

Diagnostic prénatal moléculaire non invasif de l'achondroplasie par analyse de l'ADN foetal circulant

Sophie PEDRONNO⁽¹⁾, Alexandra BENACHI⁽²⁾, Monique KOHLER⁽³⁾, Hélène STORA DE NOVION⁽⁴⁾, Bernard LE FIBLEC⁽⁵⁾, Michel VOULGARPOULOS⁽⁶⁾, Romain FAVRE⁽³⁾, Jean-Marc COSTA⁽¹⁾

⁽¹⁾Laboratoire Cerba, Cergy-Pontoise, France (jmcosta@lab-cerba.com/Fax:0134402029/Tel:0134402111)

⁽²⁾Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Bécélère, Clamart, France

⁽³⁾CMCO-SIHCUS, Schiltigheim, France

⁽⁴⁾Laboratoire Genazur, Nice, France

⁽⁵⁾Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalier, Saint-Brieuc, France

⁽⁶⁾Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalier, Gonesse, France

INTRODUCTION

L'achondroplasie est la chondrodysplasie la plus fréquente qui touche environ 1 enfant sur 15.000. Il s'agit d'une maladie dont la transmission est de type autosomique dominante et qui résulte dans la majorité des cas d'une mutation *de novo* (la mutation G380R du gène FGFR3 dans plus de 99 % des cas). En période prénatale, le diagnostic d'achondroplasie est évoqué généralement au troisième trimestre de la grossesse devant des signes d'appels échographiques évocateurs (principalement association de fémurs courts et d'un diamètre bipariétal normal ou augmenté). Ces signes conduisent en principe à des explorations complémentaires, soit non invasives (scanner 3D dont l'objectif est de conforter le diagnostic), soit invasives (amniocentèse afin d'apporter la preuve formelle de ce diagnostic par analyse du gène FGFR3).

Nous présentons les résultats de la détection des mutations c.1138G>A et c.1138G>C du gène FGFR3 par PCR en temps réel et fusion haute résolution (High Resolution Melting) dans le plasma de femmes enceintes.

MATERIELS & METHODES

I - Prélèvement maternel

- Prélèvement sanguin : sang total EDTA
- Plasma maternel obtenu après centrifugation (10 min à 4.000 tr/min)
- Extraction de l'ADN total : à partir de 1 ml de plasma, extraction automatique sur MagNaPure au moyen du kit MAGNAPure Compact Nucleic Isolation Kit (large volume) Compact (Roche Diagnostics). ADN total recueilli sous un volume de 50 µl de tampon d'élution.

II - Amplification PCR HRM : LightCycler 480 (Roche Diagnostics)

