue pour être susceptible de diffuser davantage d'ADN fœtal dans le sang. Ils ne se placent donc pas dans les conditions de réalisation d'un test non invasif à but diagnostique. Dans la Figure 2 de l'article, le cut off est placé de façon erronée pour l'évaluation d'un test diagnostique (étant donné que les auteurs utilisent une formule de calcul de l'IC (Intervalle de Confiance) sur la moyenne alors que, pour un test diagnostique il faut utiliser la formule pour l'IC sur les individus), le vrai cut off serait autour de 1,045 (au lieu que 1), ce qui implique que la quantité d'ADN fœtal indispensable pour que réaliser ce test est autour de 9%, au lieu de 2% comme indiqué dans la légende de la Figure. L'étude des « supplementary data » montre d'ailleurs que les auteurs détectent des quantités d'ADN fœtal très variables et dont la quantité varie largement selon la méthode de quantification. Les auteurs signalent qu'ils obtiennent par leur méthode 10 millions de séquences tags de 25 bp, mais que seulement 50% de ces séquences sont utilisables car elles correspondent à des séquences uniques et représentent 4% du génome. Le nombre de séquences tag qui mappent au chromosome 21 est donc déterminant de la capacité du test à réaliser le diagnostic car, dans le cas favorable où l'ADN fœtal libre représenterait 10% de tout l'ADN libre plasmatique, l'ADN du chromosome 21 surnuméraire représenterait uniquement 0,21% de tout l'ADN et la distinction entre diploïdie 21 et trisomie 21 dans l'ADN fœtal serait fondée sur la capacité à distinguer 4,55% d'ADN du chromosome 21 (par rapport à l'ADN total) en cas de trisomie de 4,34% du même ADN en cas de fœtus normal. Cette capacité de distinction est clairement relative au nombre de tags obtenus. Les Auteurs ne précisent pas ce nombre dans les cas de trisomie 21 par rapport aux cas sans trisomie 21. Enfin, cette étude se place dans une étude de phase 1 selon la classification des phases de validation proposée par Sackett[29], ce qui n'autorise pas l'utilisation du terme diagnostique dans le titre de l'article (car les auteurs connaissaient le résultat avant la réalisation des tests).

1.2.4 Les résultats obtenus par notre équipe

A différence des groupes qui ont essayé d'isoler les CFC par des méthodes d'immunomarquage et immunomagnétiques (ces méthodes ne sont pas complètement spécifiques et endommagent la morphologie cellulaire entraînant une perte de sensibilité), notre équipe a mis au point une approche pour isoler les cellules épithéliales fœtales (**cellules fœtales trophoblastiques circulantes (CFTC)**) sur la base de leur taille, car elles sont plus larges que les cellules leucocytaires. Ces tests nous ont permis de développer **une méthode innovante**, que nous avons appelée **ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumor/Trophoblastic cells)**[30].

Aspects méthodologiques et résultats déjà obtenus

Dix ml de sang sont dilués avec un tampon spécial et chargés dans un bloc à filtration à 10 puits qui se referme de façon étanche sur un filtre en polycarbonate ayant des pores calibrés de diamètre de 8 microns. Après filtration, on identifie sur chacun des 10 spots du filtre des cellules de grande taille qui peuvent être ainsi comptés et caractérisées. Nous avons montré que la méthode ISET permet d'isoler les CFTC, de visualiser leur morphologie et de les caractériser par immunohistochimie et par FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation). Les CFTC peuvent également être microdisséquées à l'aide d'un microscope à laser et leur ADN

peut être amplifié pour la recherche de délétions ou mutations. **Nous avons démontré que la technique ISET permet d'isoler les cellules fœtales trophoblastiques (CFTC) et mis au point une stratégie de génotypage (par marqueurs STR) des cellules isolées pour démontrer leur nature foetale[1].** Ensuite nous avons montré qu'il est possible de cibler les analyses génétiques uniquement aux cellules individuelles dont la nature fœtale est démontrée. Douze femmes à risque d'avoir un enfant avec **amyotrophie spinale** (SMA : Spinal Muscular Atrophy) ont été analysées par ISET. L'analyse a été effectuée en aveugle sur seulement 4 ml de sang maternel. Après génotypage du sang paternel et maternel pour l'identification des amorces informatives, les cellules isolées par ISET ont été microdissequées et allelotypées, ce qui a permis de détecter, au total, 35 cellules fœtales. **La recherche de la mutation spécifique de l'amyotrophie spinale (la délétion homozygote du gène SMN1), réalisée en aveugle et en parallèle avec la méthode invasive (biopsie de villosités choriales suivie de l'analyse génétique des cellules fœtales ainsi collectées a permis d'identifier les 3 mères porteuses d'un fœtus atteint [2].**

Notre équipe a récemment mis au point la méthode ISET pour le DPN de la **mucoviscidose**. Les détails techniques de l'approche ont été protégés par brevet. La méthode a été appliquée à 12 mères à risque d'avoir un enfant avec mucoviscidose. L'analyse de seulement 5 ml de sang maternel et de au moins quatre cellules fœtales par prélèvement sanguin obtenu à la 11-12 semaine de grossesse avant la biopsie de villosités choriales a permis d'identifier, dans une étude effectuée complètement en aveugle, la mère avec un enfant atteint, les 5 mères avec un enfant porteur de l'allèle F508del et les 6 mères avec un enfant complètement sain[3]. Parmi les 12 mères, 10 provenaient de couples où les deux parents étaient porteurs de l'allèle F508del. Pour un couple, le père était porteur de l'allèle F508del et la mère d'une mutation inconnue, pour un autre les deux parents étaient porteurs d'une mutation inconnue. Dans ces deux derniers cas, toutefois, le laboratoire de Génétique Médicale disposait de l'ADN d'un enfant malade des mêmes familles (cas index) qui a permis de localiser les allèles mutés et d'effectuer le diagnostic prénatal non invasif par la méthode indirecte (approche par analyse de ségrégation de marqueurs polymorphes situés sur le chromosome 7).

