



HAL
open science

Analyse de l'ADN foetal dans le sang maternel comme test de dépistage pour la trisomie 21 chez les grossesses gémellaires

Grégoire Le Conte

► **To cite this version:**

Grégoire Le Conte. Analyse de l'ADN foetal dans le sang maternel comme test de dépistage pour la trisomie 21 chez les grossesses gémellaires. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-02292929

HAL Id: dumas-02292929

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02292929v1>

Submitted on 20 Sep 2019

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2018

N° 96

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE
DOCTEUR EN MÉDECINE

Analyse de l'ADN fœtal dans le sang maternel comme test de
dépistage pour la trisomie 21 chez les grossesses gémellaires

Présentée et soutenue publiquement
le 12 juin 2018

Par

Grégoire LE CONTE
Né le 5 juin 1984 à Pithiviers (45)

Dirigée par Mme Le Docteur Alexandra Létourneau, PH

Jury :

Mme Le Professeur Alexandra Benachi, PU-PH..... Président

M. Le Professeur Michael Grynberg, PU-PH

M. Le Professeur Vassilis Tsatsaris, PU-PH

M. Le Docteur Jean-Marc Costa, Responsable de tests diagnostiques Labo. CERBA

Remerciements

A Madame le Professeur Alexandra Benachi :

Merci Alexandra pour votre confiance et votre soutien précieux tout au long de mon cursus. Merci également pour votre grande disponibilité et votre écoute. Vous êtes une des figures marquantes de mon internat. Ce fut pour moi un honneur de travailler à vos côtés. Antoine Béclère a été pour moi comme une deuxième famille.

A Madame le Docteur Alexandra Letourneau :

Merci Alex pour la bienveillance et la gentillesse. « Chef », « Directrice de thèse », les mots sont difficiles à trouver pour résumer tous ces moments de travail, de rire et de bonne humeur.

A Monsieur le Professeur Michael Grynberg :

Merci Michael pour ton aide et pour ton soutien tout au long de mon cursus. Le passage dans ton service de Bondy m'a énormément appris notamment dans le domaine de la préservation de la fertilité. J'espère que nous auront encore l'occasion de travailler ensemble.

A Monsieur le Professeur Vassilis Tsatsaris :

C'est un grand honneur que vous me faites en étant membre du jury de ma thèse. Mon passage à la maternité de Port Royal a été une étape clé dans mon apprentissage. Il est d'ailleurs prévu que j'y revienne dans un avenir proche. Je me fais une joie.

A Monsieur le Docteur Jean Marc Costa :

Quel plaisir d'avoir travaillé avec vous sur ce projet. Merci d'être présent dans ce jury. Cette thèse est pour moi l'aboutissement d'un travail commun.

A Monsieur le Docteur Jacques Jani :

Merci de m'avoir aidé dans cette étude, en particulier pour les statistiques.

A Monsieur le Docteur Pietro Santulli :

Merci Pietro de me faire confiance et de m'avoir proposé d'intégrer ton équipe. C'est pour moi un honneur de vous rejoindre en novembre.

L'équipe médicale d'obstétrique et de diagnostic anténatal d'Antoine Béclère :

Julien, Anne-Gaëlle, Aurore, Sophie, Benjamin Catherine et les sages femmes du DAN : Cécile, Béa, et Laure, qui m'ont bien aidée dans le recueil de données, merci à tous pour votre patience et votre gentillesse. Merci également à l'équipe chirurgicale : Xavier, Caroline, Anne-Laure, Thibault, Johanne et Sarah.

L'équipe médicale d'MDR d'Antoine Béclère #JeanDalsace :

Vanessa, Naouel, Elodie, Anne, les sages femmes Laure et Yael, les infirmières : je ne me suis jamais lassé de franchir les portes de Jean Dalsace pendant tout un semestre puis pendant mon master 2. Merci également à l'équipe

de BDR et au Professeur Nelly Frydman sans qui je n'aurais pas été au bout de mon projet de recherche de master 2.

A la maternité de Port Royale

Ce fut un plaisir de partager 6 mois d'internat avec toute l'équipe. Je me fais un plaisir de revenir très bientôt.

A tous les professeurs et médecins que j'ai eu l'honneur de rencontrer pendant mon internat et qui se sont impliqués activement dans ma formation : Le Pr Goffinet, le Pr Fanchin, le Pr Luton, le Pr Fauconnier, le Pr Carbillon, le Dr Guillonneau, le Dr Berkane, le Dr Bricou et tous les autres médecins que j'ai rencontré...

A tous mes anciens co-internes

Je vais forcément en oublier mais je tiens à tous vous remercier d'avoir participé avec moi à ces années d'internat passionnantes et riches en émotion : Je citerai notamment Nathalie, Thiphaine et Kelly (là où tout a commencé), Back Pussy (elle se reconnaîtra), Marie et Elodie (mes co-internes de chir préférées), Laura et Antoine (PR un jour PR toujours), Mathilde Laetitia et Emma (Vicky, Tiatia et Manue) ...

A ma famille

Merci à mes parents Yves et Florence, qui m'ont soutenu du début à la fin, à mes frères Martin et Loulou (best brothers ever), ma sœur Claire (élue meilleure sœur de l'année) et mon frère Thomas (qui veille sur moi).

Floppy et Nanou, mes cousines adorées, qui me connaissent depuis le berceau et dont la complicité n'a fait qu'« empirer » avec le temps.

Mon grand-père François (Bon Papa).

Mes deux grand-mères Françoise et Simone (Granny et Bonne Maman) qui veillent sur moi également.

A mes amis de longue date

Loubna (Loub), Cécile (Sousoule), Johanne (Jojo), Marie-Hélène (Katsumache), Fanny (La Marre), Julie (Lassus), Céline (Botchlika), Noémie et Hélène (Les G***) ... et plus récemment la clique des Mouite.

Spéciale dédicace à mes relecteurs Yves, Florence, Loubna et Alexandra

Ça y est, ma diclaixi n'a plus aucun secret pour vous...

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	7
a. Le Dépistage de la trisomie 21 par ADN libre circulant dans le sang maternel	7
<i>i. Historique du dépistage de la trisomie 21</i>	<i>7</i>
<i>ii. Principes du test par analyse de l'ADN fœtal libre circulant pour le dépistage de la trisomie 21 (ADNlcT21)</i>	<i>9</i>
b. Les grossesses gémellaires	16
<i>i. Généralités</i>	<i>16</i>
<i>ii. Définition</i>	<i>16</i>
<i>iii. Épidémiologie</i>	<i>17</i>
c. Le dépistage de la trisomie 21 chez les grossesses gémellaires	18
<i>i. Le dépistage combiné</i>	<i>18</i>
<i>ii. L'ADNlcT21 chez les grossesses gémellaires</i>	<i>19</i>
2. OBJECTIF DE L'ÉTUDE	21
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES	22
a. Sélection	22
b. L'analyse de l'ADN fœtal dans le sang maternel	23
c. Statistiques	24
4. Résultats	26
a. Population	26
b. Tests non rendus	29
c. Performances du test pour le dépistage des trisomies 13, 18 et 21	30
<i>i. La trisomie 21</i>	<i>31</i>
<i>ii. Les trisomies 18 et 13</i>	<i>31</i>
d. Cas des grossesses issues d'aide médicale à la procréation	32
5. DISCUSSION	33
a. Le dépistage actuellement proposé en cas de grossesse gémellaire est-il satisfaisant ?	33
b. L'ADNlc en cas de grossesse gémellaire : que dit la littérature ?	33
c. ADNlc : quelle technique choisir ?	35
d. Quand faire le test ?	36
e. L'ADNlc en cas de grossesse gémellaire issue d'AMP	37
6. CONCLUSION	39

7. BIBLIOGRAPHIE.....	40
8. ANNEXES	50
a. Annexe I : Cell-free fetal DNA analysis in maternal plasma as a screening test for trisomy 21, 18 and 13 in twin pregnancies (61).	50
b. Annexe II : Formulaire de recueil des issues de grossesses envoyé aux prescripteurs	73
c. Annexe III : Ancien formulaire et attestation d'information de la patiente sur l'ADNc21 par le laboratoire CERBA et recueil du consentement	78
d. Annexe IV : Nouveau formulaire et attestation d'information de la patiente sur l'ADNc21 par le laboratoire CERBA et recueil du consentement	80
e. Annexe V : Feuille de demande d'examen de l'ADNc21 par le laboratoire CERBA.....	82
f. Annexe VI : Information sur les conditions de recueil et d'envoi des échantillons par le laboratoire CERBA.....	83

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aCGH : array comparative genomic hybridization
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNlc : test ADN libre circulant
ADNlc21 : test ADN libre circulant de la trisomie 21
AFP : Alpha-foeto protéine
AMP : Aide médicale à la procréation
BC : bichoriale
BCBA : bichoriale biamniotique
 β hCG : hormone Chorionique Gonadotrope humaine
CNGOF : Collège National des Gynécologue et Obstétriciens Français
DS : Déviation Standard
E3 : œstradiol
FCS : Fausse couche spontanée
FIV : Fécondation *in vitro*
FN : Faux négatif
FP : Faux positif
IC : Intervalle de Confiance
ICSI : FIV par injection intracytoplasmique de spermatozoïde
IMC : Indice de Masse Corporelle
MC : monochoriale
MCBA : monochoriale biamniotique
MCMA : monochoriale monoamniotique
MPSS : Massively Parallel Shotgun Sequencing
NGS : Next Generation Sequencing
PAPP-A : Pregnancy Associated Plasma Protein A
qPCR : Réaction en Chaîne par Polymérase quantitative
RCIU : Retard de croissance in-utero
SA : Semaines d'Aménorrhée
SEHDA : SEquençage à Haut Débit et Aneuploïdie
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
TMPS : Targeted Massively Parallel Sequencing
VPN : Valeur Prédictive Négative
VPP : Valeur Prédictive Positive

1. INTRODUCTION

a. Le Dépistage de la trisomie 21 par ADN libre circulant dans le sang maternel

i. Historique du dépistage de la trisomie 21

Depuis le début des années 80 s'est développée l'idée de dépister la trisomie 21 in utero. Initialement, la seule stratégie de « dépistage » proposée reposait sur l'analyse du caryotype fœtal après amniocentèse pour toutes les femmes âgées de plus de 38 ans au moment de la conception, considérées alors comme « à risque ». Cette stratégie était peu performante, car deux tiers des enfants porteurs de trisomie 21 naissent de femmes de moins de 35 ans. Par ailleurs, l'amniocentèse à titre systématique expose les patientes à un risque de fausse couche spontanée (FCS) sur des grossesses dont les fœtus ne sont pas atteints de trisomie 21.

Depuis 1990, d'autres stratégies de dépistage de la trisomie 21 ont été développées, reposant sur le dosage des marqueurs sériques biochimiques dans le sérum maternel et sur la mesure de la clarté nucale par échographie au premier trimestre de la grossesse.

Le dépistage de la trisomie 21 par le dosage des marqueurs biochimiques dans le sang maternel au 2^{ème} trimestre de la grossesse (entre 14 SA et 17 semaines d'aménorrhée (SA) + 6 jours) est le premier à avoir été mis en place. En 1984, Merkatz *et al.* met en évidence que le taux sérique d'alpha-foeto protéine (AFP) était plus bas au 2^{ème} trimestre chez les femmes dont le fœtus était atteint de trisomie 21 ⁽¹⁾. En 1987, Bogart *et al.* montre que les concentrations sériques d'hormone Chorionique Gonadotrope humaine (hCG) sont plus élevées que la normale dans les grossesses affectées par une trisomie

21 foétale ⁽²⁾. Macri *et al.* montrera par la suite que le dosage de la fraction libre de l'hCG permet un taux de détection bien supérieur à celui obtenu par dosage de l'hCG totale (β hCG + fraction libre) ⁽³⁾. Enfin, en 1988, Canick *et al.* propose un 3^{ème} marqueur de risque : l'œstradiol libre (E3) dont les concentrations sont plus basses en cas de trisomie 21 ⁽⁴⁾.

Afin d'améliorer les valeurs prédictives positives et négatives du dépistage, les marqueurs sériques du 2^{ème} trimestre ont ensuite été associés à l'âge maternel permettant d'identifier 60% à 75% des fœtus porteurs d'une trisomie 21 avec un taux de faux positifs de 5% ^(5,6).

Avec l'avènement de l'échographie obstétricale s'est ensuite développé la mesure de la clarté nucale, qui doit être réalisée entre 11 SA et 13 SA et 6 jours, c'est-à-dire pour une longueur cranio-caudale foétale comprise entre 45 et 84 mm. Cette technique permet de dépister 70 à 80% des fœtus porteurs de trisomie 21 pour un taux de faux positifs de 5% ⁽⁷⁻¹⁰⁾. Sa mesure échographique est très précise et doit répondre à des critères de qualité définis par le score de Herman.

Par la suite, la mesure de la clarté nucale au 1^{er} trimestre a été combinée au dosage des marqueurs sériques maternels du 2^{ème} trimestre afin d'améliorer la performance du dépistage : on parle alors de dépistage séquentiel intégré du 2^{ème} trimestre ⁽¹¹⁻¹⁴⁾.