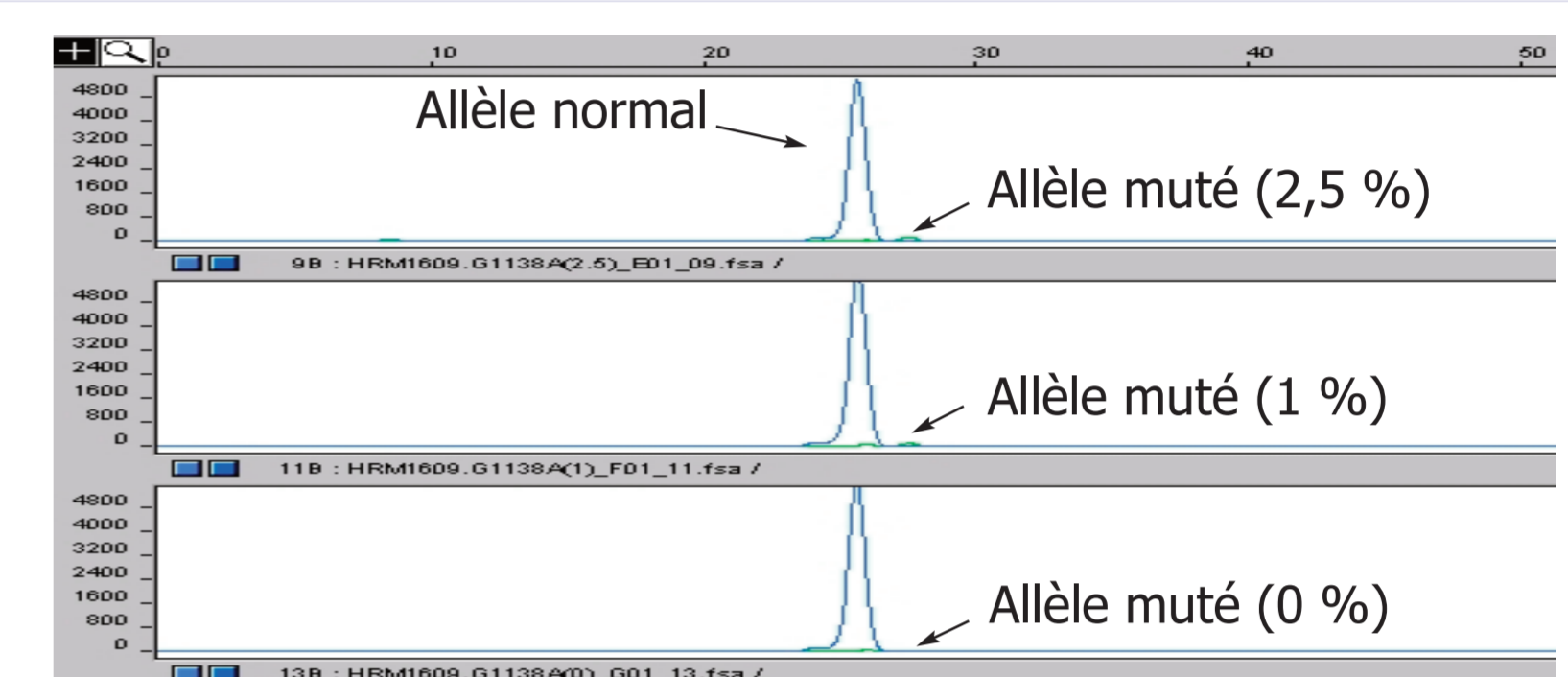
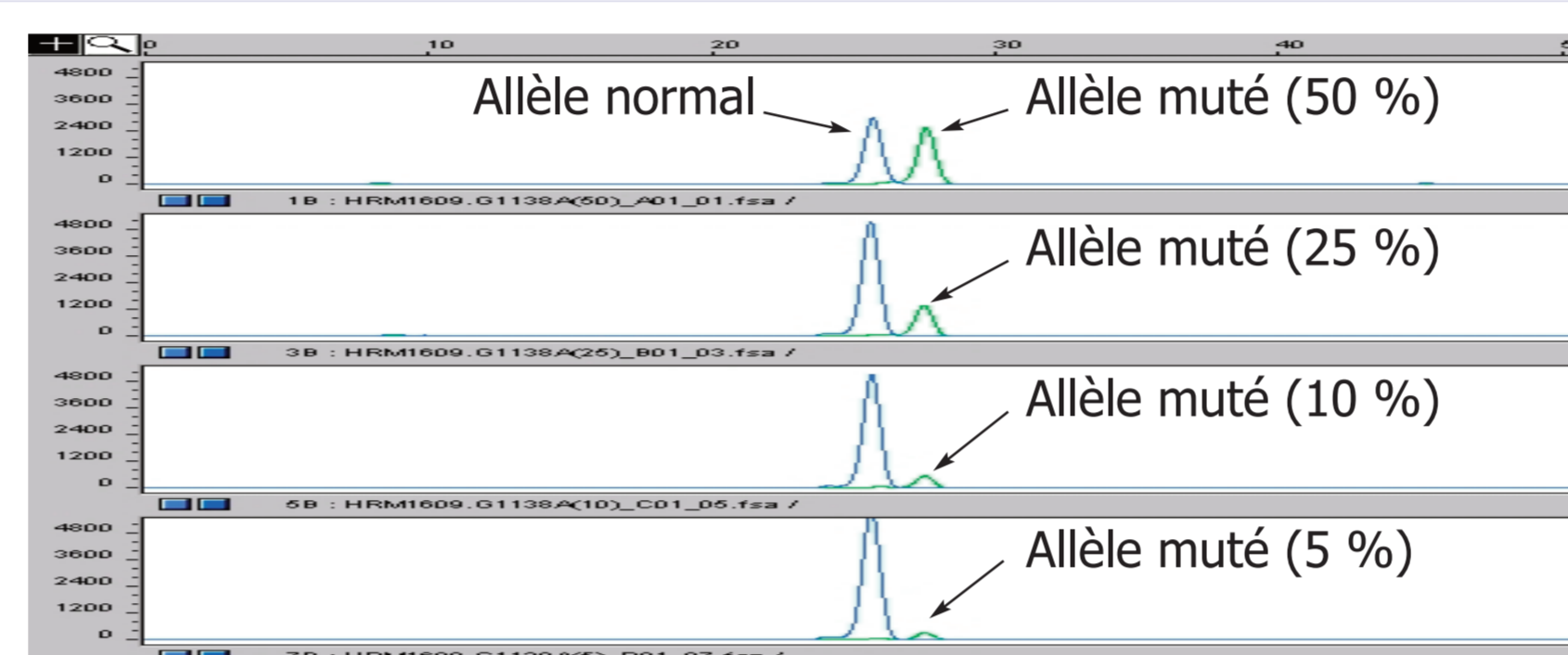
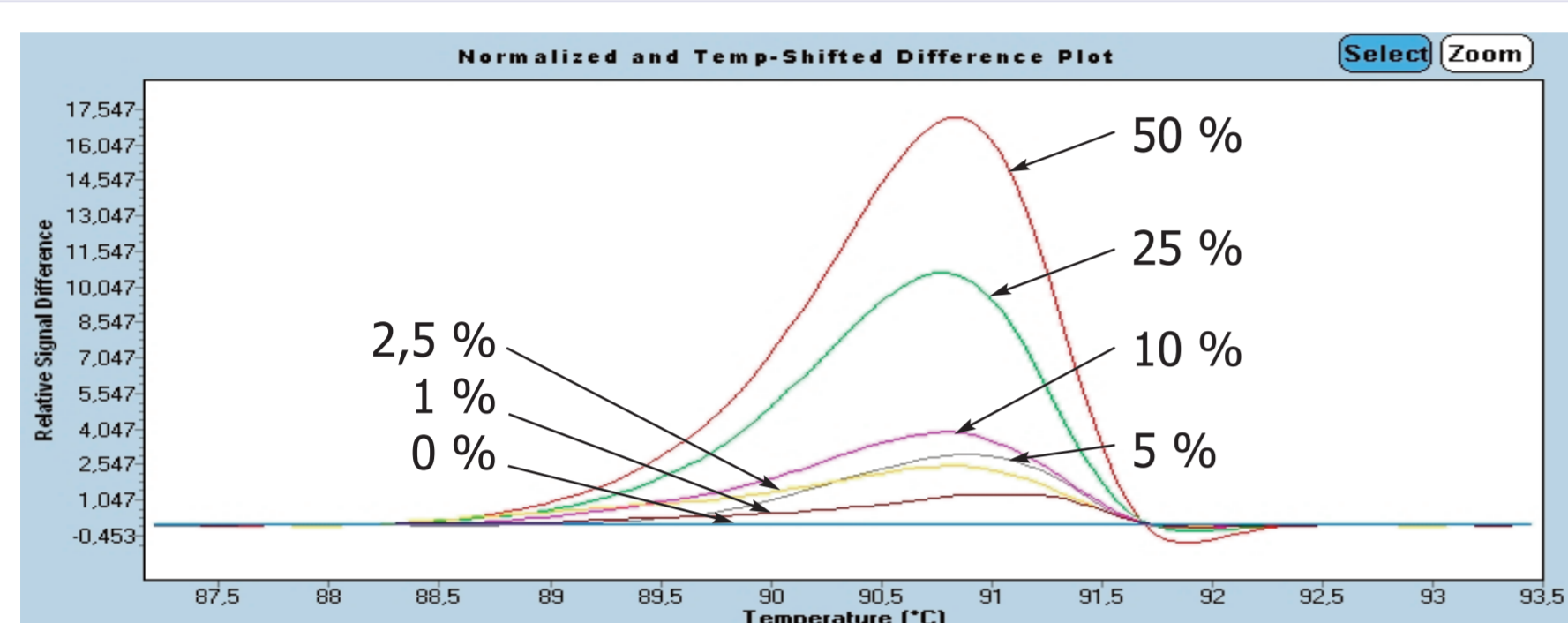
- Réaction de PCR sous un volume final de 20 µl (LC480 HRM master 1x, MgCl₂ 3mM, Primers 0.25 µM, ADN 5 µl)
- Paramètres d'amplification : dénaturation initiale 10 min 95°C puis 50 cycles 95°C 10 sec, 68°C 10 sec, 72°C 15 sec
- Paramètres de courbe de fusion : 1 min 95°C puis 1 min 40°C puis acquisition de fluorescence de 65°C à 95°C (1°C/s et 25 acquisitions par °C)