Ces résultats, qui représentent une avancée majeure dans le domaine du Diagnostic Prénatal non invasif, ont conduit à mettre en place un protocole de validation clinique de la méthode ISET pour l'amyotrophie spinale (2005) et pour la mucoviscidose (2006). Nos travaux ont montré que ISET isole les CFTC (cellules fœtales trophoblastiques circulantes) à partir des toutes les mères testées jusqu'à maintenant (N°=65), et détecte de 1 à 3 CFTC par ml.

Les protocoles cliniques ont été organisés selon les indications du statisticien (Dr Jais) et du méthodologiste (Prof Thalabar). Il s'agit d'étudier au moins 16 femmes à risque des deux maladies génétiques et, de façon indépendante, au moins 10 CFTC par mère de façon à obtenir 160 diagnostics réalisés en aveugle sous la responsabilité du généticien (Dr Bonnefont) et de l'obstétricienne Dr Benachi). La validation clinique de la méthode ISET pour le DPN-NI de la SMA a été terminée en septembre 2007. **L'ouverture de l'aveugle a montré une concordance totale des résultats obtenus par ISET et par la méthode invasive.** Les responsables de l'aveugle ont signé le document attestant que la validation a été terminée avec succès complet. L'article correspondant a été soumis pour publication et déposé dans HAL. La validation clinique de la méthode ISET pour le DPN-NI de la Mucoviscidose est actuellement en cours et sera terminée au début de 2009. Notre équipe a également étudié la cinétique

d'apparition des CFTC dans le sang maternel, en collaboration avec le Professeur Frydman et le Dr Bussières. Nous avons montré que les CFTC circulent chez toutes les mères analysées à partir de la 5^{ me} semaine d'aménorrhée et qu'il est donc possible de réaliser, par ISET, un DPN non invasif et très précoce[5].

2. Objectif du projet

L'objectif de ce projet est la validation clinique d'une méthode non invasive de DPN de la Trisomie 21.

3. Schéma expérimental

Cette étude rentre dans le cadre de la loi Huriet. Il s'agit de la validation clinique d'une nouvelle approche pour le Diagnostic Prénatal Non-invasif de la Trisomie 21. La durée de participation à l'étude sera inférieure à 24 heures pour chaque femme enceinte incluse dans le protocole. La durée des inclusions sera de 24 mois. Recherche de données et collection biologique. Aucune décision ne sera prise en fonction du test  valu e.

4. Calendrier du projet (sur 3 ans)

Mois 1 à 6 : mise au point de la lecture CGH array, préparation des inclusions

Mois 7 à 30 (2 ans) : inclusion des femmes enceintes

Mois 8 à 34 : réalisation des tests non invasifs

Mois 35 à 36 : ouverture de l'aveugle, évaluation des données, analyses statistiques

5. Sélection des patients

5.1 Critères d'inclusion

seront incluses dans le protocole les femmes

-  g ees de plus de 18 ans
- adressées dans un des deux centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal (CPDPN)
- ayant un risque  lev e (>1/250) de trisomie 21 basée sur le dépistage combin e « tests sériques/échographie de la nuque »
-   10 SA ou plus
- souhaitant un Diagnostic Prénatal Invasif
- et signant un consentement  clair e

5.2 Critères d'exclusion

Ne seront pas incluses dans le protocole les patientes :

- dont le risque combin e est < 1/250
- ne souhaitant pas le diagnostic prénatal invasif
- participant à un autre essai
- refusant de signer le consentement  clair e

6. Déroulement de l'étude

6.1 Recrutement des femmes enceintes

Les femmes enceintes consultant dans les CPDNP participants à cette étude pour évaluation du risque d'anomalie chromosomique bénéficieront, au premier trimestre de grossesse, selon les recommandations récentes de la Haute Autorité de Santé, d'un calcul de risque basé sur la combinaison de l'âge maternel, la mesure de la clarté nucale et le dosage des marqueurs sériques maternels (PAPP-A et fraction libre de la beta hCG). Les femmes enceintes présentant un risque combiné $>1/250$ se verront proposer un diagnostic prénatal invasif, à fin de vérifier le caryotype, sur une biopsie de trophoblaste (avant 15 SA) ou sur amniocentèse (>15 SA). Les femmes enceintes souhaitant obtenir le DPN par prélèvement invasif seront éligibles pour cette étude.

La participation à cette étude sera proposée uniquement après que la femme aura exprimé le souhait d'obtenir le DPN par prélèvement invasif, pour ne pas perturber son choix, et après avoir expliqué (voir Note d'information) que sa participation à l'étude ne lui permettra pas d'éviter la méthode invasive.

Les femmes enceintes acceptant de participer à cette étude auront un prélèvement sanguin de 20 ml pour isolement des cellules fœtales trophoblastiques circulantes (CFTC) qui sera réalisé dès leur accord de participation à l'étude et toujours avant le prélèvement invasif (amniocentèse ou biopsie du trophoblaste). **En effet, les recherches de notre équipe ont montré que les CFTC circulent dans le sang à partir de la 5^{ème} SA[5].** Leur analyse génétique permet ainsi d'effectuer un DPN-NI extrêmement précoce, ce qui est un avantage majeur pour la femme enceinte.

