

# Recherche de l'ADN fœtal dans le sang maternel

Le fait de découvrir que des quantités importantes d'ADN fœtal libre circulent dans le plasma (ou le sérum) a ouvert de nouvelles voies de recherche et perspectives [7]. Les nombreux travaux réalisés à ce jour ont déjà permis d'acquérir une bonne compréhension des mécanismes physiologiques conduisant à la présence de cet ADN fœtal dans le plasma/sérum des femmes enceintes. Sept ans après cette découverte, l'analyse de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel fait partie intégrante des outils du diagnostic prénatal même si ces tests sont encore réservés à de rares laboratoires spécialisés dans le monde.

Jean-Marc COSTA

Centre de Diagnostic Prénatal, Hôpital Américain de Paris, Neuilly.

## I. INTRODUCTION

Le risque de perte fœtale associé aux procédures invasives de diagnostic prénatal (villosités chorales, liquide amniotique ou sang fœtal) a incité depuis longtemps à la recherche de moyens non invasifs de diagnostic prénatal des maladies génétiques ou chromosomiques. Les travaux ont longtemps porté sur l'isolement et l'analyse de cellules fœtales à partir du sang maternel. Si la présence de cellules fœtales dans la circulation sanguine est une réalité qui n'est plus à démontrer à l'heure actuelle, leur utilisation comme moyen de diagnostic prénatal reste encore très limitée. **Le diagnostic prénatal de maladies monogéniques** a déjà été réalisé dans le passé par cette approche [1,2,3] mais reste anec-

## LA PCR EN DE LA RECHERCHE AU TIENT EN 2

### LightCycler 2.0

- **La passion de découvrir**

Possibilité de réaliser des PCR "multiplex" (PCR duplex en sondes d'hydrolyse, PCR tétraplex en sondes d'hybridation).

- **L'exigence d'excellence des résultats**

"Capillaires et échanges thermiques ultra-rapides par air pulsé" permettant d'atteindre des sensibilités et des niveaux de résolution hors d'atteinte des systèmes munis de thermo-blocs.

- **La sécurité d'une valeur sûre**

Système ouvert et adaptable à de nombreux paramètres et applications tant en biologie humaine qu'en sécurité alimentaire, environnement, santé animale.

- 1<sup>er</sup> et seul système de PCR en temps réel



dotique. La seule étude clinique réalisée à grande échelle à ce jour, pour le diagnostic non invasif de la trisomie 21 foetale [4], a conduit à la conclusion que cette approche ne peut pas être proposée actuellement en raison d'un manque de sensibilité et de spécificité. Malgré les développements récents [5], son utilisation clinique à court terme semble donc peu probable. De même, l'alternative des cellules fœtales isolées à partir de lavage cervical ou utérin n'a pas encore fait la preuve de son efficacité et n'est donc pas utilisable [6].

## II. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ADN FŒTAL DANS LE SANG MATERNEL

### L'origine placentaire de l'ADN foetal circulant dans le plasma/sérum maternel ne fait plus aucun doute même si elle n'est pas exclusive.

Le nombre de cellules fœtales intactes circulant dans le sang maternel a été évalué à environ une cellule par ml de sang et ne peut donc pas expliquer la quantité d'ADN foetal plasmatique et sérique observée. L'hypothèse proposant que l'état apoptotique de ces cellules pourrait être à l'origine de cet ADN libre a donc été évoquée. Sekizawa et al. [8] ont en effet confirmé qu'environ 50% des érythroblastes fœtaux présents dans la circulation maternelle sont en état d'apoptose. Cependant, Zhong et al. [9] ont récemment démontré que ces érythroblastes fœtaux ne sont pas la source cellulaire essentielle de l'ADN foetal plasmatique ; en effet, il n'est pas retrouvé de corrélation entre le nombre d'érythroblastes fœtaux et la quantité d'ADN foetal circulant, notamment chez les patientes ayant accouché prématurément alors que chez celles-ci, la quantité d'ADN foetal circulant est significativement élevée.

**Le placenta est donc la source logique d'ADN foetal en raison de sa taille et de son activité cellulaire importante.** L'observation d'une aug-

mentation croissante, mais fluctuante [10], tout au long de la grossesse de la concentration en ADN foetal [11,12,13] et la mise en évidence d'une corrélation entre le taux de b-hCG sérique maternel (produit par les cellules trophoblastiques) et la quantité d'ADN foetal circulant [14] confortent cette hypothèse. Une observation personnelle [15] vient de nous apporter la preuve que l'ADN foetal libre circulant est bien issu des cellules cyto- et syncytio-trophoblastiques. Par contre, le mécanisme par lequel cet ADN foetal est relargué dans la circulation maternelle n'est pas connu; la capture et la dégradation au niveau des capillaires pulmonaires des très nombreuses cellules trophoblastiques libérées dans la circulation sanguine utérine pourraient expliquer la grande quantité d'ADN foetal dans le sérum maternel. Le relarguage actif à partir des villosités chorales est également une hypothèse plausible.