III - Mini-séquençage

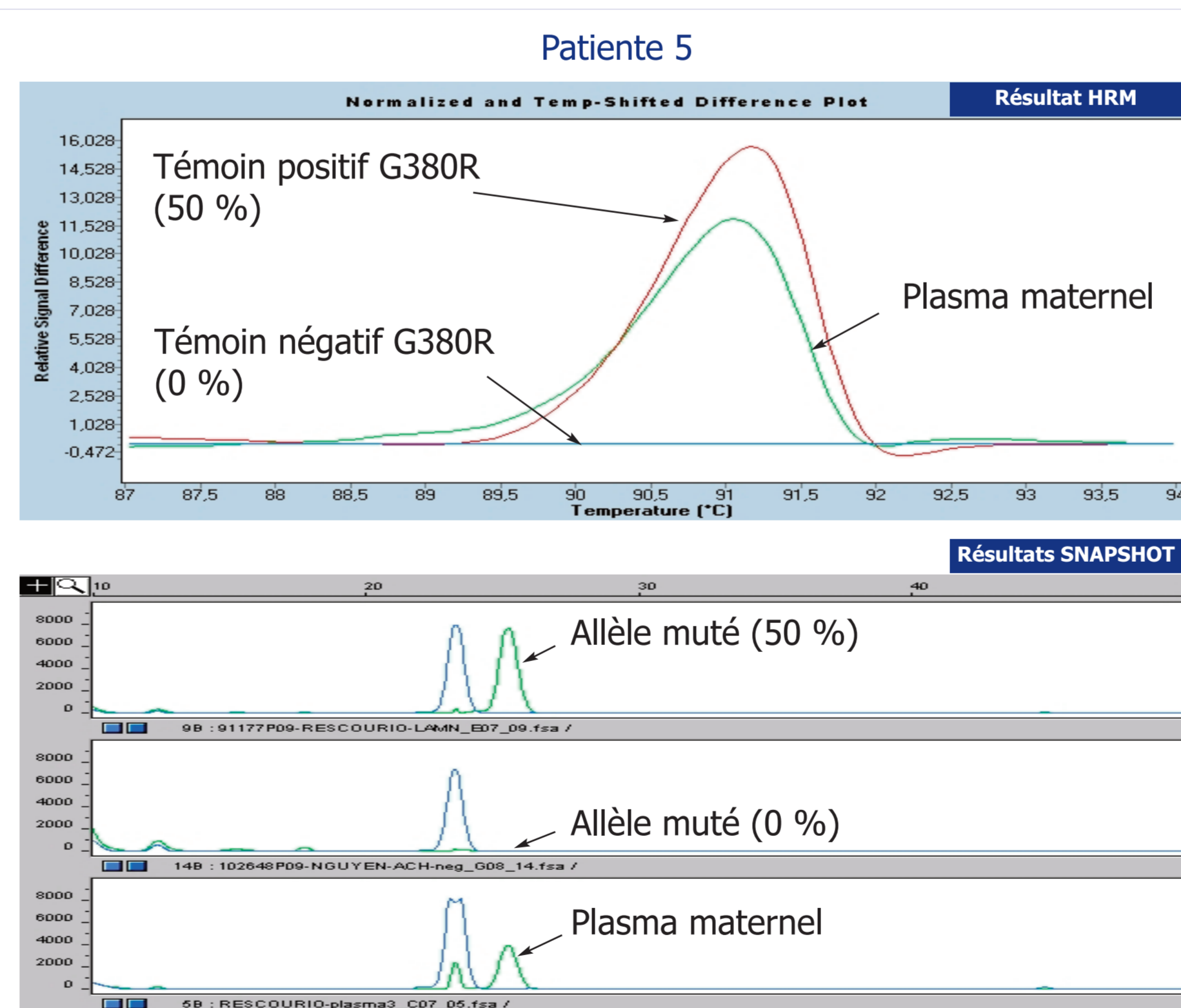
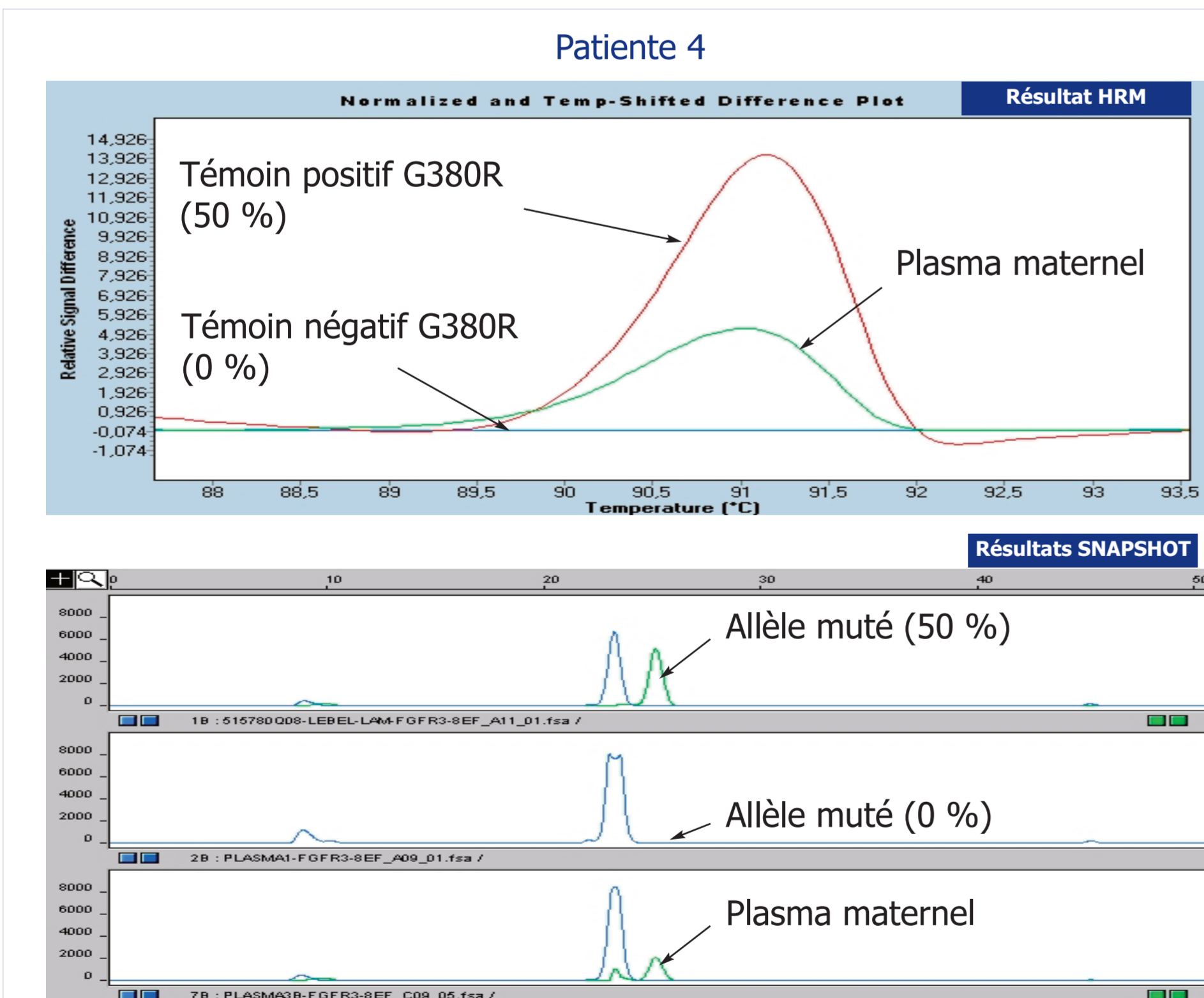