Néanmoins, le caractère tardif du dépistage et les calculs de risques successifs complexes ont encouragé la mise en place d'un dépistage combiné de la trisomie 21 au 1^{er} trimestre. Deux marqueurs ont montré leur efficacité dans cette indication :

- la β hCG libre, dont le taux augmente en cas de fœtus atteint ;
- la PAPP-A, dont le taux diminue en cas de trisomie 21 foétale ⁽¹⁵⁻¹⁸⁾.

Le dépistage combiné du premier trimestre est adopté en France par l'arrêté du 23 juin 2009, et proposé à toutes les femmes enceintes, entre 11 SA et 13 SA + 6 jours. Il associe l'âge maternel, la mesure de la clarté nucale et le dosage des marqueurs sériques maternels (fraction libre de la β hCG et PAPP-A) avec un taux de détection d'environ 86% des fœtus porteurs d'une trisomie 21 pour un taux de faux positif de 5%.

Actuellement, à l'issue du dépistage, les patientes sont placées soit dans un groupe à risque faible ($< 1/250$) soit dans un groupe dit à risque accru ($\geq 1/250$) d'avoir un fœtus porteur d'une trisomie 21. On parle de risque intermédiaire quand il est compris entre $1/250$ et $1/1000$. Un prélèvement invasif (biopsie de trophoblaste entre 11 SA et 14 SA ou amniocentèse après 15 SA) est alors proposé en cas de risque accru afin de confirmer ou d'infirmer le diagnostic par l'analyse du caryotype fœtal. On estime le risque de perte fœtale à l'issue d'un prélèvement invasif de l'ordre de 0,5 à 1%.

ii. Principes du test par analyse de l'ADN fœtal libre circulant pour le dépistage de la trisomie 21 (ADNIcT21)

La présence d'ADN fœtal libre circulant dans le sang maternel au cours de la grossesse a été mise en évidence par Lo *et al.* en 1997 ⁽¹⁹⁾. Ainsi, 5 à 10% de l'ADN circulant dans le sang maternel est d'origine fœtale et plus particulièrement d'origine placentaire ⁽²⁰⁾. En effet, il a été démontré un lien entre le taux de β hCG sérique maternel (produit par les cellules trophoblastiques) et la quantité d'ADN fœtal circulant ⁽²¹⁾. Ce dernier augmente donc tout au long de la grossesse et serait éliminé moins de 48h après l'accouchement rendant l'analyse possible en cas de grossesse antérieure ⁽²²⁾.

De nombreuses études se sont intéressées à l'analyse des caractéristiques génétiques fœtales par simple prélèvement sanguin maternel. Dans un premier temps, l'analyse de l'ADN fœtal libre circulant a été appliquée au diagnostic de sexe fœtal pour les maladies liées à l'X⁽²³⁾, à la détermination du rhésus D fœtal dans la prévention de l'allo-immunisation fœto-maternelle⁽²⁴⁾ ou encore à la recherche de maladie dominante survenue de novo comme l'achondroplasie.

Par la suite, les études se sont élargies à la recherche d'anomalies chromosomiques chez le fœtus. Pour cela, différents tests analysant l'ADN fœtal libre circulant (ADNlc) dans le sang maternel ont été mis au point.

La technique de quantification de l'ADN fœtal libre circulant pour le dépistage de la trisomie 21 (ADNlcT21) qui semble donner à ce jour les meilleurs résultats est le séquençage génomique dit à « haut débit » ou *Next generation sequencing* (NGS). La très bonne performance de l'ADNlc a été récemment confirmée par deux méta-analyses^(25,26) montrant, pour la trisomie 21, une sensibilité de plus de 99 % et d'environ 97 % pour les trisomies 13 et 18.

Deux approches sont actuellement proposées :

- une approche globale sur l'intégralité du génome : on parle de séquençage massif parallèle (Massively Parallel Shotgun Sequencing ou MPSS) ;
- une approche ciblée (Targeted Massively Parallel Sequencing ou TMPS) sur les séquences spécifiques du chromosome d'intérêt (13, 18 et 21) grâce à des séquences type SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Une revue de la Cochrane, parue en novembre 2017, conclue à une performance équivalente des deux approches⁽²⁷⁾. Elle précise également que ce test a été évalué en tant que test de dépistage et qu'en cas de résultat positif, un

test invasif (à savoir l'établissement du caryotype fœtal par une biopsie de trophoblaste ou une amniocentèse) est nécessaire pour confirmer le diagnostic.

Techniquement, le NGS comporte une étape initiale d'extraction et de séquençage de l'ADN libre circulant (sans *a priori*, c'est-à-dire sans en distinguer l'origine maternelle ou fœtale) ; puis les séquences obtenues font l'objet d'une succession d'analyses bio-informatiques (Figure 1) :

- alignement : chaque séquence est rapportée à une position du génome humain sur un chromosome qui lui est spécifique ;
- calcul de la représentation de chacun des chromosomes (proportion) par rapport à l'ensemble du génome (ou de certains chromosomes de référence) ;
- analyse statistique de ces proportions, généralement figurée par un calcul de Z-score (écart à la moyenne).

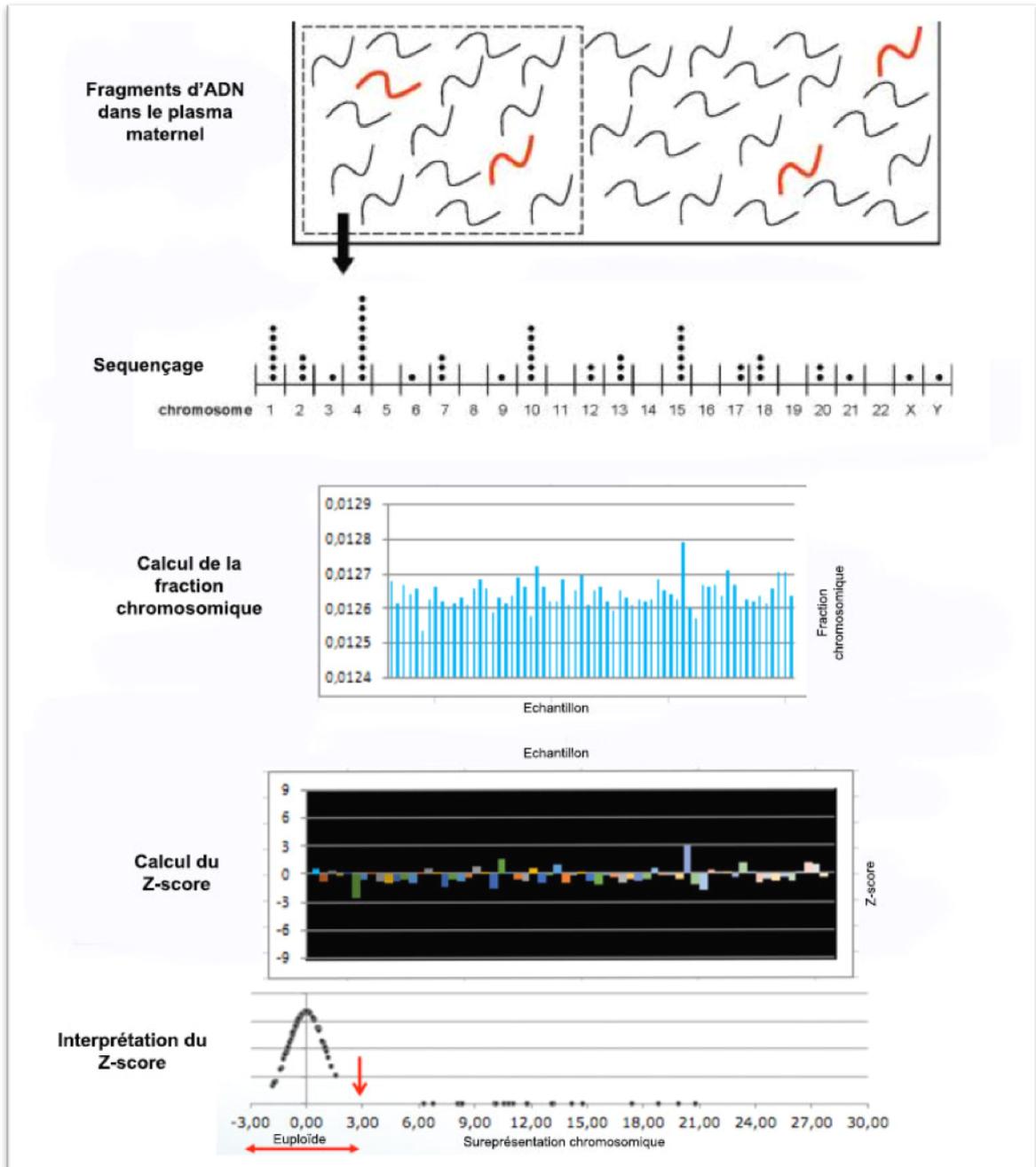


Figure 1 : Séquençage massif parallèle et l'établissement du Z-score

Ce Z-score est établi pour tout ou une partie de chaque chromosome. Lorsqu'il dépasse une valeur pré-établie, on considère que la variation est significative, c'est-à-dire qu'il y a sur-représentation (ou sous-représentation), ce qui permet d'affirmer l'aneuploïdie. Pour le chromosome 21, la valeur seuil du Z-score est 3.

$$\%ch = \frac{\text{Nombre de séquences du ch}}{\text{Nombre de séquences au total}}$$

$$Z - score(ch21) = \frac{\% ch21(\text{échantillon}) - \text{Moyenne } \% ch21(\text{référence})}{\text{Déviation standard du } \% ch21(\text{référence})}$$

- *Z-score (ch 21)* : nombre de déviations standards d'un échantillon par rapport à la moyenne d'un groupe d'échantillons normaux pour le chromosome 21
- *% ch21 (échantillon)* : pourcentage de séquence pour le chromosome 21 pour un échantillon donné
- *Moyenne %ch 21(référence)* : moyenne de pourcentage de séquence pour le chromosome 21 d'un groupe d'échantillons normaux
- *Déviati on standard du % ch 21 (référence)* : déviation standard du pourcentage de séquence pour le chromosome 21 d'un groupe d'échantillons normaux

Le NGS va permettre de quantifier les séquences d'ADN foetal circulant de chaque chromosome. Ainsi, la quantité de transcrits du chromosome 21 sera plus élevée si la patiente présente un fœtus atteint, le fœtus trisomique présentant par définition trois chromosomes 21 au lieu de deux.

De nombreuses études ont montré, dans des populations de patientes à risque élevé d'aneuploïdie (dépistage combiné du premier ou deuxième trimestre en zone à risque, âge maternel « avancé », anomalies échographiques évocatrices d'aneuploïdies ou antécédent de trisomie 21) pour la trisomie 21, des taux de détection supérieurs à 99%, avec un faible taux de faux positifs (moins de 0,5%) (28–33).

Néanmoins, de nombreux facteurs peuvent impacter l'interprétation du test, au 1^{er} rang desquels la fraction d'ADN libre d'origine placentaire circulant dans le sang maternel. En effet, plus ce taux est bas, plus la mise en évidence d'un déséquilibre de ratio est difficile. Le risque de faux négatif est donc augmenté lorsque la fraction foetale est faible (34). Les principaux facteurs

influençant négativement la fraction fœtale sont le terme précoce lors de la réalisation du test ainsi qu'une surcharge pondérale chez la patiente ⁽³⁵⁾. Le calcul de la fraction fœtale doit être intégré à la validation du résultat. Le seuil minimal de 4 % pour une grossesse unique a été retenu.

Ce test est disponible, en France, depuis novembre 2013. Le Collège national des gynécologues et obstétriciens français (CNGOF) recommandait en 2012 la réalisation de ce test uniquement pour des patientes à risque élevé, notamment en cas de risque supérieur à 1/250 lors du dépistage combiné du premier ou deuxième trimestre. En juin 2016, le CNGOF émet un communiqué, en accord avec l'ACLF (Association des Cytogénéticiens de Langue Française) qui vient préciser les indications du test par ADNICT21. Ces recommandations introduisent la notion de risque « intermédiaire » entre 1/250 et 1/1000. Le test est alors recommandé si :

- la patiente est considérée comme à risque ($\geq 1/1000$) après le dépistage par les marqueurs sériques, quelque soit la stratégie utilisée (1^{er} ou 2^e trimestre) ;
- la patiente a ≥ 38 ans et n'a pas bénéficié du dépistage par les marqueurs sériques ;
- l'un des parents est porteur d'une translocation robertsonnienne impliquant un chromosome 21 ;
- les marqueurs sériques ne sont pas fiables (grossesse gémellaire, marqueurs sériques hors bornes) ;
- la patiente présente un antécédent de grossesse avec trisomie 21.

En revanche, le test est contre-indiqué en cas d'anomalie échographique (y compris une hyperclarté nucale $> 3,5$ mm), en raison du risque d'environ 8 % que

le fœtus soit porteur d'une anomalie chromosomique déséquilibrée d'importance médicale autre que les T21, 18 ou 13 en cas de test négatif⁽²⁸⁾. En cas d'anomalie échographique, il est recommandé de pratiquer un prélèvement invasif en vue de réaliser un caryotype conventionnel associé ou non à un caryotype moléculaire (aCGH [*array comparative genomic hybridization*]).