Par ailleurs, la cinétique de l'ADN foetal dans la circulation sanguine maternelle conforte également l'hypothèse que le placenta en est la source essentielle. Lo et al. [11] ont montré qu'il est possible d'en détecter la présence dès 6 semaines de grossesse. Notre équipe a complété ces données par une étude ciblée sur les toutes premières semaines de grossesse après transfert d'embryon chez des patientes ayant eu recours à une fécondation *in vitro* [16]. Il apparaît que l'ADN foetal peut être détecté dès le 18<sup>ème</sup> jour pour certaines patientes et pour 80% d'entre elles au 28<sup>ème</sup> jour. Or, la circulation foeto-placentaire définitive n'est pas établie avant 28-30 jours après la conception, ce qui sous-entend fortement que l'ADN foetal circulant n'est pas d'origine hématopoïétique. Ces données sont importantes également en raison de leur implication diagnostique (voir indications). **La quantité d'ADN foetal fluctue et augmente ensuite tout au long de la grossesse [10].**

Enfin, le transfert foeto-maternel direct de molécules d'ADN peut être

# TEMPS RÉEL DIAGNOSTIC MÉDICAL SYSTEMES

COBAS  
**TaqMan**  
48

pour le diagnostic de routine.

- Système et réactifs marqués CE-IVD pour la quantification HIV, HCV et HBV.
- Performances inégalées en linéarité et seuils de sensibilité exceptionnels.
- Diagnostic PCR rendu en 2 à 3 heures.

MARQUAGE  
CE-IVD



Diagnostics



théoriquement envisagé à partir du sang maternel ou du liquide amniotique ; ce dernier contient en effet 200 fois plus d'ADN foetal libre que le plasma maternel [17]. Pour information, on notera également que de l'ADN foetal a pu être détecté dans le liquide céphalo-rachidien [18], le liquide péritonéal [19] et (de manière plus controversée) dans l'urine [20] de femmes enceintes.

Un point particulièrement important est celui de l'élimination de l'ADN foetal du sérum maternel. Il a été clairement démontré [21] que **l'ADN foetal libre est totalement éliminé de la circulation maternelle moins de 48h après l'accouchement**. Après interruption de grossesse par voie médicamenteuse au premier trimestre, la persistance de l'ADN foetal ne dépasse pas 11 jours [22]. En dépit de cette clairance extrêmement rapide, Invernizzi et al. [23] rapportent la détection d'ADN foetal dans le plasma de patientes en dehors d'un contexte de grossesse. L'hypothèse d'une éventuelle persistance d'ADN foetal libre n'est cependant pas en accord avec le haut niveau de fiabilité des résultats obtenus par différents groupes [24,25,26,27]. Cette hypothèse est aujourd'hui rejetée par plusieurs études récentes [28,29].

On peut donc globalement retenir que l'ADN foetal libre ne persiste pas dans la circulation maternelle contrairement à certaines cellules fœtales, et son analyse n'est donc pas faussée par des grossesses antérieures.

### III. LIMITES DE L'ANALYSE DE L'ADN FOETAL CIRCULANT : INDICATIONS ACTUELLES

L'ADN foetal circulant n'est pas contenu *a priori* dans un noyau cellulaire ("cell-free DNA"). Par conséquent, aucune analyse chromosomique (caryotype foetal) n'est envisageable. D'autre part, cet ADN foetal est "dilué" au sein d'un ADN largement majoritaire et hautement homologue qu'est l'ADN libre circulant d'origine maternelle sans qu'on puisse l'isoler spécifiquement actuellement. **Cette donnée est fondamentale puisque seules les séquences géniques fœtales absentes ou différentes du génome maternel** pourront être recherchées et/ou étudiées. Par voie de conséquence, **les deux indications essentielles de l'analyse de l'ADN foetal circulant dans le sérum maternel sont, d'une part, la détermination du sexe foetal et d'autre part, le génotypage RHD foetal.**

#### 1) Détermination du sexe foetal

Le sexe foetal peut être déterminé de manière non invasive et fiable par échographie fœtale. Toutefois cette détermination n'est généralement effectuée qu'à partir du deuxième trimestre de la grossesse puisque l'échographie n'est pas encore suffisamment fiable au premier trimestre malgré les progrès récents [30,31]. **Or, le diagnostic prénatal de maladies génétiques liées au chromosome X (hémophilie, myopathie de Duchenne, retards mentaux...) nécessite une connaissance précoce du sexe foetal afin de pouvoir proposer aux patientes un diagnostic prénatal précoce.**