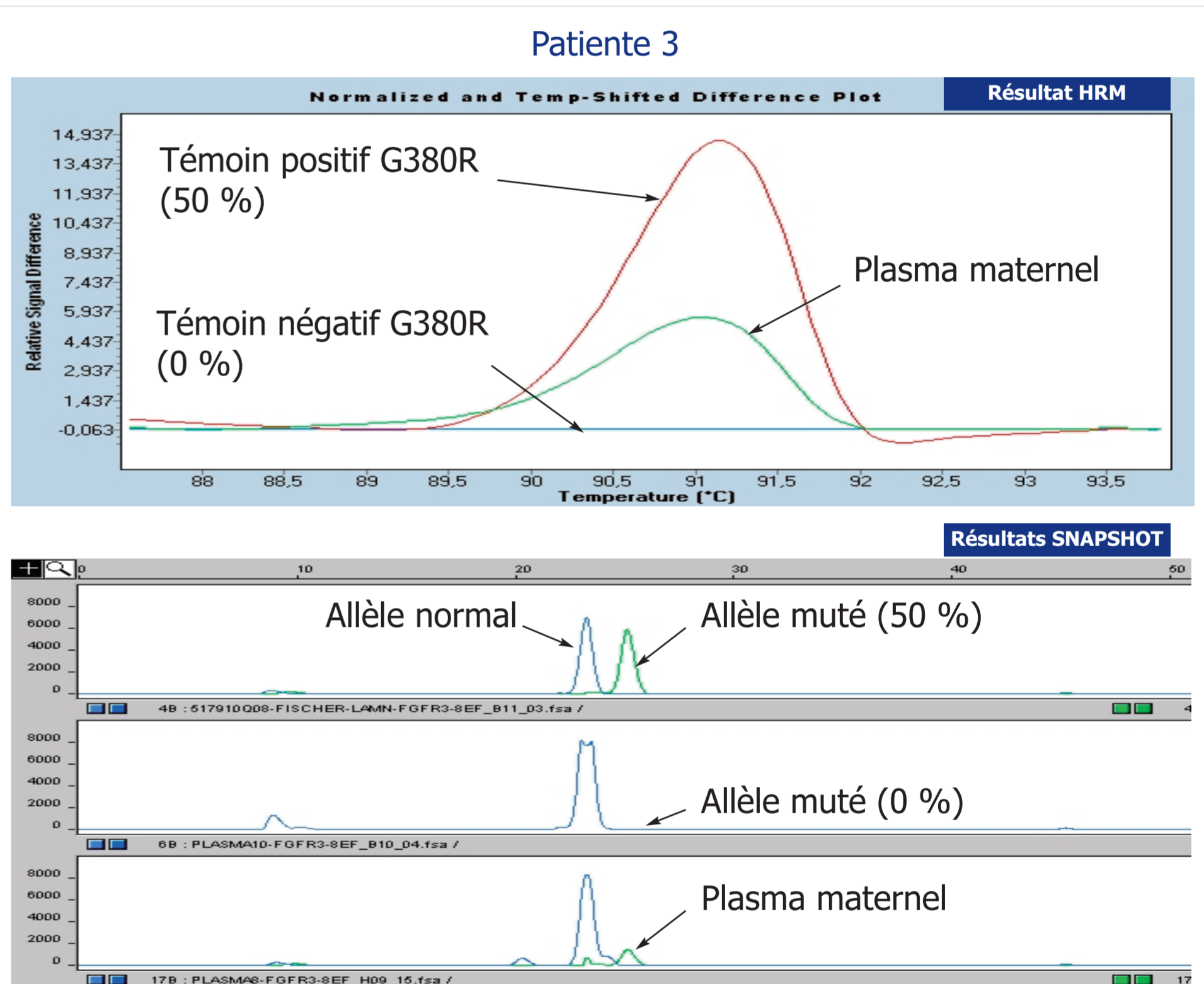
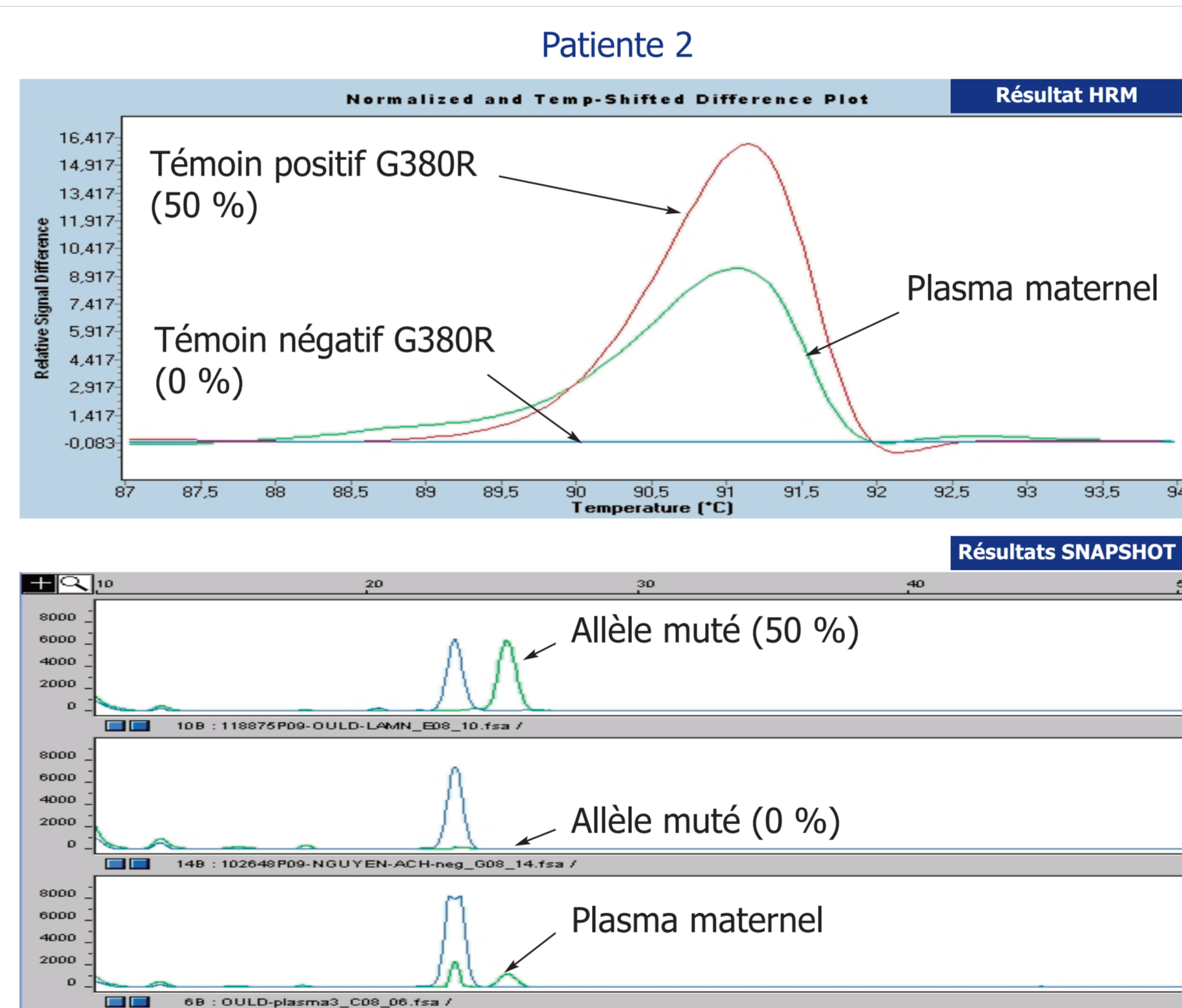
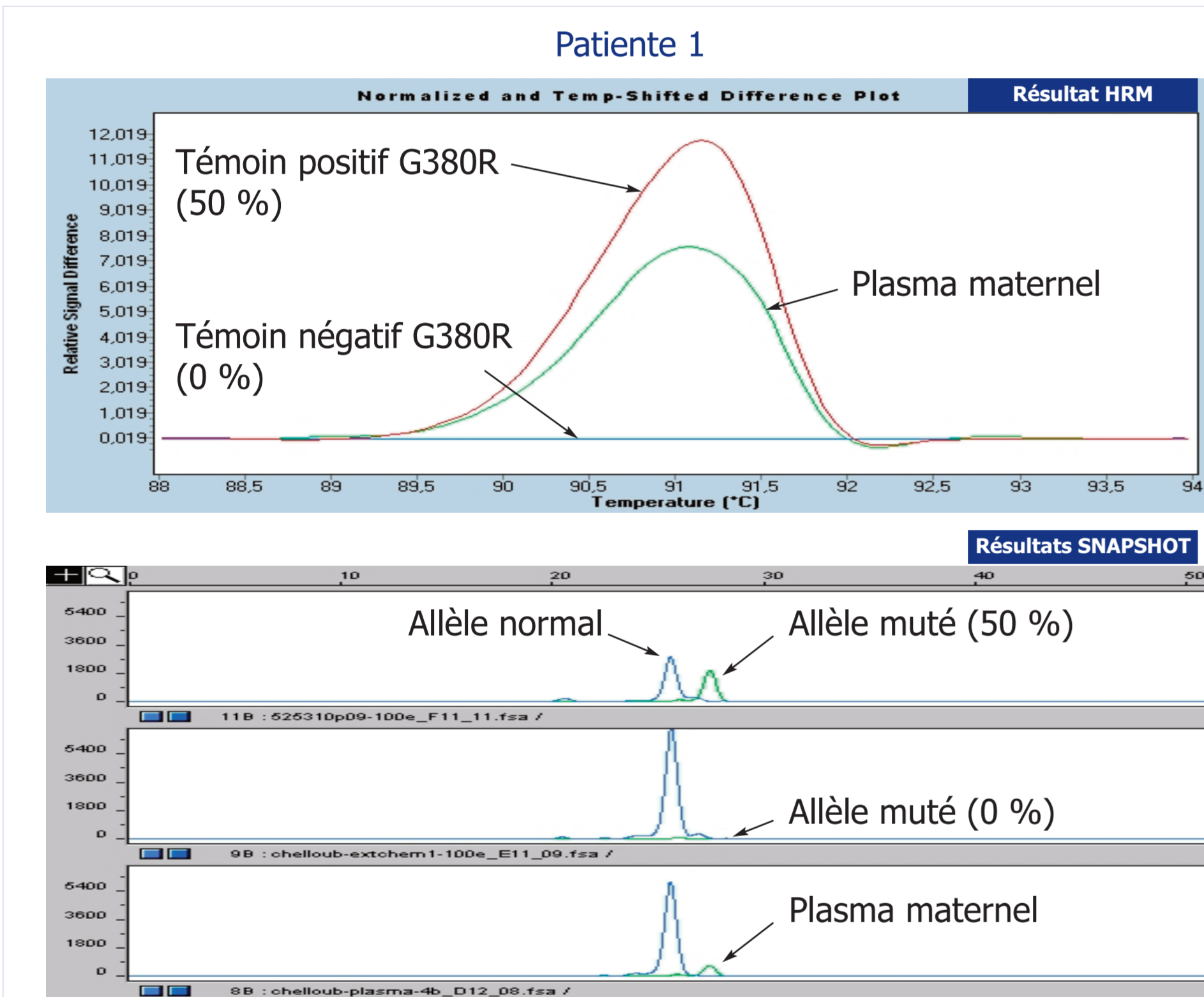
- Purification par ExoSAP-IT (USB) de 5µl de réaction de PCR selon protocole fournisseur
- Mini-séquençage au moyen du kit SNaPshot Multiplex (Applied Biosystems) selon protocole fournisseur
- Analyse sur ABI3100 analyzer et logiciel Genescan (Applied Biosystems)