En pratique, l'ADNlcT21 est proposé après l'échographie du 1^{er} trimestre bien que l'ADN circulant fœtal soit détecté dès 10 SA. En effet, le dépistage ne sera réalisé qu'en cas d'échographie fœtale du premier trimestre normale.

L'étude SEHDA réalisée sur 900 patientes a permis la validation de la technique sur le territoire français sur une population de patiente à haut risque d'aneuploïdie⁽²⁸⁾.

L'ADNlcT21 n'est, pour l'instant, pas pris en charge par l'Assurance Maladie, mais les recommandations publiées par l'HAS en avril 2017 ouvre la voie à une prise en charge prochaine dans certaines indications.

L'étape suivante a été l'évaluation de l'ADNlcT21 en population générale Bianchi *et al.* a comparé l'ADNlcT21 au dépistage standard par marqueurs sériques (1^{er} et 2^e trimestre) chez 1914 patientes. Le taux de faux positifs pour la trisomie 21 est significativement plus bas après ADNlcT21 (0,3% vs 3,6% $p < 0,01$). La valeur prédictive positive du test est supérieure à celle du dépistage par les marqueurs sériques : 45,5% (95% IC [16,7-76,6]) vs 4,2% (95% IC [0,9-11,7])⁽³⁶⁾. Au final, il a été observé une diminution de 89% des prélèvements invasifs et donc du risque de perte fœtale qui en découle. Ces résultats corroborent ceux des études de Fairbrother⁽³⁷⁾ et Gil⁽³³⁾, publiées en 2013. En France, l'étude DEPOSA a montré d'excellentes performances du test en

population générale sur des singletons, aussi bien en cas de grossesse spontanée qu'après AMP ⁽³⁹⁾.

b. Les grossesses gémellaires

i. Généralités

Avec l'avènement de l'aide médicale à la procréation (AMP), l'incidence des grossesses gémellaires a fortement augmenté depuis une quarantaine d'années ⁽⁴⁰⁾. Toutefois, ces grossesses sont considérées comme à haut risque avec une morbi-mortalité augmentée par rapport aux singletons notamment en terme de prématurité. Les risques obstétricaux sont plus élevés pendant la grossesse et lors de l'accouchement.

ii. Définition

On distingue les grossesses gémellaires dizygotes des grossesses monozygotes si les deux fœtus ont ou non le même patrimoine génétique. Dans les grossesses dizygotes, chaque fœtus résulte de la fécondation d'un ovocyte et d'un spermatozoïde différent, et a donc un patrimoine génétique différent. Les grossesses monozygotes sont issues de la division d'un unique embryon. Si la division de l'embryon se fait précocement dans les 3 jours après la fécondation, les grossesses monozygotes seront bichoriales-biamniotiques (BCBA) (2 placentas et 2 poches des eaux). Elles seront monochoriales-biamniotiques (MCBA) après 4 jours suivant la fécondation (1 placenta et 2 poches des eaux), voir monochoriales-monoamniotiques (MCMA) au-delà de 8 jours (1 placenta et 1 poche des eaux). Les grossesses dizygotes sont toujours BCBA. Une

échographie précoce au 1^{er} trimestre permet de déterminer la chorionicité et l'amnionicité.

iii. Épidémiologie

La prévalence des naissances gémellaires a fortement augmenté depuis 40 ans en France : elle n'était que de 8,9/1000 naissances en 1972, et a atteint 15/1000 naissances en 2000 et 18/1000 naissances en 2016 ⁽⁴¹⁾ (Figure 2)

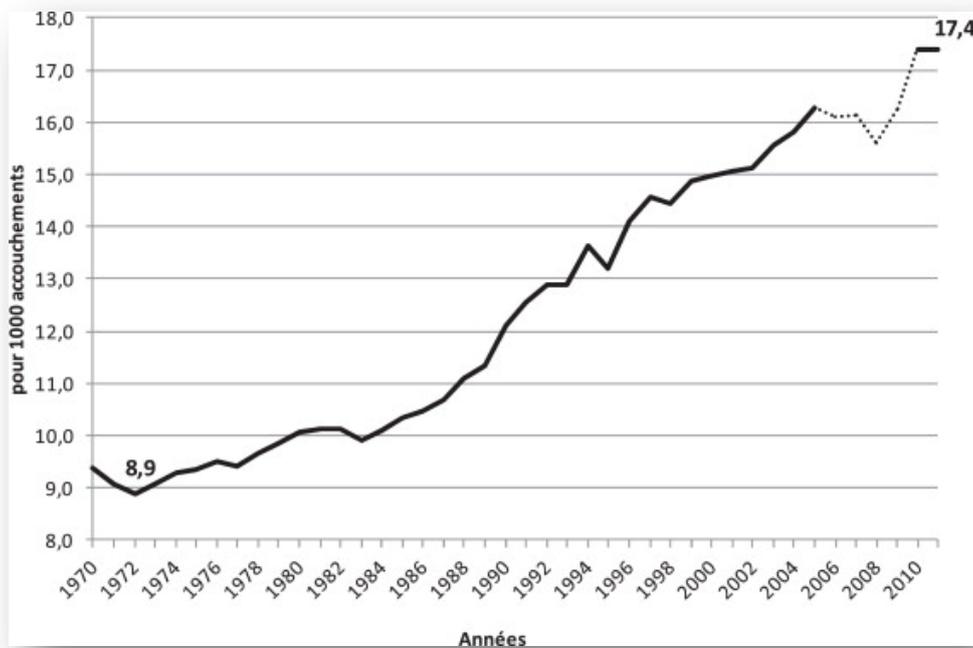


Figure 2 : Évolution du taux d'accouchements gémellaires en France de 1970 à 2011. ⁽⁴⁰⁾

Deux principaux facteurs expliquent cette augmentation :

- le recul de l'âge maternel avec un âge moyen des femmes enceintes en France qui est passé de 26,5 ans en 1977 à 30,3 ans en 2014 ;

- l'avènement de l'AMP. D'après le rapport de l'Agence de la Biomédecine, en 2015, 13,8% des accouchements dont la grossesse était issue d'AMP étaient des grossesses gémeillaires.

Cette augmentation est majoritairement liée aux grossesses dizygotes, la prévalence des grossesses monozygotes étant stable autour de 1 à 3 pour 1000 naissances.

Les grossesses dizygotes représentent 2/3 des grossesses gémeillaires. Parmi les monozygotes, environ 1/3 sont BCBA et 2/3 sont MCBA. Les MCMA sont exceptionnelles, représentant 1 à 2 % des grossesses monozygotes et moins de 1 % des gémeillaires. Au total, 20 % des grossesses gémeillaires sont monochoriales (MC) et 80 % sont bichoriales (BC).

c. Le dépistage de la trisomie 21 chez les grossesses gémeillaires

i. Le dépistage combiné

Le dépistage de la trisomie 21 en cas de grossesse gémeillaire repose actuellement, en France, sur la mesure de la clarté nucale à l'échographie du premier trimestre et l'âge maternel. Bien que le dépistage incluant les marqueurs du deuxième trimestre soit également proposé, celui-ci expose les patientes à une forte augmentation du taux de faux positif et ne devrait pas être réalisé dans cette indication. Le dépistage par les marqueurs sériques au premier trimestre n'est pas recommandé en France alors qu'il est utilisé dans d'autres pays. Ces approches ont une sensibilité allant de 40% pour la clarté nucale et l'âge maternel seuls, à 86% pour le test combiné, avec un taux de faux positif entre 4 et 10%⁽⁴²⁻⁴⁴⁾, en particulier en cas de grossesse issue d'AMP^(45,46). Ce taux élevé de faux positif a pour conséquence une augmentation du taux de gestes invasifs.

Or, il a été montré que le taux de FCS suite à un geste invasif est plus élevé chez les grossesses gémellaires que chez les grossesses singletons ^(47,48).

ii. L'ADNIcT21 chez les grossesses gémellaires

Actuellement, les recommandations sur l'utilisation de l'ADNIcT21 en cas de grossesses multiples restent floues et les données de la littérature sont insuffisantes ⁽⁴⁹⁻⁵²⁾. En effet, 7 études prospectives ont déjà évalué l'intérêt de l'ADNIc dans les grossesses gémellaires (Tableau 1) ⁽⁵³⁻⁵⁹⁾, montrant des valeurs très élevées en termes de spécificité et de valeur prédictive positive. Cependant, la plupart de ces études montrent par ailleurs un taux de résultats non rendus allant de 0,9 à 14,8%, ce qui pourrait limiter l'intérêt de ce test en pratique clinique.

Bien que certaines techniques d'ADNIcT21 permettent de conclure sur le nombre de fœtus atteints d'aneuploïdie en cas de grossesse bichoriale ⁽⁶⁰⁾, une confirmation diagnostique par un prélèvement invasif de chaque jumeau est toujours recommandé en cas de résultat positif.

Du fait des bonnes performances du test réalisé sur le territoire français en population à haut risque comme en population générale, il a été décidé de proposer l'analyse de l'ADNIcT21 comme test de dépistage de la trisomie 21 aux patientes présentant une grossesse gémellaire (spontanée ou issue d'une AMP) sans anomalie échographique du premier trimestre.

Auteur, Date	n=	Laboratoire/ Test	BC/MC	Risque	Mode de conception Spontané/AMP	IMC	Age maternel (années)	Age gestationnel (semaines)	Taux de non rendus (%)	Fraction fœtale (%)	Sensibilité pour la trisomie 21	Faux positifs (N=)	Perdus de vue (%)
Gil ⁽⁴⁷⁾ , 2014*	68	Ariosa/MPS	52/16	Bas	22/46	NC	37.2	10.6	13.2	7.4¶	100%	0	NC
Grömminger ⁽⁴⁹⁾ , 2014	38	Lifecodexx/MPS	15/5 NC pour 18	Bas	23/15	NC	NC	14.2	13.1	14.8	100%	0	0
Huang ⁽⁴⁸⁾ , 2014	189	BGI/MPS	152/33 NC pour 4	Elevé	70/113 NC pour 6	NC	31	19	NC	NC	100%	NC	0.9
Bevilacqua ⁽⁵⁰⁾ , 2015	515	Ariosa/MPS	301/67	Bas	243/272	NC	36.8	13.6	5.6	8.7¶	91.6%	0	31.8
Sarno ⁽⁵²⁾ , 2016	438	Ariosa/MPS	373/65	Bas	192/246	23.5	37.3	11.7	7.4	8.0¶	100%	1	NC
Tan ⁽⁵¹⁾ , 2016	565	BGI/MPS	544/18	Bas/Elevé	0/565	NC	31	12	0.9	8.9	100%	0	3.1
Fosler ⁽⁵⁹⁾ , 2016	487	Illumina/MPS	544/18	Elevé	NC	NC	35.5	16.6	0.9	16.1	100%	1	35.7
Le Conte ⁽⁶¹⁾ , 2017 (Étude présentée)	492	CERBA/MPS	387/101 NC pour 4	Bas/Elevé	301/184 NC pour 7	22.9	37	16.3	0.4	13.4	100%	1	12

BC/MC: bichoriale, monochoriale; AMP: aide médicale à la procréation; NC: non communiqué; IMC: indice de masse corporelle.

* Cas inclus dans Sarno *et al.*

§ 129 cas étaient inclus dans Sarno *et al.*

¶ Médiane de la fraction fœtale la plus basse

Tableau 1: Études prospectives sur l'utilisation du ADNlc comme dépistage de la trisomie 21 chez les grossesses gémellaires

2. OBJECTIF DE L'ÉTUDE

L'objectif de cette étude était d'évaluer la performance de l'ADNlc en cas de grossesse gémellaire en comparant les résultats du test à ceux du caryotype fœtal (en cas de prélèvement invasif réalisé) ou aux issues de grossesses. Tous les enfants ont bénéficié d'un examen pédiatrique à la naissance.