6.2 Modalités techniques

6.2.1 Recueil des prélèvements et stockage

Après inclusion dans le protocole, chaque patiente aura un prélèvement de 20 ml de sang effectué sur EDTA. Le sang sera traité par ISET dans les 3 heures après le prélèvement. L'Unité INSERM 807, qui dispose de plusieurs machines ISET pour l'isolement des CFTC établira un contrat de prêt d'une machine par Centre de Prélèvement participant à cette étude. Le sang (20 ml) sera dilué 1/10 par le tampon mis au point par l'Unité 807, laissé poser 10 minutes et filtré par l'appareil à l'aide des consommables commercialisés par la compagnie Metagenex. Cette compagnie valorise des brevets appartenant à l'AP-HP, l'INSERM et l'Université Paris Descartes. Les filtres obtenus, contenant les CFTC, seront ensuite stockés à -20°C jusqu'au moment de l'analyse. Chaque filtre sera codé en accord avec le protocole d'étude mis au point par l'URC de Necker dans les premiers 6 mois de cette étude. Chaque CPDNP participant à cette étude mettra en place un registre (en papier et en informatique) où le nom de la femme enceinte, le code du filtre et le diagnostic obtenu par la méthode invasive seront annotés selon le protocole indiqué par l'URC de Necker. Ces données resteront strictement confidentielles et inconnues au Laboratoire de Biochimie A de l'Hôpital Necker qui effectuera les analyses génétiques sur CFTC en collaboration avec l'Unité INSERM 807.

Le prélèvement fœtal, obtenu par amniocentèse ou biopsie du trophoblaste, est interprété selon les méthodes usuelles du laboratoire de cytogénétique et totalement indépendamment du prélèvement sanguin maternel. Les résultats seront rendus à la patiente dans les délais habituels et la prise en charge ultérieure ne sera en rien modifiée par cette étude. Cette partie de l'étude sera réalisée dans le cadre de la pratique hospitalière courante et ne dépendra pas du financement ici demandé.

6.2.2 Méthodes de DPN non invasif de la Trisomie 21

Les CFTC seront isolées comme décrit dans le paragraphe 1.2.4 et dans les 4 articles déjà publiés par notre équipe sur la méthode ISET pour le DPN-NI des maladies génétiques. Nos travaux ont montré que ISET détecte de une à trois CFTC par ml de sang maternel. L'ADN de chaque cellule microdisséquée sera amplifié de façon proportionnelle avec la technique de coupure-ligation de l'ADN publiée par l'équipe du Professeur Klein[31] et mise au point dans le laboratoire de l'Unité 807. Le produit de cette amplification proportionnelle (50 microlitres) permet d'effectuer des analyses ultérieures (1 microlitre par analyse) et est utilisé pour :

- le génotypage de l'ADN de la cellule microdisséquée à l'aide de marqueurs microsatellites informatifs pour identifier sa nature fœtale ou maternelle
- la PCR quantitative pour DPN-NI de trisomie 21
- l'analyse en CGH array, utilisant l'ADN d'une cellule fœtale et d'une cellule maternelle (identifiées par génotypage microsatellite).

Dix CFTC et 10 cellules maternelles (contrôle interne) seront analysés par échantillon de sang maternel.

6.2.2 Méthode de DPN non invasif de la Trisomie 21 par CGH et résultats préliminaires

Nos résultats préliminaires indiquent que **la validation d'un test prénatal fiable et non invasif pour détecter la trisomie 21 est faisable. En effet, notre équipe a développé l'application de la méthode CGH aux cellules isolées par ISET et microdisséquées.**

6.2.3 Méthode de DPN non invasif de la Trisomie 21 par ISET-PCR quantitative et résultats préliminaires.

Nous avons également mis au point deux procédures distinctes de PCR quantitative : a) analyse des marqueurs microsatellites STR sur le chromosome 21 et b) analyse de gènes uniques du chromosome 21.

En résumé :

La méthode ISET cible les cellules fœtales trophoblastiques circulantes (CFTC), qui ne persistent pas dans le sang maternel après accouchement, ce qui permet de diriger le diagnostic à la grossesse en cours. La recherche d'anomalie génétique est effectuée sur des génomes fœtaux non mélangés à l'ADN maternel (qui interférerait avec la quantification de l'ADN du chromosome 21). De façon remarquable, le diagnostic génétique est répété sur chaque cellule fœtale identifiée, ce qui permet de confirmer plusieurs fois le résultat. Deux méthodes de DPN-NI de la Trisomie 21 ont été mises au point et seront évaluées de façon comparative: la méthode par CGH et par PCR quantitative. Cette étude de validation clinique permettra de dire laquelle de ces deux méthodes est la plus performantes et la moins coûteuse pour le DPN-NI de la Trisomie

21. Ces résultats ont ouvert des perspectives nouvelles pour le diagnostic prénatal
La technique ISET et ses applications ont fait l'objet de quatre brevets déposés au nom de l'INSERM, de l'AP-HP et de l'Université Paris V.

7. Critères d'évaluation de la stratégie diagnostique

7.1 Critère principal

La performance diagnostique de la quantification du chromosome 21 dans les CFTC par CGH array et par PCR quantitative (PCR q) sera évaluée en comparaison avec les résultats de la cytogénétique traditionnelle obtenue par culture d'amniocytes ou de trophoblaste (gold standard).

La sensibilité, la spécificité, ainsi que la valeur prédictive positive et négative de ces nouveaux tests (ISET-CGH et ISET PCRq) seront évalués.