La biopsie de villosités chorales était jusqu'à présent la seule technique permettant de déterminer précocement le sexe du fœtus (à partir de la 10<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée) par analyse chromosomique et d'entreprendre une analyse de génétique moléculaire en cas de fœtus mâle. **Les inconvénients liés à cette procédure** invasive (taux de fausse-couche induit, échec de prélèvement...) étaient dommageables en cas de fœtus de sexe féminin puisque ceux-ci ne sont pas atteints par ces maladies récessives liées à l'X.

La détermination non invasive et précoce du sexe foetal a donc un intérêt évident pour la prise en charge des patientes conductrices de

ces maladies génétiques. Plusieurs études ont montré qu'il était possible **de connaître le sexe foetal par la mise en évidence dans le sérum maternel de séquences géniques spécifiques du chromosome Y** (donc issues de fœtus de sexe masculin). La séquence cible la plus utilisée pour cela est celle du **gène du déterminisme du sexe (sex determining region Y chromosome ou SRY)**. Deux études [24,25] réalisées au cours du premier trimestre de grossesse ont conclu à la **possibilité de déterminer le sexe foetal avec une grande fiabilité** (spécificité et sensibilité de 100%). Dès lors, **une nouvelle stratégie de prise en charge du diagnostic prénatal des maladies liées au chromosome X a pu être définie [32]**. Cette stratégie repose sur la détermination non invasive et précoce (**entre 10 et 12 SA**) du sexe foetal par analyse de l'ADN foetal du sérum maternel. Si le fœtus est de sexe féminin, seule une surveillance échographique est réalisée et **la biopsie de villosités chorales n'est proposée qu'aux seuls fœtus mâles**. Cette nouvelle stratégie est maintenant adoptée par la plupart des centres de génétique médicale.

**L'intérêt de déterminer le sexe foetal aussi tôt en début de grossesse est également utile pour la prise en charge des couples à risque d'hyperplasie congénitale des surrénales**. Dans cette situation, un traitement par corticoïdes est généralement instauré très tôt en début de grossesse afin d'éviter une possible virilisation des fœtus de sexe féminin. Toutefois, les conséquences à long terme d'un tel traitement ne sont pas connues. Celui-ci pourrait être évité en cas de fœtus masculin [33,34]. **C'est aujourd'hui une des indications les plus fréquentes de détermination précoce du sexe foetal par analyse du sang maternel.**

#### 2) Détermination du génotype RHD foetal

Le génotypage RHD foetal a pu être déterminé par analyse de l'ADN foetal présent dans le plasma maternel [27,35,36]. Il a été en effet découvert que le phénotype RhD-négatif résulte majoritairement dans la population caucasienne, sauf rares exceptions [37], d'une **délétion complète du gène RHD**. La mise en évidence de séquences RHD (absentes du génome maternel chez une femme RhD-négative) est donc la signature d'un ADN foetal et **permet ainsi de définir le génotype RHD du fœtus**. Cette nouvelle possibilité de définir le génotype RHD foetal de manière non invasive offre de nombreux avantages. Outre le fait qu'elle permet d'éviter une potentialisation de l'allo immunisation engendrée par un geste invasif, elle est surtout intéressante chez des patientes à risque (RhD-négatives) mais ne devant pas subir *a priori* de geste invasif. Chez ces dernières, **la connaissance de ce génotype RHD peut ainsi, en cas de fœtus RhD-négatif, alléger la surveillance de la grossesse (surveillance sérologique, injection d'anti-D...)**. Par ailleurs, les immunoglobulines anti-D sont un produit sanguin d'origine humaine, rare et potentiellement infectieux, qu'il conviendrait donc de réserver aux seules patientes RhD-négatives porteuses d'un fœtus RhD-positif. Selon Lo et coll. [35], **la détermination du génotype RHD foetal n'est fiable qu'à partir du second trimestre de la grossesse, mais une étude récente réalisée au premier trimestre de la grossesse [27] a permis de démontrer qu'il est possible de définir de façon fiable ce génotype RHD foetal très tôt dans la grossesse**. Deux études pré-cliniques à grande échelle [26,38] viennent de montrer la grande fiabilité de cette approche, mais **seuls trois centres en Europe sont pour l'instant capables d'intégrer cette analyse comme test diagnostique.**

### 3) Autres applications

Pour information, d'autres applications ont été rapportées dans la littérature à titre expérimental le plus souvent et dont l'intérêt diagnostique est limité :

- dystrophie myotonique de Steinert [39],
- translocations chromosomiques [40],
- hémoglobine E [41],
- maladie de Huntington [42],
- polymorphismes localisés sur le chromosome X [43].