Nous reportons ici, dans une évaluation des pratiques cliniques, les résultats des performances de l'ADNlc en cas de grossesse gémellaire en tant que dépistage de la trisomie 21 (ANDT21) et secondairement, en tant que dépistage des trisomies 18 et 13.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'ADNIc a été proposé en pratique clinique comme dépistage des trisomies 13, 18 et 21 aux patientes ayant une grossesse gémellaire et le résultat a été pris en compte dans le suivi de grossesse des patientes. Un consentement utilisé en routine pour les tests prénataux de dépistage a été signé par chaque patiente incluse. Le laboratoire Cerba est autorisé par l'Agence Régionale de Santé à réaliser ces tests de dépistage.

a. Sélection

Afin d'évaluer les performances de notre test, 492 patientes porteuses d'une grossesse gémellaire sans anomalie échographie au premier trimestre et sans hyper clarté nucale $> 3,5$ mm ont été incluses entre le 1^{er} novembre 2013 et le 1^{er} août 2015. Les données étaient collectées de façons prospectives et analysées rétrospectivement. Toutes les patientes ont bénéficié d'une échographie du premier trimestre avec mesure de la clarté nucale. Le dépistage combiné du premier trimestre étant peu recommandé en France pour les grossesses gémellaires, les patientes ont bénéficié de l'ADNIc en première intention (n=377) ou en deuxième intention après le dépistage combiné. En cas de dépistage combiné, 106 patientes avaient un risque élevé $\geq 1/250$ et 9 un risque intermédiaire entre $1/251$ et $1/1000$. Toutes les patientes étaient à plus de 10 SA lors du test.

b. L'analyse de l'ADN fœtal dans le sang maternel

Le test a été réalisé par séquençage massif à haut débit avec une approche non ciblée *whole genome* comme déjà décrit⁽²⁸⁾. Le sang maternel était prélevé dans 2 tubes cfDNA BCT Streck® (10mL chacun) et envoyé à +4°C au laboratoire. Le plasma était préparé par double centrifugation dans les 4 jours qui ont suivi le prélèvement et stocké à -70°C jusqu'à la réalisation de l'analyse. L'ADN total était extrait à partir de 4mL de plasma au moyen du kit QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid (Qiagen, Courtaboeuf, France) après décongélation et centrifugation des échantillons. L'ADN extrait était recueilli dans 55µL de tampon d'élution. Les bibliothèques d'ADN ont ensuite été préparées en microplaque de 96 puits de manière semi-automatique, sans sélection de taille, à partir de 50µL de la solution d'extraction d'ADN à l'aide, soit des réactifs TruSeq DNA Sample Prep (Illumina, Paris, France), soit du kit NEBNext Ultra DNA Library Prep (NEB, Evry, France).

Après quantification sur une plateforme microfluidique LabChip GX (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France), les bibliothèques de 12 échantillons différents ont été poolées et séquencées sur chaque ligne d'une *flow-cell* Illumina V3 sur un séquenceur HiSeq1500 avec les réactifs Truseq SBS V3-HS (Illumina, Paris, France) pour 27 cycles suivis de 7 à 8 cycles pour la lecture de l'index de propriété de chaque échantillon. Finalement, les données de séquençage étaient comparées à la version UCSC hg19 du génome humain au moyen du test Bowtie version 2, puis les Z-scores étaient calculés pour les chromosomes cibles 13, 18 et 21 comme précédemment décrit. La classification reposait sur une valeur seuil

standard transformée du Z-score de 3 pour le chromosome 21 et de 3,95 pour les chromosomes 18 et 13⁽⁶²⁾.

De plus, la fraction fœtale était évaluée en utilisant le sequence read approach (SeqFF) décrit par Kim *et al.*⁽⁶³⁾. La méthode « fœtus non spécifique » est un modèle de régression multivariée basée sur une différence considérée négligeable entre les deux fractions fœtales et sur la supposée non-uniformité de la fraction d'ADN fœtal circulant sur l'ensemble du génome. Cette méthode ne détermine pas la contribution individuelle de chaque fœtus mais la somme des deux.

Les résultats étaient rendus comme « positif » ou « négatif » quand les critères quantitatifs étaient remplis (nombres de copies totales ≥ 9 millions et taux de fraction fœtale $\geq 8\%$) ou « non rendu » dans le cas contraire. Le taux de fraction fœtale est un critère très important, car il peut influencer la performance du test au niveau de la méthode de comptage. Une valeur seuil théorique de 8% a été utilisée, en partant du principe que le taux circulant d'ADN fœtal dans le sang maternel était le même pour chaque fœtus, et se basant sur le taux seuil de 4% déjà validé pour les grossesses singletons.

c. Statistiques

Les données descriptives étaient reportées en pourcentage pour les variables catégorielles d'une part, en médiane et en intervalle interquartile pour les données quantitatives d'autre part. La performance du test était caractérisée par la sensibilité et la spécificité. L'intervalle de confiance était de 95% avec une

distribution binomiale. Les pourcentages ont été comparés par un test de Chi-2 ou de Fisher et les moyennes par un test de t de Student.

Une analyse univariée était utilisée pour évaluer l'effet du taux de tests non rendus lors du premier prélèvement sur les variables qualitatives telles que la chorionicité (monochoriale, bichoriale), les issus de grossesses, avec trisomie 13, 18 ou 21 (oui/non), la méthode de conception (spontanée/AMP) et sur les variables quantitatives comme l'âge maternel, le poids et l'âge gestationnel au moment du test. Une analyse de régression logistique a été faite secondairement afin de déterminer lesquelles des variables prises en compte dans l'analyse univariée étaient statistiquement indépendantes avec $p < 0,1$.

4. Résultats

a. Population

Entre décembre 2013 et septembre 2015, 492 patientes avec grossesse gémellaire ont été incluses. Les caractéristiques démographiques des patientes sont décrites dans le tableau 2. La chorionicité était déterminée pour toutes les patientes (sauf pour 4) sur l'échographie du premier trimestre avec 387 grossesses BCBA (78,7%) et 101 grossesses monochoriales (20,5%) (dont 97 MCBA (19,7%) et 4 MCMA (0,8%)). Les grossesses étaient spontanées pour 301 patientes (61,2%) et issues d'AMP pour 184 (37,4%), par fécondation *in vitro* (FIV) (n=109), FIV avec injection intra cytoplasmique de spermatozoïde (FIV-ICSI) (n=38) ou don d'ovocyte (n=37). Les données n'étaient pas disponibles pour 7 patientes (1,4%). Les grossesses obtenues par insémination intra-utérine ont été exclues de l'étude.

L'âge maternel médian était de 37 ans et la médiane du poids maternel était de 62 kilogrammes. 64% des patientes avaient plus de 35 ans (n=315). L'indice de masse corporel (IMC) était ≥ 30 pour 9,6% des patientes (n=47). L'âge gestationnel médian au moment de l'ADNIc était de 16,3 SA [10,2-35,5].

La fraction fœtale médiane était de 13,3% [4,6-30,2].

Age maternel (années)	37 (19-49)
Poids (kg)	63 (43-110)
Age gestationnel (semaines)	16.3 (10.2-35.5)
Méthode de conception	
Aide médicale à la procréation (AMP)	158 (37.6)
Grossesses spontanées	258 (61.1)
Type d'AMP (n=158)	
FIV	95 (60.1)
FIV-ICSI	36 (22.8)
Dons d'ovocytes	27 (17.1)
Chorionicité	
Bichoriale-biamniotique (BC)	331 (78.8)
Monochoriale (MC)	86 (20.5)
Monochoriale-biamniotique	82 (19.5)
Monochoriale-monoamniotique	4 (1)
NC	3 (0.7)

Tableau 2 : Caractéristiques démographiques des patientes (médiane (intervalle inter-quartile))

Cinquante-neuf patientes ont été perdues de vue (12%) et aucun caryotype n'a pu être récupéré pour 13 grossesses (2,6%). L'ADNIc a été réalisé chez 420 patientes pour lesquelles les données cliniques néonatales et/ou les caryotypes fœtaux ont pu être récupérées. (Figure 3)

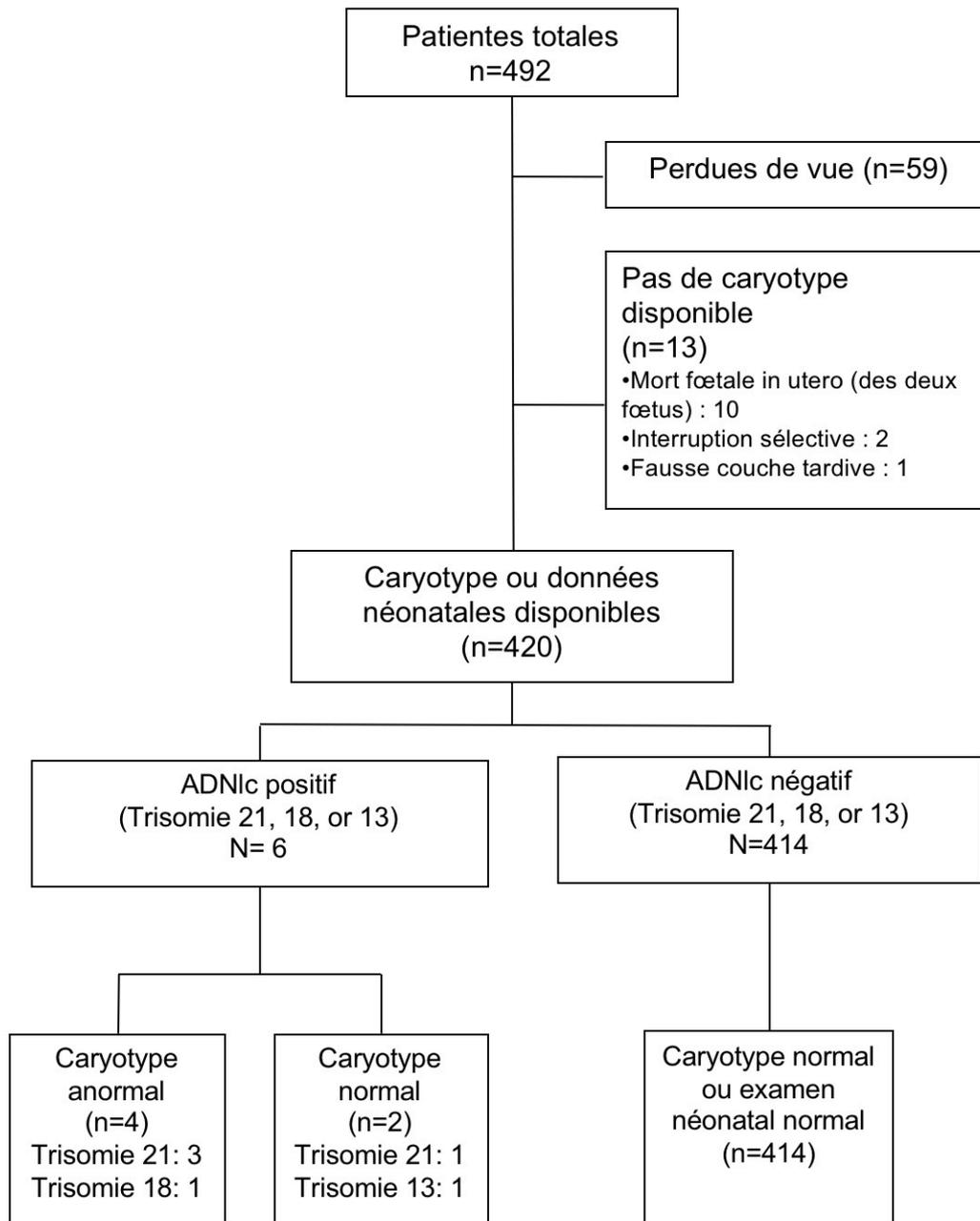


Figure 3 : Flow Chart

b. Tests non rendus

L'ADNlc n'a pas pu être rendu au premier test pour 12 (2,9%) des 420 grossesses gémellaires en raison d'un taux de fraction foetale insuffisant (n=11, 2,2%) ou d'un Z-score atypique (n=1).

Il y avait 9 grossesses BCBA et 3 MCMA. L'âge gestationnel médian lors du test était de 15,1 SA [12,1-21,5] et l'IMC médian était de 32,4 [19,5-37,5]. La grossesse ayant un résultat de l'ADNlc atypique s'est compliquée d'une fausse-couche tardive à 19+6 SA et aucune information ni caryotype n'ont pu être récupérés. Sur les 12 patientes, 10 ont eu un deuxième test qui ont tous été rendu, l'un d'entre eux étant positif pour la trisomie 13.

L'analyse par régression logistique univariée montre que les facteurs prédictifs significatifs d'échec du test étaient les grossesses compliquées de trisomies 21, 18 ou 13 et un poids maternel élevé. L'analyse multivariée retrouve uniquement le poids maternel élevé comme facteur prédictif significativement indépendant pour l'échec du test (Tableau 3).

Au final, le taux de non rendus, dans cette étude, après deuxième test, était de 0,48% (2/420). Sur les deux patientes n'ayant pas eu de test rendu, l'une a accouché prématurément à 20 SA de deux fœtus non atteints, l'autre a accouché à 31 SA de deux nouveau-nés prématurés également non atteints.