7.2 Critères secondaires

Seront également évalués, pour les deux approches (ISET-CGH et ISET PCRq) par rapport aux méthodes invasives :

- le temps nécessaire au traitement des échantillons
- le coût par prélèvement
- la répétabilité de la quantification réalisée sur 10 CFTC par prélèvement sanguin

8. Réalisation pratique : choix des prélèvements sanguins à traiter

Pour des raisons pratiques et de coût, seulement une partie des filtres sera analysée. Le CPDNP de Nice a diagnostiqué 52 cas de Trisomie 21 en 2006 et 58 en 2007 par 330 amniocentèses et environ 30 choriocentèses par an (communication officielle du Dr Loizeau). Le centre de Poissy a diagnostiqué un nombre encore supérieure de cas de Trisomie 21 en 2006 et en 2007. Ainsi, environ 720 (de 700 à 740) prélèvements de sang seront filtrés dans les deux ans d'inclusion des femmes enceintes. Notre attente est que la très grande majorité des femmes enceintes ayant donné leur accord pour la méthode invasive accepteront de participer à cette étude qui représente un espoir majeur d'avancement de la médecine obstétricale moderne. Cette attente est basée sur notre expérience des études de validation clinique de la méthode ISET pour DPN-NI déjà en cours. Sur les deux ans, nous attendons environ 116 cas de Trisomie 21 pour un seul centre (Nice) et au moins le double pour les deux Centres. Nous attendons donc au moins 100 cas de femmes incluses dans l'étude, ayant signé la note d'information, avec fœtus atteint de Trisomie 21 .

Comme décrit, les filtres contenant les CFTC seront rendus anonymes et un registre permettra d'identifier au fur et à mesure de l'étude les filtres obtenus de femmes avec fœtus trisomique et ceux obtenus de femmes avec fœtus disomique selon les résultats de la cytogénétique traditionnelle.

Une première phase de rodage des méthodes CGH array et PCRq est prévue dans les premiers 6 mois de cette étude par analyse des prélèvements de sang obtenus de femmes ayant un fœtus trisomique avant l'IVG. Ces filtres, en nombre de 21, ont été obtenus dans le passé par le Laboratoire de Biochimie A de l'Hôpital Necker/Unité INSERM 807 en **collaboration avec le Dr Rozenberg et Bussièrès (protocole Echo PAPP-A)**.

A partir du 7^{ème} mois de cette étude, les analyses seront réalisées sur les filtres provenant des CPDNP **strictement en aveugle**. A la fin de chaque mois d'inclusion, les CPDNP enverront les filtres codés obtenus de femmes avec fœtus trisomique et un nombre aléatoire de filtres

codés obtenus de femmes avec fœtus normal. L'URC effectuera périodiquement des contrôles pour vérifier que, à la fin de la période d'inclusion, tous les filtres codés (au moins 100) obtenus de femmes avec fœtus trisomique et 300 filtres codés obtenus de femmes avec fœtus normal auront été envoyés au Laboratoire de Biochimie A de l'Hôpital Necker/Unité INSERM pour les analyses génétiques des CFTC (Voir "Analyses statistiques").

9. Suivi des femmes incluses dans le protocole

La durée de participation de chaque femme incluse dans l'essai est inférieure à 24 heures et se limite en pratique à un accord pour la prise de sang et le traitement ultérieure de ce sang selon le protocole prévu. Le prélèvement fœtal par approche invasive (amniocentèse ou biopsie du trophoblaste) est interprété selon les méthodes usuelles du laboratoire de cytogénétique et totalement indépendamment du prélèvement sanguin maternel. Les résultats du prélèvement fœtal sont rendus à la femme dans les délais habituels et sa prise en charge n'est pas modifiée par sa participation à ce protocole. L'étude du prélèvement fœtal est réalisée dans le cadre de la pratique hospitalière courante et ne dépend pas de du financement ici demandé.

10. Gestion des données et analyse statistique

10.1 Nombre de femmes enceintes nécessaire et prévu

Les CPDPN de cette étude sont en mesure de répondre spécifiquement aux recommandations de la HAS. Toutes les femmes enceintes présentant un risque élevé ($>1/250$) d'aneuploïdie et qui acceptent le diagnostic par la méthode invasive, se verront proposer de participer à l'étude. D'après les statistiques des CPDPN, leur recrutement permettra certainement d'inclure au moins 100 cas de trisomie 21 sur deux ans. Si le contrôle de l'URC à un an du début de la période d'inclusion devait montrer que, pour des raisons maintenant inconnues, ce nombre ne peut pas être atteint en 2 ans, d'autres CPDPN seront contactés pour obtenir, avec 2 ans d'inclusion, au moins 100 cas de trisomie 21.

10.2 Gestion des données

Les données seront saisies sur un cahier électronique en ligne de type Cleanweb. Le traitement des données sera réalisé par l'Unité de Recherche Clinique de l'Hôpital Necker Enfants Malades (Prof Jean Marc Treluyer, Dr Raphaël Serreau) qui se chargera de la collaboration avec l'URC des CPDPN.

10.3 Analyses statistiques

L'analyse statistique sera réalisée par le **Dr Jean Philippe Jais** de l'Hôpital Necker Enfants malades.

10.3.1 Nombre de sujets nécessaires

L'hypothèse est que l'examen présente un accord parfait avec la méthode de référence (caryotype), ce qui correspond à une sensibilité et une spécificité de 100%.

Les calculs ont été menés avec les procédures de calcul exact du logiciel NCSS PASS 2002 (Kaysville, Utah, USA) et du package binom de R (<http://www.r-project.org>).

Sous l'hypothèse d'une sensibilité de la méthode de 0.995 (H1), il est nécessaire d'étudier **99 grossesses avec aneuploïdie 21** pour montrer que la sensibilité est supérieure à 0.97 (H0) avec un risque alpha de 0.049 en unilatéral et un risque beta de 0.048. Avec un effectif de 100 grossesses avec aneuploïdie 21, en cas d'une sensibilité observée de 100%, l'intervalle de confiance à 95% de la sensibilité est entre 97,05% et 100%.