Chez des couples à risque, un diagnostic prénatal d'exclusion de **mucoviscidose [44,45], de thalassémies [46] et d'hyperplasie congénitale des surrénales [47]** utilisant l'analyse de l'ADN fœtal du sang maternel a été décrit. Plus intéressante, la recherche d'une mutation ponctuelle *de novo* (gène FGFR3) a pu être réalisée par analyse du plasma maternel [48]. En confirmant et complétant l'examen échographique du fœtus, un **diagnostic totalement non invasif d'achondroplasie** est donc désormais accessible. Enfin, Poon et al. [49] ont démontré que la contribution maternelle de l'ADN fœtal pouvait être analysée par le biais de modifications épigénétiques (méthylation différentielle).

Au-delà de l'utilisation de l'ADN fœtal plasmatique pour définir des traits génétiques du fœtus, **il a été également suggéré que sa quantification pouvait être un marqueur de "bien être"**. Une élévation de sa quantité est observée au décours de pré-éclampsie [50], d'accouchement prématuré [51], d'hémorragie foeto-maternelle [52], de polyhydramnios [53], de vomissements gravidiques [54]. Enfin de nombreux travaux portent actuellement sur **l'association entre la quantité d'ADN fœtal circulant et une trisomie fœtale**. La **quantification de cet ADN pourrait être un marqueur sérique au même titre que l'hCG, l'estriol et l'inhibine A [55,56]**.

**On gardera cependant à l'esprit que toutes ces études ne portent que sur les seuls fœtus de sexe masculin pour lesquels on peut détecter spécifiquement leur génome (séquences géniques portées par le chromosome Y).**

### IV. TECHNIQUES

L'analyse de l'ADN fœtal dans le sang maternel s'affranchit des problèmes d'isolement et d'enrichissement, préalables à l'étude des cellules fœtales. Elle est ici directe et relativement simple puisqu'elle **ne requiert qu'une "simple" extraction des acides nucléiques à partir du sang maternel**. Toutefois la quantité d'ADN fœtal circulant est très faible, particulièrement au cours du premier trimestre de la grossesse (**environ 25 copies par ml de sérum**). Or c'est précisément durant cette période de la grossesse que le diagnostic prénatal est préférentiellement réalisé. **L'analyse de l'ADN fœtal circulant requiert donc une méthode très sensible mais surtout fiable** ; elle reste donc une analyse très délicate à mettre en œuvre réservée encore à quelques laboratoires très spécialisés. Une étude récente [57] vient d'ailleurs de confirmer la grande variabilité des résultats selon les laboratoires, **la sensibilité de la détection allant de 31% pour certains à 97% pour d'autres**.

**La technique de choix est indiscutablement aujourd'hui l'amplification génique par PCR en temps réel** (avec utilisation de sondes d'hybridations spécifiques) en raison de sa **sensibilité** et sa **spécificité** mais surtout en raison de l'importante **sécurité** d'analyse qu'elle procure (absence de contaminations). **Associée à des procédés automatiques d'extraction des acides nucléiques [58], la PCR en temps réel a une fiabilité jamais égalée par les méthodes conventionnelles qui devraient être proscrites** dans l'analyse de l'ADN fœtal circulant, plus particulièrement celles utilisant une "nested-PCR" source de faux-positifs.

### V. PERSPECTIVES

Comme évoquée précédemment, la limitation majeure de l'analyse de l'ADN fœtal circulant tient à **l'impossibilité d'analyser les séquences génétiques d'origine maternelle puisque le fœtus partage pour moitié son génome avec elle**. La démonstration que des **ARN fœtaux** sont également présents dans la circulation maternelle ouvre de nouvelles perspectives [59,60,61,62]; ces transcrits étant produits par des cellules du placenta, **leur analyse est indépendante du génome maternel et peut donc être élargie à l'ensemble des fœtus quel que soit leur sexe**. C'est sans doute une voie d'avenir extrêmement intéressante en attendant que les évolutions technologiques permettent enfin **l'étude des cellules fœtales circulantes**. ■

Retrouvez cet article et ses références sur [BioTribune.com](http://BioTribune.com), Espace grossesse.



BioTribune

Retrouvez sur [BioTribune.com](http://BioTribune.com)  
le dossier Biologie  
des urgences.\*

(\*Accès réservé à nos abonnés)