Variable	n (%) ou médiane (intervalle inter-quartile)	Echec de l'ADNlc			
		Analyse univariée		Analyse multivariée	
		OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Age maternel (années)	37 (19-49)	0.987 (0.887-1.100)	0.844		
Age gestationnel (semaines)	16.3 (10.2-35.5)	0.898 (0.751-1.074)	0.513		
Poids (kg)	63 (43-110)	1.084 (1.041-1.129)	<0.001	1.082 (1.039-1.127)	<0.001
Chorionicité*					
MC	86 (20.5)	1.283 (0.342-4,884)	0.705		
BC	331 (78.8)	1			
AMP§					
Oui	158 (37.6)	1.373 (0.412-4.574)	0.606		
Non	258 (61.1)	1			
Trisomie 21/18 ou 13					
Oui	6 (1.4)	7.327 (0.789-68.078)	0.080	6.570 (0.485-89.088)	0.157
Non	414 (98.6)	1		1	

Calculs faits sur 420 cas avec des issues connues

* Données manquantes dans 3 cas

§ Données manquantes dans 4 cas

Tableau 3 : Régression logistique sur les facteurs prédictifs d'échec de l'ADNlc dans le dépistage prénatal des grossesses gémellaires

c. Performances du test pour le dépistage des trisomies 13, 18 et 21

L'ADNlc était positif pour la trisomie 21 chez 4 cas, pour la trisomie 18 chez un cas, pour la trisomie 13 chez un, et négatif pour tous les autres. Sur l'ensemble des patientes ayant eu un ADNlc négatif, aucun fœtus ou nouveau-né n'était atteint de trisomie 21, 18 ou 13. Une amniocentèse a été réalisée chez

10 patientes en raison d'une anomalie fœtale à l'échographie du deuxième ou troisième trimestre (n=2), de marqueurs du second trimestre pathologiques malgré un ADNlc négatif (n=3), en raison d'une anxiété maternelle ou pour confirmer un ADNlc positif (n=5).

i. La trisomie 21

Sur les résultats positifs pour la trisomie 21, un était un faux positif. Pour cette patiente, le test a été fait à 14,2 SA ; la fraction fœtale était de 14,4% avec un Z-score de 3,2. L'IMC était de 28,1 et la grossesse était une MCBA. L'amniocentèse réalisée pour chaque fœtus retrouvait deux caryotypes normaux. La patiente a accouché à terme de deux nouveau-nés en bonne santé. L'analyse du placenta n'a pas pu être réalisée. Pour les 3 autres cas (grossesses BCBA), le diagnostic de trisomie 21 a été confirmé par un prélèvement invasif et les patientes ont subi une interruption médicale de grossesse. Au total, la sensibilité était de 100% (95% [29,2%-100%]) et la spécificité était de 99,8% (95% IC [98,7%-100%]).

ii. Les trisomies 18 et 13

Pour les trisomies 18 et 13, la sensibilité et la spécificité n'ont pu être calculées en raison d'un nombre de cas trop faible. Un cas de trisomie 18 a été diagnostiqué à 15 SA chez une grossesse BCBA sans signe échographie et une interruption sélective a été réalisée. Une patiente (grossesse BCBA) avait un ADNlc positif pour la trisomie 13 sans anomalie échographique. La patiente a refusé les prélèvements invasifs et a accouché à 34+5 SA de deux nouveaux nés bien portants dont l'un présentait un retard de croissance in-utero (RCIU) : 2910g

et 1784g. Les caryotypes des deux enfants étaient normaux mais l'analyse placentaire du fœtus présentant un RCIU était positive pour la trisomie 13 au dosage quantitatif par qPCR.

d. Cas des grossesses issues d'aide médicale à la procréation

Entre les grossesses spontanées et celles issues d'AMP, il y avait des différences significatives sur l'âge maternel, l'âge gestationnel au moment du test, mais aucune différence ni sur le poids maternel, ni sur le taux de tests non rendus entre les deux groupes (Tableau 4). Les inséminations intra-utérines, qui n'induisent pas de manipulation des embryons, avaient été exclues. De même, aucune différence n'a été constatée entre les patientes ayant réalisé l'ADNIc en première intention (n=318) et celles ayant réalisé le dépistage par les marqueurs sériques en premier lieu et considérées comme à haut risque de trisomie 21 (n=94) (8 patientes étant dans un groupe à faible risque selon les marqueurs ont accepté le ADNIc).

Variables	Grossesses spontanées (n=256)	Grossesses issues d'AMP (n=154)	p
Age maternel (années)	36,3 (19-47)	38,9 (28-49)	<0,001
Age gestationnel (semaines)	16,8 (10.2-35.5)	15,3 (11.6-30.1)	0,008
Poids (kg)	63 (43-105)	63 (44-110)	NS*
Fraction fœtale (%)	13,6 (5.8-25.7)	12,9 (4.6-30.2)	<0,001
Non rendus après premier test	6 (2,3)	6 (3,8)	NS*

*NS: non significatif

Tableau 4 : Comparaison entre les grossesses spontanées et issues d'AMP (médiane (intervalle inter-quartile) ou n (%))

5. DISCUSSION

a. Le dépistage actuellement proposé en cas de grossesse gémellaire est-il satisfaisant ?

En 2018, plusieurs options pour le dépistage de la trisomie 21 peuvent être proposées aux patientes porteuses d'une grossesse gémellaire : la mesure de la clarté nucale combinée à l'âge maternel, en incluant ou non les marqueurs sériques du premier ou du deuxième trimestre, ou enfin l'ADNcT21.

Le dépistage par les marqueurs sériques du second trimestre dans les grossesses gémellaires a largement été évalué. Ses performances sont relativement médiocres, puisque pour un seuil de risque à 1/250 le taux de détection des fœtus aneuploïdes est de 63% avec un taux de faux positifs de 10,8%⁽⁴³⁾. Le dépistage combiné au 1^{er} trimestre associant la mesure de la clarté nucale de chaque fœtus, l'âge maternel et le dosage de la PAPP-A et de la β hCG améliore le taux de détection de la trisomie 21 chez les grossesses bichoriales de 78 à 90%, avec un taux de faux positif un peu moins élevé, entre 5,9% et 8%. Il apparaît donc que le dépistage de la trisomie 21 en cas de grossesse gémellaire reste moins performant que pour les singletons, avec une augmentation du taux de prélèvement invasif et donc du risque de FCS.

b. L'ADNc en cas de grossesse gémellaire : que dit la littérature ?

Dans le Committee Opinion #640 de septembre 2015, l'American College of Obstetricians and Gynecologists et la Society for Maternal-Fetal Medicine ont statué sur le fait que l'utilisation de l'ADNc n'était pas recommandée pour les

grossesses gémellaires en raison d'un nombre insuffisant d'études ⁽⁴⁹⁾. Au moment de ces recommandations, seules deux études étaient disponibles ^(54,64), et concluaient que bien que l'utilisation de l'ADNlc pouvait être pertinente en cas de grossesse gémellaire, de plus larges études prospectives étaient nécessaires afin d'en déterminer les performances dans cette population. Le Committee Opinion #640 concluait également que pour tout dépistage prénatal et test diagnostique, les bénéfices, les risques et les méthodes alternatives devaient être discutés avec chaque patiente.

Actuellement, sept études prospectives ont déjà évalué l'utilisation de l'ADNlc chez les grossesses gémellaires. Leurs caractéristiques et résultats sont résumés dans le Tableau 1. Les populations étudiées étaient aussi bien des patientes à haut ou bas risque de trisomie 21 foétale du fait de l'âge maternel, d'antécédents d'aneuploïdie ou de marqueurs sériques à risque. Il convient de souligner que pour 5 études sur 7, l'âge maternel médian était de près de 37 ans, âge qui est considéré comme à haut risque pour beaucoup de pays. Globalement, bien que 5 tests différents aient été décrits (tous basés sur la technique de séquençage massif parallèle) les résultats sont excellents en terme de sensibilité (approchant ou atteignant les 100%), avec un nombre de faux positifs très bas, bien qu'aucune de ces études (y compris la nôtre) n'aient été conçues pour le calcul de la sensibilité.

La principale différence entre les études, au-delà du nombre de perdues de vue, était le taux de tests non rendus, qui variait entre 0,48% et 13,2%. Il y a plusieurs raisons à ces disparités.

Le 1^{er} point est celui de la façon dont le taux a été calculé, après un ou plusieurs prélèvements maternels. Ce point n'est pas clairement défini dans la

plupart des publications, alors que le recours à un second prélèvement peut avoir des implications cliniques importantes, en particulier dans les pays où le délai de réalisation d'une éventuelle interruption médicale de grossesse est contraint. Dans notre étude, le taux de non rendus était très bas : 2,8% (12/420) après un 1^{er} test, et 0,48% (2/420) après 2 tests.

Le 2^{ème} point est celui de la technique mise en œuvre pour le test. Bien qu'on ne puisse pas conclure à l'influence du type de technique moléculaire utilisée sur le taux de non rendu, le séquençage massif parallèle ciblé semble associé à un taux de tests non rendus plus élevé. Ainsi, Sarno *et al.* ⁽⁵⁸⁾ rapporte un taux d'échec de 9,4% après le premier test et de 4,8% après le second.

Les différences du taux de non rendu pourraient donc être dues, d'une part à la technique utilisée pour quantifier la fraction fœtale, qui varie entre les différentes études ; mais également à l'âge gestationnel au moment du test.

c. ADN_{ic} : quelle technique choisir ?

La technique de mesure de la fraction fœtale est encore débattue en cas de grossesse gémellaire. Certains laboratoires ne quantifient pas la fraction fœtale, mais amplifient la quantité d'ADN fœtal par séquençage massif pour compenser et pour minimiser le risque de faux négatif. Jensen *et al.* ont montré que cette méthode rendait les résultats peu fiables ⁽⁶²⁾. Pour minimiser le taux de faux négatifs, d'autres utilisent un algorithme prenant en compte le taux de fraction fœtale le plus bas des deux fœtus associé à une mesure qualitative de cette fraction fœtale.

Il existe, en effet, un risque d'échec supplémentaire dû à la grande variabilité du comptage de l'ADN fœtal en cas de grossesse gémellaire. Il a été montré que

la fraction fœtale totale pouvait être 35% plus élevée dans les grossesses gémellaires comparé aux singletons. Cependant, le taux de fraction fœtale par fœtus est plus bas dans certaines études ^(56,58), ou plus haut dans d'autres ⁽⁵⁹⁾ par rapport aux singletons à un âge gestationnel comparable au moment du test.

En outre, il a été montré que la fraction fœtale pouvait varier du simple au double entre les 2 fœtus d'une grossesse gémellaire ^(60,65).

La technique utilisée dans notre étude est globale et inclus les deux fœtus sans différencier la fraction fœtale de chacun d'entre eux. Le taux de 8% a été choisi comme seuil pour l'interprétation des résultats en considérant que si le taux de fraction fœtale est le même pour chaque fœtus, il assure des résultats fiables. Toutefois, l'hypothèse selon laquelle la quantité d'ADN produite dans le sang maternel est égale pour chaque fœtus n'est pas confirmée. La méthode de mesure de la fraction fœtale est encore débattue, souvent d'un point de vue « commercial », et ne devrait pas être considérée de façon isolée mais en association avec les autres paramètres de la technique. En effet, comme l'a démontré Fan *et al.* ⁽⁶⁶⁾, la fraction fœtale est liée à l'intensité du séquençage. Ainsi, le seuil de 4% pour la fraction fœtale peut être utilisé pour assurer la détection d'une surreprésentation du chromosome 21 avec au moins 7 millions de copies pour un singleton.

d. Quand faire le test ?

L'autre différence entre les études est l'âge gestationnel médian au moment du test. Dans notre étude, comme dans celle de Fosler *et al.* ⁽⁵⁹⁾, l'âge gestationnel médian était de 16 SA, c'est-à-dire au 2^{ème} trimestre, ce qui est similaire à l'étude SEHDA chez le singleton ⁽²⁸⁾. Nous supposons que ce

dépistage réalisé relativement tardivement serait lié à un manque d'information des professionnels de santé sur l'utilisation de l'ADNIc au premier trimestre en cas de grossesse gémellaire.

D'autres études sont nécessaires afin de vérifier qu'un test réalisé plus précocement n'induit pas une augmentation du taux de non rendu. Les récentes études incluant à la fois la quantification de fraction fœtale et le séquençage de masse dans un seul algorithme dynamique devraient permettre d'éviter cet écueil.

e. L'ADNIc en cas de grossesse gémellaire issue d'AMP

L'ADNIc présente un réel intérêt pour les grossesses issues d'AMP. En effet, certaines études indiquent un taux de PAAP-A plus bas et un taux de β hCG plus élevé notamment en cas de don d'ovocyte ^(46,67). Ceci a pour conséquence une augmentation du taux de faux positifs du test par les marqueurs sériques dans cette population, indépendamment de l'âge maternel plus élevé.

D'après Lee et al., en cas de grossesse singleton, le taux de fraction fœtale serait plus bas en cas de grossesse obtenue par FIV (10,3% [7,7-13,5]) par rapport aux grossesses spontanées (11,9% [9,1-15]) ($p=0,005$) ⁽⁶⁸⁾. Cette étude rétrospective conclue que le mode de conception par FIV est un facteur indépendant d'échec du test alors que la valeur prédictive positive était de 100% pour l'ADNIcT21. Récemment, l'étude française prospective multicentrique DEPOSA apporte des résultats plus rassurants. En effet, d'après Costa *et al.*, le taux de fraction fœtale, bien que statistiquement différent, reste très proche que la grossesse soit issue d'AMP (10,2% \pm 2,7) ou spontanée (10,9% \pm 3,14), et bien supérieure au seuil de 4% retenu pour une grossesse singleton. De plus,

cette étude, qui compare les performances de l'ANDIc au dépistage standard combiné, souligne que, alors que les performances du test de dépistage combiné sont moins bonnes en cas de grossesse issue d'une AMP que pour les grossesses spontanées, les résultats de l'ADNIc sont excellents quelque soit le mode de conception (avec une VPP de 100% et aucun faux positif) En outre, le taux de gestes invasifs passe de 8,4% en absence d'ADNIc à 1,9% si ce dernier est réalisé ⁽³⁹⁾.