Sous l'hypothèse d'une spécificité de la méthode de 0.9999 (H1), il est nécessaire d'étudier **299 grossesses avec diploïdie 21** pour montrer que la spécificité est supérieure à 0.99 (H0) avec un risque alpha de 5% en unilatéral et un risque beta de 2,9%. Avec un effectif de 299 grossesses avec diploïdie 21, en cas d'une spécificité observée de 100%, l'intervalle de confiance à 95% de la sensibilité est entre 99,01% et 100%.

10.3.2 Méthodes statistiques

La description de l'échantillon (effectifs, données épidémiologiques et antécédants obstétricaux des mères, données sur la grossesse, tests de dépistage biologiques et échographiques de la trisomie 21) sera réalisée avec les méthodes usuelles.

La valeur diagnostique du test ISET-Trisomie 21 sera évaluée au niveau individuel (unité statistique = la grossesse) par un test exact de comparaison basé sur la distribution binomiale (fonction binom.test du logiciel R) à respectivement 97% et 99% pour la sensibilité et la spécificité et l'intervalle de confiance à 95% en unilatéral. En pratique, le test sera significatif uniquement si les sensibilités et spécificités observées sont de 100% (absence de faux positifs et de faux négatifs).

Une estimation de la sensibilité et de la spécificité sera aussi réalisée au niveau cellulaire (unité statistique = la cellule circulante) et une évaluation du risque théorique de faux positif (toutes les cellules faussement positives) ou de faux négatif (toutes les cellules faussement négatives) sera réalisée en fonction du nombre de cellules fœtales trophoblastiques circulantes (CFTC) analysées par femme enceinte et des seuils de sensibilité et de spécificité.

Toutes les 100 grossesses, une analyse sera réalisée afin d'évaluer l'incidence de la trisomie 21 sur l'échantillon et de vérifier de l'absence de faux positifs et/ou de faux négatifs. Les résultats seront soumis à un comité de surveillance indépendant qui pourra émettre des recommandations sur le déroulement de l'étude.

10.3 Gestion des données indésirables

Il s'agit de toute manifestation nocive et non recherchée survenant chez une personne participant à la recherche, pendant la recherche, qu'elle soit considérée ou non comme liée à celle-ci.

Il n'est pas prévu d'évènement indésirable dans cette étude.

11. Aspects logistiques, légaux et généraux

11.1 Promoteur

Il est défini par la loi 2004-806 du 9 août 2004. Dans cette recherche, l'AP-HP sera le Promoteur (voir avis favorable inclus dans cette demande : P011005)

11.2 Déclaration CNIL

La loi prévoit que la déclaration doit avoir été faite avant le début effectif de la recherche. La DRRC en qualité de promoteur effectue une déclaration à la CNIL, en relation avec le responsable du fichier informatique, lors de sa déclaration annuelle simplifiée si la recherche fait l'objet d'un contrôle qualité des données par un ARC et entre dans le champ d'application de la procédure simplifiée CNIL.

11.3 Documentations de la recherche

Avant de démarrer la recherche, l'investigateur coordonnateur fournira au représentant du promoteur de la recherche une copie de son curriculum vitae personnel daté et comportant son numéro d'inscription à l'ordre des médecins, de même que tous les investigateurs.

La version du protocole acceptée avant soumission avec ses annexes sera signée conjointement par l'investigateur coordonnateur et le représentant du promoteur. Le cas échéant, le responsable scientifique (P. Paterlini Bréchet) sera signataire .

Lors de chaque nouvelle version du protocole, rendue nécessaire par des amendements et/ou demandes des autorités, un nouveau numéro et la date seront attribués et les mêmes signatures recueillies.

Chaque investigateur s'engagera à respecter les obligations de la loi et à mener la recherche selon les bonnes pratiques et en respectant les termes de la déclaration d'Helsinki. Pour ce faire, un exemplaire daté et signé de l'engagement scientifique par chaque investigateur de chaque service clinique participant d'un centre sera remis au promoteur.

11.4 Contrôle de qualité et Assurance Qualité

La recherche sera encadrée selon la procédure opératoire standard de l'AP-HP promoteur. Le déroulement de la recherche dans les centres investigateurs et la prise en charge des sujets sera fait conformément à la déclaration d'Helsinki et les Bonnes Pratiques.

Procédures de monitoring

Les représentants du promoteur effectueront des visites des centres investigateurs au rythme correspondant au schéma de suivi de l'inclusion des femmes enceintes dans le protocole dans les centres d'inclusion. Ils effectueront également une visite avant le début des inclusions pour l'ouverture de chaque centre avec mise en place du protocole et prise de connaissance des investigateurs.

Lors des visites suivantes, les cahiers électroniques d'observation seront revus au fur et à mesure de l'état d'avancement de la recherche par l'ARC représentant le promoteur qui en contrôlera le bon remplissage et assurera la validation des données. Il s'agit de cahiers simplifiés comprenant, entre autre, les données du dépistage sérologique, de l'échographie, l'âge de la femme, date et type du prélèvement invasif, date du prélèvement de sang et diagnostic génétique par la méthode invasive. Les investigateurs qui incluent les femmes enceintes acceptent de recevoir des représentants du promoteur nommés par l'AP-HP à intervalles réguliers. Lors de ces visites sur site et en accord avec les Bonnes Pratiques Cliniques, les éléments suivants seront revus :

- respect du protocole de la recherche et des procédures qui y sont définies
- examen des documents source et confrontation avec les données reportées dans le cahier électronique d'observation
- - assurance qualité des données recueillies dans le cahier électronique d'observation : exactitude, données manquantes, cohérence des données, selon les règles édictées par les procédures de la DRRC.