RESULTATS

1. Sensibilité de détection - Détection de la mutation G380R du gène *FGFR3* : gamme de dilution d'un ADN muté (G1138A) dans un ADN WT



2. RÉSULTATS PATIENTES



Données Patientes

Patiente	Echographie Terme (SA)	Longueur fémorale (percentile)	Diamètre bipariétal (percentile)	Autres signes
1	26	< 5ème	72ème	RAS
2	29	< 5ème	50-90ème	RAS
3	26	< 3ème	90ème	Enselleure nasale marquée
4	36	< 3ème	> 97ème	RAS
5	28	< 5ème	70ème	Fémur incurvé

Patiente	Liquide amniotique	Liquide amniotique Terme (SA)	Sang maternel Terme (SA)	Etude du gène <i>FGFR3</i>
1	oui	29	33	Oui-Mutation G380R (G>A)
2	oui	31	33	Oui-Mutation G380R (G>A)
3	oui	27	29	Oui-Mutation G380R (G>A)
4	oui	36	38	Oui-Mutation G380R (G>A)
5	non	28	31	Oui-Mutation G380R (G>A)

Remerciements

Projet soutenu par un financement de l'Agence de la Biomédecine.

CONCLUSION

Le diagnostic prénatal non invasif de l'achondroplasie a été réalisé avec succès chez 5 patientes par analyse de l'ADN foetal plasmatique au troisième trimestre de grossesse.

Une étude multicentrique est actuellement en cours afin de valider cette approche en vue de son utilisation en routine clinique. Ce test pourrait éviter le recours à une amniocentèse tardive et viendrait compléter avantageusement (diagnostic génétique spécifique de certitude) les examens échographiques (scanner 3D)

La possibilité de détecter par une méthode simple et rapide un SNP absent du génome maternel ouvre de nouvelles perspectives. L'approche peut être étendue :

- aux autres anomalies génétiques de survenue *de novo* responsables d'autres chondrodysplasies de révélation tardive ;
- à la détection de SNP d'origine paternelle.

BIBLIOGRAPHIE

Trujillo-Tiebas MJ, Fenollar-Cortés M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Carrillo Redondo A, Ramos-Corralles C, Ayuso C. Prenatal diagnosis of skeletal dysplasia due to FGFR3 gene mutations: a 9-year experience: Prenatal diagnosis in FGFR3 gene. J Assist Reprod Genet. 2009;26(8):455-460

Schramm T, Gloning KP, Minderer S, Daumer-Haas C, Hörtnagel K, Nerlich A, Tutschek B. Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasia. Ultrasound Obstet Gynecol. 2009;24:160-170.

Boulet S, Althuser M, Nuges F, Schaal JP, Jouk PS. Prenatal diagnosis of achondroplasia: new specific signs. Prenat Diagn. 2009;29:697-702.

Baujot G, Legeal-Mallet L, Finidori G, Cormier-Daire V, Le Merrer M. Achondroplasia. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2008;22:3-18.

Li Y, Page-Christiansen GC, Gille JJ, Holzgreve W, Hahn S. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay. Prenat Diagn. 2007;27:11-7.

Li Y, Holzgreve W, Page-Christiansen GC, Gille JJ, Hahn S. Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma—case report. Prenat Diagn. 2004;24:896-898.

Ruano R, Molho M, Roume J, Ville Y. Prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasias by combining two-dimensional and three-dimensional ultrasound and intrauterine three-dimensional helical computer tomography. Ultrasound Obstet Gynecol. 2004;24:134-140.

Krakow D, Williams J 3rd, Poehl M, Rimoin DL, Platt LD. Use of three-dimensional ultrasound imaging in the diagnosis of prenatal-onset skeletal dysplasias. Ultrasound Obstet Gynecol. 2003;21:467-472.

Gooding HC, Boehm K, Thompson RE, Hadley D, Francomano CA, Blesesker BB. Issues surrounding prenatal genetic testing for achondroplasia. Prenat Diagn. 2002;22:933-940.

Moeglin D, Benoit B. Three-dimensional sonographic aspects in the antenatal diagnosis of achondroplasia. Ultrasound Obstet Gynecol. 2001;18:81-83.

Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanahara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. Lancet. 2000;356:1170.