En France, en 2015, 13,8% des grossesses issues d'AMP sont des grossesses gémellaires. Bevilacqua *et al.* et Sarno *et al.* ont montré que le mode de conception par FIV était un facteur indépendant d'échec du test en cas de grossesse gémellaire ^(56,58).

Tan *et al.* ⁽⁵⁷⁾ sur une population de 565 grossesses gémellaires issues d'AMP retrouve en revanche un taux de non rendu plus bas que dans les études précédentes (0,9%) avec une VPP à 100%. Néanmoins, cette étude ne comportait pas de groupe contrôle de grossesses gémellaires conçues spontanément.

Nous n'avons trouvé aucune différence sur les performances du test entre les grossesses spontanées et issues d'AMP dans notre étude. Cela s'explique en particulier par des taux de fraction fœtale comparables dans les deux groupes. Le poids maternel apparaît comme le seul facteur de risque indépendant de diminution de la fraction fœtale et d'augmentation du taux non rendu dans notre étude, ce qui est clairement décrit dans la littérature.

6. CONCLUSION

La force de cette étude est le fait qu'elle évalue l'utilisation du dépistage par l'ADNlc en pratique clinique et rapporte un faible taux de non rendu.

Le test de dépistage des aneuploïdies par utilisation de l'ADNlc est utilisable en cas de grossesse gémellaire, avec des performances similaires à celles retrouvées chez le singleton, en population à haut risque comme en population générale ⁽²⁸⁾. Cependant, 12% des patientes ont été perdues de vue, mais ce chiffre reste acceptable dans le cadre d'une étude d'évaluation des pratiques cliniques.

Ces données mettent en évidence la nécessité d'informer, de façon claire et compréhensible, les patientes ayant une grossesse gémellaire, sur le dépistage des aneuploïdies afin de leur permettre un choix éclairé.

Une étude médico-économique sur l'accès à l'échographie, aux prélèvements invasifs et aux consultations spécialisées devrait permettre d'évaluer la place de l'ADNlc dans la prise en charge des patientes présentant une grossesse gémellaire. Bien que l'ADNlc comporte des limites, notamment sur l'évaluation du risque individuel de chaque fœtus, il reste la meilleure option en terme de VPP si la fraction fœtale est connue. Le dépistage de la trisomie 21 par ADNlc peut être recommandé pour les grossesses gémellaires sans anomalie échographique en première intention en début du second trimestre de grossesse et probablement au 1^{er} trimestre. Aucune conclusion ne peut être émise pour les trisomies 13 et 18, hormis une spécificité élevée, car le nombre de cas est trop faible.

7. BIBLIOGRAPHIE

1. Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, Johnson WE. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol.* 1 avr 1984;148(7):886-94.
2. Bogart MH, Pandian MR, Jones OW. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn.* nov 1987;7(9):623-30.
3. Macri JN, Spencer K, Aitken D, Garver K, Buchanan PD, Muller F, et al. First-trimester free beta (hCG) screening for Down syndrome. *Prenat Diagn.* juill 1993;13(7):557-62.
4. Canick JA, Knight GJ, Palomaki GE, Haddow JE, Cuckle HS, Wald NJ. Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome. *Br J Obstet Gynaecol.* avr 1988;95(4):330-3.
5. Spencer K, Coombes EJ, Mallard AS, Ward AM. Free beta human choriongonadotropin in Down's syndrome screening: a multicentre study of its role compared with other biochemical markers. *Ann Clin Biochem.* sept 1992;29 (Pt 5):506-18.
6. Macri JN, Spencer K, Garver K, Buchanan PD, Say B, Carpenter NJ, et al. Maternal serum free beta hCG screening: results of studies including 480 cases of Down syndrome. *Prenat Diagn.* févr 1994;14(2):97-103.
7. Cuckle H. Integrating antenatal Down's syndrome screening. *Curr Opin Obstet Gynecol.* avr 2001;13(2):175-81.
8. Nicolaides KH, Brizot ML, Snijders RJ. Fetal nuchal translucency:

ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy. Br J Obstet Gynaecol. sept 1994;101(9):782-6.

9. Pandya PP, Snijders RJ, Johnson SP, De Lourdes Brizot M, Nicolaides KH. Screening for fetal trisomies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10 to 14 weeks of gestation. Br J Obstet Gynaecol. déc 1995;102(12):957-62.

10. Snijders RJ, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides KH. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. Fetal Medicine Foundation First Trimester Screening Group. Lancet Lond Engl. 1 août 1998;352(9125):343-6.

11. Kadir RA, Economides DL. The effect of nuchal translucency measurement on second-trimester biochemical screening for Down's syndrome. Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol. avr 1997;9(4):244-7.

12. Thilaganathan B, Slack A, Wathen NC. Effect of first-trimester nuchal translucency on second-trimester maternal serum biochemical screening for Down's syndrome. Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol. oct 1997;10(4):261-4.

13. Audibert F, Dommergues M, Benattar C, Taieb J, Thalabard JC, Frydman R. Screening for Down syndrome using first-trimester ultrasound and second-trimester maternal serum markers in a low-risk population: a prospective longitudinal study. Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol. juill 2001;18(1):26-31.

14. Rozenberg P, Malagrida L, Cuckle H, Durand-Zaleski I, Nisand I, Audibert

F, et al. Down's syndrome screening with nuchal translucency at 12(+0)-14(+0) weeks and maternal serum markers at 14(+1)-17(+0) weeks: a prospective study. *Hum Reprod Oxf Engl.* avr 2002;17(4):1093-8.

15. Spencer K, Macri JN, Aitken DA, Connor JM. Free beta-hCG as first-trimester marker for fetal trisomy. *Lancet Lond Engl.* 13 juin 1992;339(8807):1480.

16. Wald NJ, Kennard A, Hackshaw AK. First trimester serum screening for Down's syndrome. *Prenat Diagn.* déc 1995;15(13):1227-40.

17. Hurley PA, Ward RH, Teisner B, Iles RK, Lucas M, Grudzinskas JG. Serum PAPP-A measurements in first-trimester screening for Down syndrome. *Prenat Diagn.* oct 1993;13(10):903-8.

18. Brambati B, Macintosh MC, Teisner B, Maguiness S, Shrimanker K, Lanzani A, et al. Low maternal serum levels of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in the first trimester in association with abnormal fetal karyotype. *Br J Obstet Gynaecol.* avr 1993;100(4):324-6.

19. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet Lond Engl.* 16 août 1997;350(9076):485-7.

20. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* avr 1998;62(4):768-75.

21. Ohashi Y, Miharu N, Honda H, Samura O, Ohama K. Correlation of fetal DNA and human chorionic gonadotropin concentrations in second-trimester maternal serum. *Clin Chem.* févr 2002;48(2):386-8.

22. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid

clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* janv 1999;64(1):218-24.

23. Costa J-M, Benachi A, Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *N Engl J Med.* 9 mai 2002;346(19):1502.

24. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med.* 10 déc 1998;339(24):1734-8.

25. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* sept 2017;50(3):302-14.

26. Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J, Agbebiyi A, Uthman OA, Madan J, et al. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 18 janv 2016;6(1):e010002.

27. Badeau M, Lindsay C, Blais J, Nshimyumukiza L, Takwoingi Y, Langlois S, et al. Genomics-based non-invasive prenatal testing for detection of fetal chromosomal aneuploidy in pregnant women. *Cochrane Database Syst Rev.* 10 2017;11:CD011767.

28. Benachi A, Letourneau A, Kleinfinger P, Senat M-V, Gautier E, Favre R, et al. Cell-free DNA analysis in maternal plasma in cases of fetal abnormalities detected on ultrasound examination. *Obstet Gynecol.* juin 2015;125(6):1330-7.

29. Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y, Lau VYM, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S*

A. 23 déc 2008;105(51):20458-63.

30. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol.* mai 2012;119(5):890-901.

31. Dan S, Wang W, Ren J, Li Y, Hu H, Xu Z, et al. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11,105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenat Diagn.* déc 2012;32(13):1225-32.

32. Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol.* mars 2011;204(3):205.e1-11.

33. Porreco RP, Garite TJ, Maurel K, Marusiak B, Obstetrix Collaborative Research Network, Ehrich M, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA. *Am J Obstet Gynecol.* oct 2014;211(4):365.e1-12.

34. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* nov 2011;13(11):913-20.

35. Poon LCY, Musci T, Song K, Syngelaki A, Nicolaides KH. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes. *Fetal Diagn Ther.* 2013;33(4):215-23.

36. Bianchi DW, Rava RP, Sehnert AJ. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med*. 7 août 2014;371(6):578.
37. Fairbrother G, Johnson S, Musci TJ, Song K. Clinical experience of noninvasive prenatal testing with cell-free DNA for fetal trisomies 21, 18, and 13, in a general screening population. *Prenat Diagn*. juin 2013;33(6):580-3.
38. Gil MM, Quezada MS, Bregant B, Ferraro M, Nicolaides KH. Implementation of maternal blood cell-free DNA testing in early screening for aneuploidies. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. juill 2013;42(1):34-40.
39. Costa J-M, Letourneau A, Favre R, Bidat L, Belaisch-Allart J, Jouannic J-M, et al. Cell-free fetal DNA versus maternal serum screening for trisomy 21 in pregnant women with and without assisted reproduction technology: a prospective interventional study. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 1 mars 2018;
40. Prunet C, Goffinet F, Blondel B. Prise en charge et santé périnatale en cas de grossesse gémellaire : situation en 2010 et évolution récente en France. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod*. févr 2015;44(2):184-93.
41. Enquête nationale périnatale 2016. Les naissances et les établissements, situation et évolution depuis 2010 - Ministère des Solidarités et de la Santé [Internet]. [cité 15 avr 2018]. Disponible sur: <http://drees.solidarites-sante.gouv.fr/etudes-et-statistiques/publications/recueils-ouvrages-et-rapports/rapports/article/enquete-nationale-perinatale-2016-les-naissances-et-les-etablissements>
42. Prats P, Rodríguez I, Comas C, Puerto B. Systematic review of screening for trisomy 21 in twin pregnancies in first trimester combining nuchal translucency

and biochemical markers: a meta-analysis. *Prenat Diagn.* nov 2014;34(11):1077-83.

43. Garchet-Beaudron A, Dreux S, Leporrier N, Oury J-F, Muller F, ABA Study Group, et al. Second-trimester Down syndrome maternal serum marker screening: a prospective study of 11 040 twin pregnancies. *Prenat Diagn.* déc 2008;28(12):1105-9.

44. Madsen HN, Ball S, Wright D, Tørring N, Petersen OB, Nicolaidis KH, et al. A reassessment of biochemical marker distributions in trisomy 21-affected and unaffected twin pregnancies in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* janv 2011;37(1):38-47.

45. Giorgetti C, Vanden Meerschaut F, De Roo C, Saunier O, Quarello E, Hairion D, et al. Multivariate analysis identifies the estradiol level at ovulation triggering as an independent predictor of the first trimester pregnancy-associated plasma protein-A level in IVF/ICSI pregnancies. *Hum Reprod Oxf Engl.* oct 2013;28(10):2636-42.

46. Bellver J, Casanova C, Garrido N, Lara C, Remohí J, Pellicer A, et al. Additive effect of factors related to assisted conception on the reduction of maternal serum pregnancy-associated plasma protein A concentrations and the increased false-positive rates in first-trimester Down syndrome screening. *Fertil Steril.* nov 2013;100(5):1314-20.

47. Vink J, Fuchs K, D'Alton ME. Amniocentesis in twin pregnancies: a systematic review of the literature. *Prenat Diagn.* mai 2012;32(5):409-16.

48. Agarwal K, Alfirevic Z. Pregnancy loss after chorionic villus sampling and genetic amniocentesis in twin pregnancies: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* août

2012;40(2):128-34.

49. Committee Opinion Summary No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy. *Obstet Gynecol.* sept 2015;126(3):691-2.

50. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) Publications Committee. Electronic address: esteele@smfm.org. SMFM Statement: clarification of recommendations regarding cell-free DNA aneuploidy screening. *Am J Obstet Gynecol.* déc 2015;213(6):753-4.

51. Gil MM, Revello R, Poon LC, Akolekar R, Nicolaides KH. Clinical implementation of routine screening for fetal trisomies in the UK NHS: cell-free DNA test contingent on results from first-trimester combined test. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* janv 2016;47(1):45-52.

52. Oepkes D, Page-Christiaens GCL, Bax CJ, Bekker MN, Bilardo CM, Boon EMJ, et al. Trial by Dutch laboratories for evaluation of non-invasive prenatal testing. Part I-clinical impact. *Prenat Diagn.* déc 2016;36(12):1083-90.

53. del Mar Gil M, Quezada MS, Bregant B, Syngelaki A, Nicolaides KH. Cell-free DNA analysis for trisomy risk assessment in first-trimester twin pregnancies. *Fetal Diagn Ther.* 2014;35(3):204-11.