11.5 Amendements au protocole de la recherche

La DRRC doit être informée de tout projet de modification du protocole par l'investigateur coordonnateur. Les modifications devront être qualifiées en substantielles ou non.

Tout amendement au protocole de recherche , devra être notifié au CPP s'il entraîne des modifications substantielles, c'est-à-dire si les modifications prévues sont susceptibles, d'une manière ou d'une autre, de modifier les garanties apportée aux personnes qui se prêtent à la

recherche biomédicale (modification d'un critère d'inclusion, prolongation de la durée d'inclusion, participation de nouveaux investigateurs...)

11.6 Extension de la recherche

Toute extension de la recherche (modification profonde du schéma thérapeutique ou des populations incluses) devra être considérée comme nouvelle recherche.

11.7 Responsabilité

L'Assistance Publique –Hôpitaux de Paris est le promoteur de cette recherche . En accord avec la loi sur les recherches biomédicales, elle a pris une assurance pour toute la durée de la recherche, garantissant sa propre responsabilité civile ainsi que celle de tout intervenant (médecin ou personnel impliqué dans la réalisation de la recherche) (loi n° 2004-806, Art L 1121-10 du CSP). L'AP-HP se réserve le droit d'interrompre la recherche à tout moment pour des raisons médicales ou administratives . Dans cette éventualité, une notification sera fournie à l'investigateur.

11.8 Rapport final de la recherche

Le rapport final de la recherche sera écrit en collaboration par le coordonnateur et le biostatisticien pour cette recherche. Ce rapport sera soumis à chacun des investigateurs pour avis. Une fois qu'un consensus aura été obtenu, la version finale devra être avalisée par la signature de chacun des investigateurs et adressée au promoteur dans les meilleurs délais après la fin de la recherche. Un rapport rédigé selon le plan de référence de l'autorité compétente doit être transmis à l'autorité compétente ainsi qu'au Comité dans un délai de un an, après fin de la recherche, s'entendant comme la dernière visite de suivi du dernier sujet inclus. Ce délai est rapporté à 90 jours en cas d'arrêt prématuré de la recherche.

11.9 Publications et propriété des données

L'AP-HP est propriétaire des données et aucune utilisation ou transmission à un tiers ne peut être effectuée sans son accord préalable.

Seront premiers signataires des publications, les personnes ayant réellement participé à l'élaboration du protocole et son déroulement ainsi qu'à la rédaction des résultats.

L'AP-HP sera mentionnée comme étant le promoteur de la recherche biomédicale et comme soutien financier le cas échéant. Les termes « Assistance Publique –Hôpitaux de Paris apparaîtront dans l'adresse des auteurs.

13 Références Bibliographiques

1. Vona G, Beroud C, Benachi A, Quenette A, Bonnefont JP, Romana S, Dumez Y, Lacour B, Paterlini-Brechot P. (2002) Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood. *Am J Pathol*, 160, 51-8.
2. Beroud C, Karliova M, Bonnefont JP, Benachi A, Munnich A, Dumez Y, Lacour B, Paterlini-Brechot P. (2003) Prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy by genetic analysis of circulating fetal cells. *Lancet*, 361, 1013-4.
3. Saker A, Benachi A, Bonnefont JP, Munnich A, Dumez Y, Lacour B, Paterlini-Brechot P. (2006) Genetic characterisation of circulating fetal cells allows non-invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Prenat Diagn*, 26, 906-16.
4. Mouawia H, Bonnefont JP, Benachi A, Jaïs JP, Paterlini-Bréchet P. Clinical validation of a non-invasive strategy for prenatal diagnosis of Spinal Muscular Atrophy (SMA). (submitted for publication)
5. Paterlini-Bréchet P, Mouawia H, Bussièrès L, Saker A, Lacour B, Frydman R. Trophoblastic cells are detectable in maternal blood from the fifth week of gestation allowing early and non invasive prenatal diagnosis. S(submitted for publication)
6. Fuhrmann C, Schmidt-Kittler O, Stoecklein NH, Petat-Dutter K, Vay C, Bockler K, Reinhardt R, Ragg T, Klein CA. (2008) High-resolution array comparative genomic hybridization of single micrometastatic tumor cells. *Nucleic Acids Res*, 36, e39.
7. HAS. (2007) Evaluation des Stratégies de dépistage de la trisomie 21. Haute Autorité de la Santé. Service Evaluation économique et Santé Publique.
8. Wapner R, Thom E, Simpson JL, Pergament E, Silver R, Filkins K, Platt L, Mahoney M, Johnson A, Hogge WA, Wilson RD, Mohide P, Hershey D, Krantz D, Zachary J, Snijders R, Greene N, Sabbagha R, MacGregor S, Hill L, Gagnon A, Hallahan T, Jackson L. (2003) First-trimester screening for trisomies 21 and 18. *N Engl J Med*, 349, 1405-13.
9. Malone FD, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Bukowski R, Berkowitz RL, Gross SJ, Dugoff L, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR, Wolfe HM, Dukes K, Bianchi DW, Rudnicka AR, Hackshaw AK, Lambert-Messerlian G, Wald NJ, D'Alton ME. (2005) First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *N Engl J Med*, 353, 2001-11.
10. Alfirevic Z, von Dadelszen P. (2003) Instruments for chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000114.
11. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. (1996) Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 705-8.
12. Bianchi DW, Klinger KW, Vadnais TJ, Demaria MA, Shuber AP, Skoletsky J, Midura P, Diriso M, Pelletier C, Genova M, Erikson MS, Williams JM. (1996) Development of a model system to compare cell separation methods for the isolation of fetal cells from maternal blood. *Prenat Diagn*, 16, 289-98.
13. Huber K, Wolf H, Van Lindern M, Worofka B, Rosen A, Hafner E, Beug H, Philipp K, Bauer K. (1996) Development of a rapid means of estimating the haemoglobin F content of candidate fetal cells isolated from maternal blood using HPLC. *Prenat Diagn*, 16, 1011-9.
14. Jackson L. (2003) Fetal cells and DNA in maternal blood. *Prenat Diagn*, 23, 837-46.

15. Koumantaki Y, Sifakis S, Dragatis G, Matalliotakis I, Froudarakis G, Papadopoulou E, Koumantakis E. (2001) Microsatellite analysis provides efficient confirmation of fetal trophoblast isolation from maternal circulation. *Prenat Diagn*, 21, 566-70.
16. Valerio D, Aiello R, Altieri V. (1997) Isolation of fetal erythroid cells from maternal blood based on expression of erythropoietin receptors. *Mol Hum Reprod*, 3, 451-5.
17. Wachtel SS, Shulman LP, Sammons D. (2001) Fetal cells in maternal blood. *Clin Genet*, 59, 74-9.
18. Cheung MC, Goldberg JD, Kan YW. (1996) Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood. *Nat Genet*, 14, 264-8.
19. Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, Dukes KA, Sullivan LM, Klinger KW, Bischoff FZ, Hahn S, Johnson KL, Lewis D, Wapner RJ, de la Cruz F. (2002) Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn*, 22, 609-15.
20. Kolialexi A, Tsangaris GT, Antsaklis A, Mavrou A. (2004) Fetal cells in maternal plasma are found in a late state of apoptosis. *Prenat Diagn*, 24, 719-21.
21. Cioni R, Bussani C, Scarselli B, Bucciantini S, Marchionni M, Scarselli G. (2005) Comparison of two techniques for transcervical cell sampling performed in the same study population. *Prenat Diagn*, 25, 198-202.
22. Lo YM, Lau TK, Chan LY, Leung TN, Chang AM. (2000) Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem*, 46, 1301-9.
23. Bianchi DW, Avent ND, Costa JM, van der Schoot CE. (2005) Noninvasive prenatal diagnosis of fetal Rhesus D: ready for Prime(r) Time. *Obstet Gynecol*, 106, 841-4.
24. Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouannic JM, Ernault P, Dumez Y. (2001) First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Prenat Diagn*, 21, 1070-4.
25. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, Gerovassili A, Jin Y, Nicolaides KH, Cantor CR, Ding C. (2007) Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med*, 13, 218-23.
26. Tsui NB, Ng EK, Lo YM. (2006) Molecular analysis of circulating RNA in plasma. *Methods Mol Biol*, 336, 123-34.
27. Dhallan R, Guo X, Emche S, Damewood M, Bayliss P, Cronin M, Barry J, Betz J, Franz K, Gold K, Vallecillo B, Varney J. (2007) A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet*, 369, 474-81.
28. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. (2008) Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 16266-71.
29. Sackett DL, Haynes RB. (2002) The architecture of diagnostic research. *Bmj*, 324, 539-41.
30. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schutze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Brechot C, Paterlini-Brechot P. (2000) Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol*, 156, 57-63.
31. Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G. (1999) Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 4494-9.
32. Blake D, Tan SL, Ao A. (1999) Assessment of multiplex fluorescent PCR for screening single cells for trisomy 21 and single gene defects. *Mol Hum Reprod*, 5, 1166-75.

33. Hu Y, Zheng M, Xu Z, Wang X, Cui H. (2004) Quantitative real-time PCR technique for rapid prenatal diagnosis of Down syndrome. *Prenat Diagn*, 24, 704-7.
34. Zimmermann B, Holzgreve W, Wenzel F, Hahn S. (2002) Novel real-time quantitative PCR test for trisomy 21. *Clin Chem*, 48, 362-3.
35. Findlay I, Matthews P, Toth T, Quirke P, Papp Z. (1998) Same day diagnosis of Down's syndrome and sex in single cells using multiplex fluorescent PCR. *Mol Pathol*, 51, 164-7.
36. Gigarel N, Frydman N, Burette P, Kerbrat V, Steffann J, Frydman R, Munnich A, Ray PF. (2004) Single cell co-amplification of polymorphic markers for the indirect preimplantation genetic diagnosis of hemophilia A, X-linked adrenoleukodystrophy, X-linked hydrocephalus and incontinentia pigmenti loci on Xq28. *Hum Genet*, 114, 298-305.
37. Hahn S, Garvin AM, Di Naro E, Holzgreve W. (1998) Allele drop-out can occur in alleles differing by a single nucleotide and is not alleviated by preamplification or minor template increments. *Genet Test*, 2, 351-5.
38. Piyamongkol W, Bermudez MG, Harper JC, Wells D. (2003) Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod*, 9, 411-20.

Figure 1: CGH analysis performed on a single normal cell isolated by ISET and microdissected