54. Huang X, Zheng J, Chen M, Zhao Y, Zhang C, Liu L, et al. Noninvasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies: Sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test in twin pregnancies. *Prenat Diagn.* avr 2014;34(4):335-40.

55. Grömminger S, Yagmur E, Erkan S, Nagy S, Schöck U, Bonnet J, et al. Fetal Aneuploidy Detection by Cell-Free DNA Sequencing for Multiple Pregnancies and Quality Issues with Vanishing Twins. *J Clin Med.* 25 juin

2014;3(3):679-92.

56. Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaides KH, Ordoñez E, Cirigliano V, Dierickx H, et al. Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* janv 2015;45(1):61-6.

57. Tan Y, Gao Y, Lin G, Fu M, Li X, Yin X, et al. Noninvasive prenatal testing (NIPT) in twin pregnancies with treatment of assisted reproductive techniques (ART) in a single center. *Prenat Diagn.* juill 2016;36(7):672-9.

58. Sarno L, Revello R, Hanson E, Akolekar R, Nicolaides KH. Prospective screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood in first trimester twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* 11 mars 2016;

59. Fosler L, Winters P, Jones KW, Curnow KJ, Sehnert AJ, Bhatt S, et al. Aneuploidy Screening Using Noninvasive Prenatal Testing in Twin Pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* 19 mai 2016;

60. Leung TY, Qu JZZ, Liao GJW, Jiang P, Cheng YKY, Chan KCA, et al. Noninvasive twin zygosity assessment and aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing: Noninvasive twin zygosity and aneuploidy detection. *Prenat Diagn.* juill 2013;33(7):675-81.

61. Le Conte G, Letourneau A, Jani J, Kleinfinger P, Lohmann L, Costa J-M, et al. Cell-free fetal DNA analysis in maternal plasma as a screening test for trisomy 21, 18 and 13 in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* 18 août 2017;

62. Jensen TJ, Zwiefelhofer T, Tim RC, Džakula Ž, Kim SK, Mazloom AR, et

al. High-throughput massively parallel sequencing for fetal aneuploidy detection from maternal plasma. *PLoS One*. 2013;8(3):e57381.

63. Kim SK, Hannum G, Geis J, Tynan J, Hogg G, Zhao C, et al. Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenat Diagn*. août 2015;35(8):810-5.

64. Canick JA, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Ehrich M, van den Boom D, et al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. *Prenat Diagn*. août 2012;32(8):730-4.

65. Qu JZZ, Leung TY, Jiang P, Liao GJW, Cheng YKY, Sun H, et al. Noninvasive Prenatal Determination of Twin Zygosity by Maternal Plasma DNA Analysis. *Clin Chem*. 2 janv 2013;59(2):427-35.

66. Fan HC, Quake SR. Sensitivity of Noninvasive Prenatal Detection of Fetal Aneuploidy from Maternal Plasma Using Shotgun Sequencing Is Limited Only by Counting Statistics. Bridger JM, éditeur. *PLoS ONE*. 3 mai 2010;5(5):e10439.

67. Amor DJ, Xu JX, Halliday JL, Francis I, Healy DL, Breheny S, et al. Pregnancies conceived using assisted reproductive technologies (ART) have low levels of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) leading to a high rate of false-positive results in first trimester screening for Down syndrome. *Hum Reprod Oxf Engl*. juin 2009;24(6):1330-8.

68. Lee TJ, Rolnik DL, Menezes MA, McLennan AC, da Silva Costa F. Cell-free fetal DNA testing in singleton IVF conceptions. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1 avr 2018;33(4):572-8.

8. ANNEXES

a. Annexe I : Cell-free fetal DNA analysis in maternal plasma as a screening test for trisomy 21, 18 and 13 in twin pregnancies (61).

Cell-free fetal DNA analysis in maternal plasma as a screening test for
trisomy 21, 18 and 13 in twin pregnancies

Short Title: Noninvasive prenatal testing in twin pregnancies

Grégoire Le Conte MD^{1,2}, Alexandra Letourneau MD^{1,2}, Jacques Jani MD,PhD³,
Pascale Kleinfinger MD⁴, Laurence Lohmann MD⁴, Jean-Marc Costa PharmD⁴,
Alexandra Benachi MD,PhD^{1,2}

¹Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Hôpital
Antoine Béchère, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Clamart, France,

²Université Paris Sud, Kremlin Bicêtre, France, ³Department of Obstetrics and
Gynecology, University Hospital Brugmann, Université Libre de Bruxelles,
Brussels, Belgium, ⁴Laboratoire CERBA. Saint-Ouen l'Aumône, France.

Corresponding author

Alexandra Benachi, MD, PhD

Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction

Hôpital Antoine Béchère

157 rue de la Porte de Trivaux

92140 Clamart, France

Tel: +33 1 45374476

Fax: + 33 1 45374967

Email: alexandra.benachi@aphp.fr

Key words: Noninvasive prenatal testing, cell-free DNA, twin pregnancy

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/uog.18838

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

Abstract

Objectives. To evaluate the utility of noninvasive prenatal testing using cell-free circulating fetal DNA (cfDNA) in screening for the three main autosomal fetal trisomies in twin pregnancies.

Methods. CfDNA testing was offered to 492 patients with twin pregnancies without ultrasound anomalies as a first-line screening test or after serum screening in clinical practice. Data were collected prospectively and a retrospective analysis was performed. CfDNA analysis was performed by massively parallel sequencing. The fetal fraction threshold for test evaluation was 8%. Regression analysis was performed to investigate the effect on the test failure rate of various variables. Performance of the test is also reported.

Results. The test was performed first line (after first-trimester scan) in 377 patients and following serum screening in 115. 78.8% of pregnancies were dichorionic-diamniotic. The test failed at the first attempt in 12 (2.9%) of 420 pregnancies with available outcomes, and regression analysis demonstrated that only maternal weight was a significant independent predictor of test failure. After redraw, a result was achieved in 10 cases. CfDNA identified all 3 cases of trisomy 21, and the only case of trisomy 18. For trisomy 21, the specificity was 99.8% (95% CI [98.7% - 100.0%]). When considering the spontaneous or ART origin of pregnancies, there were no significant differences in terms of maternal weight or of no-result rate for cfDNA screening in the two groups.

Conclusions. In twin pregnancies without fetal ultrasound abnormalities, cfDNA had a high success rate and performance. Therefore, in routine practice, cfDNA could be considered as a first- or second-line screening test.

Introduction

Increased use of fertility treatment and advanced maternal age are responsible for the increased prevalence of twin pregnancies, which is around 3% in the US. Screening for trisomy 21 in twins relies on nuchal translucency measurement on first-trimester scans and maternal age, though some patients are offered first- and second-trimester screening. These approaches have sensitivities of 40% for nuchal fold and maternal age alone and 86% for combined screening, the false-positive rate being high (4 to 10%)¹⁻³, especially in the case of pregnancies after assisted reproductive technology^{4,5}. This false-positive rate thus generates unnecessary invasive procedures with a theoretically higher rate of induced miscarriage than for singletons^{6,7}.

First evaluated in a so-called high-risk population, cell-free fetal DNA (cfDNA) testing could be used as a primary screening option after first-trimester scan. Its use has spread, although recommendations may vary from one country to another, while remaining unclear for multiple pregnancies because of lack of sufficient data⁸⁻¹¹. Indeed, only 8 prospective studies have been reported to date on the use of cfDNA in twin pregnancies (Table 1)¹²⁻¹⁹, but they show high specificity and positive predictive values for trisomy 21 screening. The main drawback in most studies is the high percentage of "no-results", which ranges from 0.9 to 13.2%, which could limit the use of some assays in clinical practice. In a recent meta-analysis, Gil et al. conclude that trisomy 21 screening in twin pregnancies is encouraging, but that the number of cases reported is small²⁰. ISUOG has updated its consensus statement on the impact of cfDNA aneuploidy testing on screening policies and prenatal ultrasound practice:

"Accuracy of cfDNA testing in twin pregnancies should be investigated further"

²¹.

Although some cfDNA technologies can potentially provide information on how many fetuses are affected in the case of dichorionic pregnancies ²², invasive sampling of both twins is still recommended in the case of positive results. Notwithstanding this, in view of excellent results obtained by our group with cfDNA in singletons ²³, it was decided to offer cfDNA screening for trisomy 21, 18 and 13 to patients with twin pregnancies as first-line screening or after maternal serum screening when fetuses did not display any ultrasound abnormalities at the first-trimester scan. Here we report the performance of the cfDNA assay in detection of the three main autosomal fetal trisomies in twin pregnancies in a clinical setting.

Methods

CfDNA was offered, in regular clinical practice, as a screening test for trisomy 21, 18 and 13 to patients with twin pregnancies and the result was used for the management of the patients. Written informed consent was obtained from all patients as usually required by French regulations in prenatal testing. Cerba Laboratory is authorized by the Regional Health Agency to perform these screening tests.

In order to evaluate the performance of our assay, 492 twin pregnancies without any abnormal fetal ultrasound finding or nuchal translucency > 3.5 mm were recruited from November 1st 2013 to August 31st 2015. Data were collected prospectively and retrospectively analyzed. All women underwent first-trimester ultrasound with nuchal translucency measurements. As first-trimester serum screening for twins is not recommended in France, women had cfDNA screening immediately after the first-trimester ultrasound (N=377) or as a second line after second-trimester maternal serum screening. At least one of the fetuses had a calculated risk $\geq 1/250$ in 106 cases and a risk between 1/251 and 1/1000 in 9 cases. All patients were more than 10 weeks pregnant. The cfDNA assay was assessed by comparing the reported results with the fetal karyotype when an invasive procedure was performed or with clinical examination of the newborns by pediatricians at birth.

CfDNA analysis in maternal plasma

Analysis was performed by massively parallel sequencing by using a whole-genome approach as described elsewhere with slight modifications²⁴. Maternal blood was collected in two cfDNA BCT Streck® tubes (10 mL for each) and sent at +4°C to the clinical lab where plasma was isolated within 4 days after

This article is protected by copyright. All rights reserved.

collection by a double centrifugation procedure and stored frozen at $\leq -70^{\circ}\text{C}$ if not processed immediately. Total DNA was extracted from 4 mL of plasma with the QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and the DNA libraries were then prepared starting from 50 μL of extracted DNA solution by using the TruSeq DNA Sample Prep reagents (Illumina, Paris, France) or the NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit (NEB, Evry, France). After quantification on the LabChip GX microfluidic platform (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France), the libraries from 12 different samples were pooled and sequenced on each lane of an Illumina V3 flow-cell on a HiSeq1500 instrument with the Truseq SBS kit V3-HS reagent (Illumina, Paris, France) for 27 cycles followed by 7 or 8 cycles to read each sample index. Finally, sequence reads were mapped to the UCSC hg19 version of the human genome using Bowtie version 2, Z-scores were calculated for the targeted chromosomes 13, 18 and 21 as described and classification was based upon a standard normal transformed cutoff value of $z = 3$ for chromosome 21 and $z = 3.95$ for chromosomes 18 and 13²⁴. As part of the assay, the fetal fraction estimation was evaluated using the sequence read approach (SeqFF) described by Kim et al.²⁵ This "non-fetal-specific" method is based on a multivariate regression model and on subtle fragment length differences and the inferred non-uniformity of fetal cfDNA across the genome, so it does not determine the contributions of individual twin fetuses but the sum of both.

Results are expressed as "positive" or "negative" when the metric criteria (total count of reads should be ≥ 9 million and the estimated fetal DNA fraction $\geq 8\%$) are fulfilled and "no-result" if they are not. The latter metric is of particular importance as it might influence test performance based on counting methods.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

A theoretical value of 8% was used, whatever the chorionicity, assuming that each fetus contributes adequate amounts of fetal DNA to the maternal plasma, to ensure accurate results, compared with the 4% value previously validated for singleton pregnancies.

Statistics

Descriptive results are reported as percentages for categorical variables and as median and range for quantitative variables. The performance of the test was characterized by specificity and positive predictive values. Exact 95% confidence intervals were computed with the binomial distribution. Percentages were compared using the chi-squared test or the Fisher test, and the Mann-Whitney U test was used to compare medians.

Univariate analysis was used to investigate the effect on test failure rate at first sampling of chorionicity (monochorionic, dichorionic) and on pregnancy outcome, with trisomy 21/18 or 13 (yes, no) and method of conception (IVF, non-IVF) as categorical variables and maternal age (years), weight (in kg) and gestational age at test (in weeks) as continuous numerical variables. Multiple logistic regression analysis was subsequently performed to determine the significant independent contribution of those variables yielding a $P < 0.1$ in the univariate analysis.

Data were analyzed with the statistical software SPSS, version 24.0 (Chicago, Illinois, USA), and Excel version 9.0 (Microsoft, Redmond, Wash). A two-sided P-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

The demographic and pregnancy characteristics of the 492 patients are shown in Table 2. Chorionicity was determined for all patients (except for 4) on the first-trimester scan, with 387 (78.7%) pregnancies being dichorionic-diamniotic (DC) and 101 (20.5%) monochorionic (MC) (97 (19.7%) monochorionic-diamniotic (MCDA), 4 (0.8%) monochorionic-monoamniotic (MCMA)). Pregnancies were spontaneous for 301 patients (61.2%) and resulted from assisted reproductive technology (ART) for 184 (37.4%), by IVF (n=109), IVF-ICSI (n=38) or egg donation (n=37). No data were available for 7 patients (1.4%). Intrauterine inseminations were excluded from the analysis.