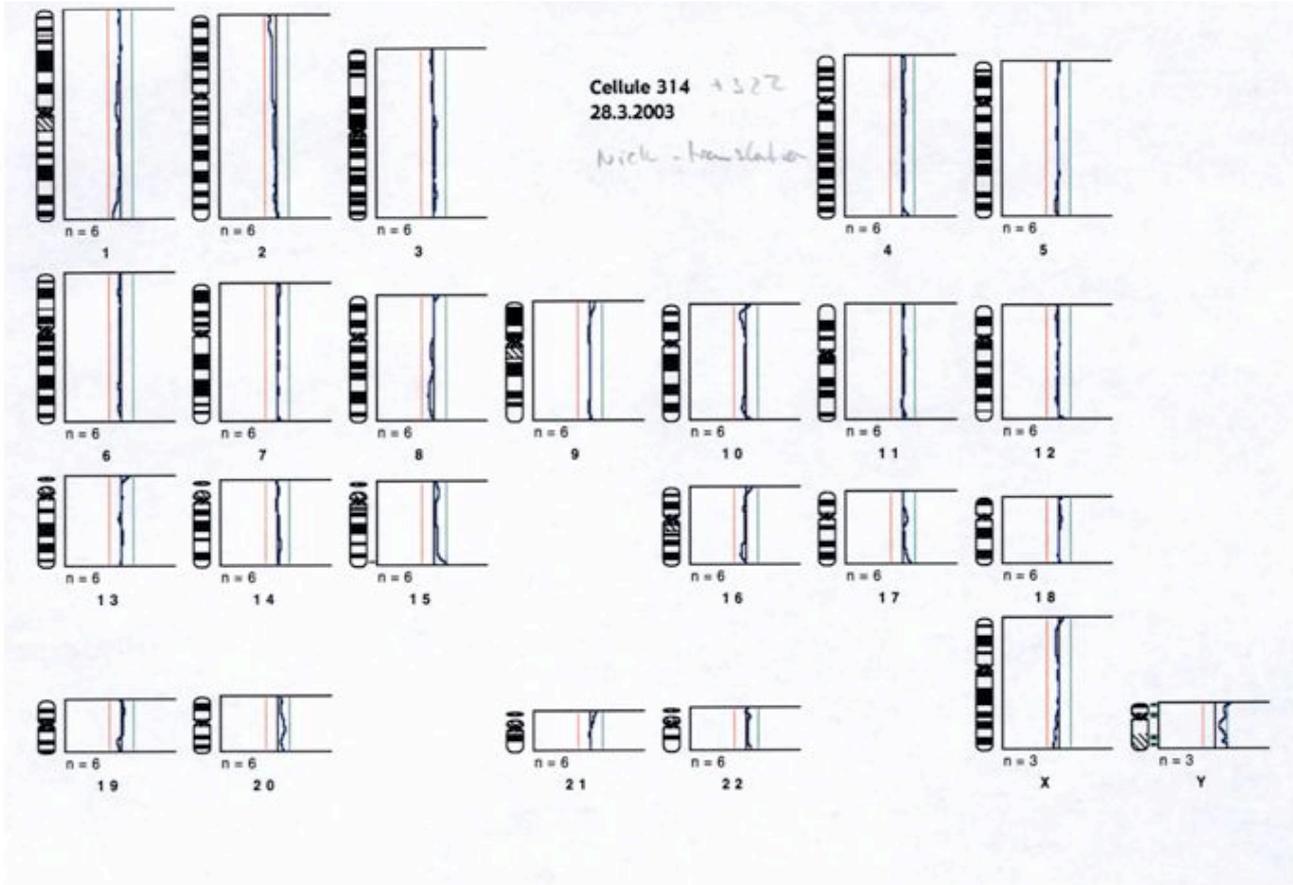


Figure 2: CGH analysis performed on a HuH-7 single tumor cell isolated by ISET and microdissected

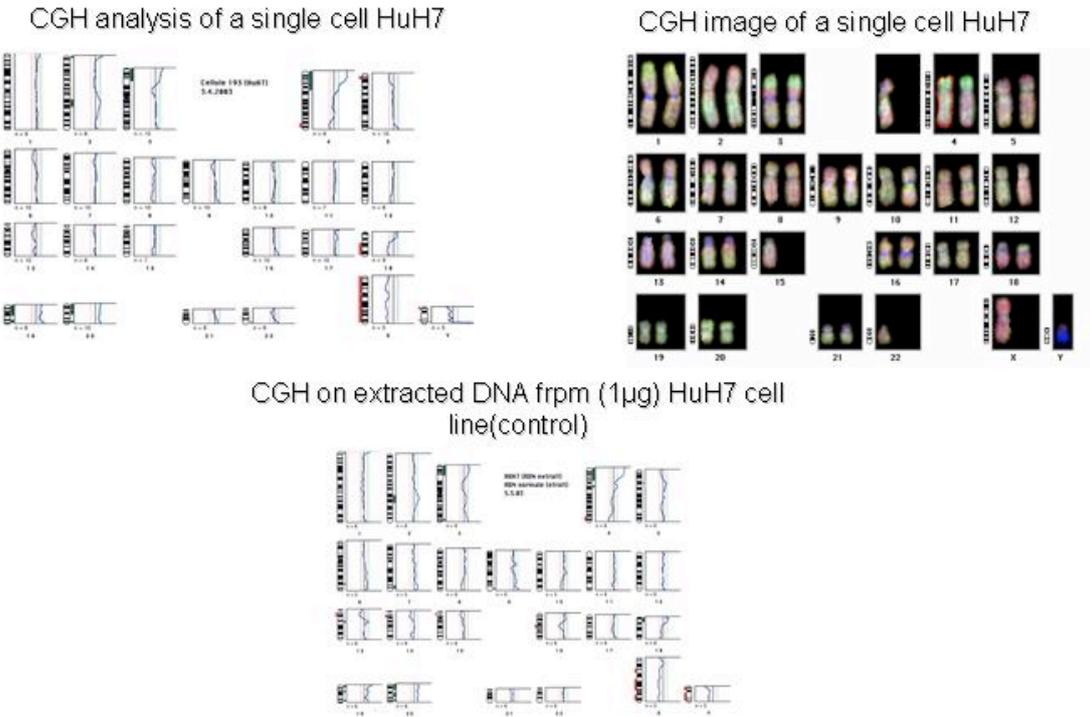


Figure 3: CGH analysis performed on a single fetal cell from a fetus with trisomy 21 isolated by ISET and microdissected