The median maternal age was 37 (19-49) years and the median maternal weight at sampling was 62 (43-110) kilograms. 64% of patients were more than 35 years old (n=315). A body mass index (BMI) ≥ 30 was recorded in 9.6% of patients (n=47). The median gestational age at sampling for cfDNA screening was 16.3 weeks (10.2-35.5). The median fetal fraction was 13.3% (4.6-30.2).

Fifty-nine patients were lost to follow-up (12%) and no karyotype could be obtained for 13 (2.6%) pregnancies. Finally, cfDNA screening could be assessed for 420 patients where neonatal clinical data and/or fetal karyotypes were available.

The cfDNA test did not provide results from the first sample obtained from the patients in 12 (2.9%) of the 420 twin pregnancies because of insufficient fetal fraction (n=11, 2.2%) or atypical Z-scores (n=1). (Figure 1). Univariable regression analysis demonstrated that significant predictors of failure of the test were pregnancy outcome with trisomy 21, 18 or 13 and higher maternal weight. Multivariable regression analysis demonstrated that only maternal weight was a

significant independent predictor of test failure (Table 3). There were 9 DCDA and 3 MCDA pregnancies. The median gestational age was 15.1 weeks (12.1-21.5) and median BMI was 32.4 (19.5-37.5). The patient with atypical results had a spontaneous miscarriage at 19⁺⁶ weeks and thus could not be further explored. Ten out of these 12 patients had a second sample and all yielded a successful result, one of them being trisomy 13. Finally, the no-result rate observed in the study after re-sampling was thus 0.48% (2/420). One of the two patients delivered an unaffected fetus prematurely at 20 weeks while the second delivered a clinically unaffected newborn prematurely at 31 weeks.

Overall, cfDNA screening was positive for trisomy 21 in 4 cases, for trisomy 18 in 1 case and for trisomy 13 in 1 case, and negative for all others. Among the positive results reported for trisomy 21, one was a false positive. Blood sampling was performed at 14.2 weeks; fetal fraction was 14.4% with a Z-score of 3.2. The BMI was 28.1 and the pregnancy was MCDA. Amniocentesis performed on both amniotic fluids revealed normal karyotypes for both fetuses. The mother delivered two healthy babies at term. The placental tissues could not be explored. For the 3 other patients (DCDA pregnancies), invasive procedures confirmed that one of the two fetuses was affected and was selectively terminated. Therefore, overall specificity was 99.8% (95% CI [98.7% - 100.0%]). The sensitivity was 100.0% (95% CI [29.2% - 100.0%]) although this does not mean much with 3 cases of trisomy 21 in the cohort.

For trisomy 18 and trisomy 13, sensitivity and specificity could not be calculated because of the low number of cases. One fetus with trisomy 18 was diagnosed at 15 weeks in a DCDA pregnancy without any ultrasound findings and then selectively terminated after the diagnosis was confirmed. One patient (DCDA

pregnancy) was positive for trisomy 13 with no ultrasound abnormality. Therefore, the patient declined invasive sampling and gave birth to two healthy children, though one displayed intrauterine growth retardation (IUGR): 2910g and 1784g at 34 weeks and five days. The karyotypes of both babies were normal, but a positive qPCR result for chromosome 13 was found by analysis of DNA extracted from the placenta of the IUGR fetus.

Among patients for whom a negative cfDNA assay was reported (n=412), no fetuses or newborns were affected by trisomy 13, 18 or 21.

Amniocentesis was performed in 10 cases because of a fetal anomaly on the follow-up scans (n=2), abnormal second-trimester maternal serum screening findings and the mother not being reassured by normal cfDNA test findings (n=3), or in order to confirm a positive noninvasive prenatal test (n=5).

When considering the spontaneous or ART origin of pregnancies, there were significant differences in terms of maternal age, gestational age at cfDNA testing and fetal fraction, however, there was no significant difference in maternal weight or no-result rate between the two groups (Table 4). No intrauterine insemination cases, which did not include egg manipulation, were included. Similarly, no difference was noted whether cfDNA was performed as primary screening (n=318) or as a second-line test for patients at high risk (n=94) after maternal biochemical screening (8 patients were at low risk after serum screening and agreed to cfDNA testing).

Discussion

Three options for trisomy 21 screening can be offered to women pregnant with twins, based on nuchal translucency measurement combined with maternal age, including or not biochemical markers at the first or second trimester, and lastly cfDNA screening.

Performances of second-trimester biochemical screening in twins are considered relatively poor¹. Introduction of biochemical markers in addition to nuchal translucency and maternal age during the first trimester in a combined screening approach has led to an improvement in the detection rate for trisomy 21 in dizygotic twins from 78 to 90%, while the false-positive rate has decreased from 8 to 5.9%. Nevertheless, screening for trisomy 21 in twins is theoretically responsible for an unnecessary increase in invasive procedures.

This is especially problematic in the context of ART, as 18.7% of women delivering twins had an ART procedure²⁶. A few studies have suggested that the PAPP-A level is lower in ART pregnancies and β -hCG is higher in egg donation^{5,27} and might therefore have a negative impact on biochemical screening, leading to a higher rate of high-risk patients.

Eight prospective studies to date have reported the use of cfDNA in twin pregnancies. Their main characteristics and results are summarized in Table 1. Overall, even though 5 different assays have been described, based on massively parallel sequencing (targeted^{10,15,17} or not), the results are excellent in terms of specificity. None of these studies (including ours) were designed to evaluate sensitivity.

The main difference between studies relates to the no-result percentage, which varies from 0.48 to 13.2%. There are various possible reasons for these

discrepancies. The first depends on the way the authors counted their no-result rate after first or second sampling. This point is not clear in most publications, while the clinical implications of the requirement for a second sample could be important, especially in countries where the timing is tight if termination of pregnancy has to be considered. In our study, the no-result rate was very low: 12/420 (2.8%) and 2/420 (0.48%) at initial sampling and after re-sampling, respectively. Although a definitive conclusion cannot be reached regarding whether or not the technology has an influence on this rate, the targeted massively parallel sequencing approach leads to a higher no-result rate. Sarno et al.¹⁷ reported a failed test in 9.4% of cases after the first sampling and in 4.8% after the second. This difference could be due not only to the method used for the fetal fraction measurement, but also to gestational age at sampling as stated later.

Fetal fraction measurement is still debated. Some laboratories do not routinely measure fetal fraction, but produce a higher number of reads by deeper sequencing to compensate for and to minimize the possibility of false-negative results, but Jensen et al.²⁴ have demonstrated the hazardous results of this technique. In order to minimize the false-negative rate, other providers use an algorithm that relies on the lower fetal fraction of both twins and includes a quality metric in addition to the low amount of fetal fraction thereby producing additional failures due to high variation in cfDNA counts^{17,28}. It has been shown that the total fetal fraction could be up to 35% higher in twin pregnancies compared with singleton pregnancies²⁹, but the fetal fraction per twin is lower in some studies^{15,17} and higher in others at similar gestational age¹⁸, and that the contributions from each twin could differ by as much as twofold^{22,30}.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

The method used in our study is global for both fetuses and cannot assess the contribution of each of them. The 8% threshold value for a negative result assumes that the contribution from each fetus to the plasma cfDNA is enough to ensure accurate results, even if it is not known whether each fetus contributed adequate amounts of DNA. This point is of importance as 79% of twins included were DCDA, but this should not affect the results in DCMA due to the method of measurement used in our study, and underlines the necessity for the lab to evaluate its method before pursuing cfDNA analysis in multiple pregnancies.

The second reason for between-study differences relates to the mean gestational age at sampling for fetal fraction measurement. In our study, as well as in the study by Fosler et al.¹⁸, mean gestational age was 16 weeks. Other studies are needed to ensure that early screening does not result in a higher no-result rate. New generations of assays including both fetal fraction measurement and sequencing depth in a single dynamic algorithm should avoid this³¹.

Conventional biochemical screening is not appropriate in cases of egg donation, as β -hCG is higher than in the control group⁵. Therefore, a reliable cfDNA test is of particular interest for these patients. Our method was compatible with ART pregnancies, including egg donation, whereas cfDNA assays based on SNP-counting are not.

Bevilacqua et al. and Sarno et al. showed that in twin pregnancies conception by in vitro fertilization provided significant independent prediction of test failure^{15,17}. Tan et al.¹⁶ recently showed that, in 565 twin pregnancies obtained after ART, the failure rate was low (0.9%), with a 100% positive predictive value for trisomy 21, even though this study did not include a control group of twin

pregnancy without ART procedures. We found no difference in test performance between the ART group and the spontaneous pregnancy group. The no-result rate was identical in both groups. Although the two groups differ in age and fetal fraction, the logistic regression to predict failure of cfDNA testing in twins showed the influence of maternal weight only.

The strength of our study is that we evaluated cfDNA screening in a clinical interventional setting and report a lower rate of "no results". Our data highlight the need to provide patients with twin pregnancies with clear and comprehensive information on screening for the main aneuploidies. Pending larger prospective first-trimester studies, screening for trisomy 21 using cfDNA tests can be offered in twin pregnancies, as a first-line screening test, early in the second trimester.

Acknowledgments

The authors thank Martine Olivi, Sandrine Moukoury and Ramdane Mallek for their technical assistance, Adèle Demain for her help in data collection and David Marsh for language editing.

Financial Disclosure

JMC, PK and LL are employees of CERBA, in which they are also shareholders.

References

1. Garchet-Beaudron A, Dreux S, Leporrier N, ABA Study group, Clinical study group, Oury JF, Muller F. Second trimester Down syndrome maternal serum marker screening: a prospective study of 11400 twin pregnancies. *Prenat Diagn* 2008; **28** :1105-1109.
2. Madsen HN, Ball S, Wright D, Torring N , Petersen OB, Nicolaides KH, Spencer K. A reassessment of biochemical marker distributions in trisomy 21-affected and unaffected twin pregnancies in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; **37** : 38-47.
3. Prats P, Rodriguez I, Comas C, Puerto B. Systematic review of screening for trisomy 21 in twin pregnancies in first trimester combining nuchal translucency and biochemical markers: a meta analysis. *Prenat Diagn* 2014; **34** : 91077-83.
4. Giorgetti C, Vanden Meerschaut F, De Roo C, Saunier O, Quarello E, Hairion D, Penaranda G, Chabert-Orsini V, De Sutter P. Multivariate analysis identifies the estradiol level at ovulation triggering as an independent predictor of the first trimester pregnancy-associated plasma protein-A level in IVF/ICSI pregnancies. *Hum Reprod* 2013; **28** : 2636-42.
5. Bellver J, Casanova C, Garrido N, Lara C, Remohi J, Pellicer A, Serra V. Additive effect of factors related to assisted conception on the reduction of maternal serum pregnancy-associated plasma protein A concentrations and the increased false-positive rates in first-trimester Down syndrome screening. *Fertil Steril* 2013; **100** : 1314-20.
6. Vink J, Fuchs K, D'Alton M. Amniocentesis in twin pregnancies: a systematic review of the literature. *Prenat Diagnosis* 2012; **32** : 409-416.

7. Agarwal K, Alfirevic Z. Pregnancy loss after chorionic villus sampling and genetic amniocentesis in twin pregnancies: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012; **40** :128-34.
8. Cell-free DNA screening for fetal aneuploidy. Committee opinion no. 640. *Obstet Gynecol* 2015; **126** : 691-2.
9. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) Publications Committee. Clarification of recommendations regarding cell-free DNA aneuploidy screening. *Am J Obstet Gynecol* 2015; **213** : 753-754.
10. Gil MM, Revello R, Poon LC, Akokelar R, Nicolaides KN. Clinical implementation of routine screening for fetal trisomies in the UK NHS: cell-free DNA test contingent on results from first-trimester combined test. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016; **47** : 45-52.
11. Oepkes D, Page-Christiaens GC, Bax CJ, Bekker MN, Bilardo CM, Boon EM, Schuring-Blom GH, Coumans AB, Faas BH, Galjaard RH, Go AT, Henneman L, Macville MV, Pajkrt E, Suijkerbuijk RF, Huijsdens-van Amsterdam K, Van Opstal D, Verweij EJ, Weiss MM, Sistermans EA; and for the Dutch NIPT Consortium. Trial by Dutch laboratories for evaluation of non-invasive prenatal testing. Part I-clinical impact. *Prenat Diagn* 2016; **36** : 1083-1090
12. Gil MM, Quezada MS, Bregant B, Syngelaki A, Nicolaides KH. Cell-free DNA analysis for trisomy risk assessment in first-trimester twin pregnancies. *Fetal Diagn Ther* 2014; **35** : 204-11
13. Huang X, Zheng J, Chen M, Zhao Y, Zhang C, Liu L, Xie W, Shi S, Wei Y, Lei D, Xu C, Wu Q, Guo X, Shi X, Zhou Y, Liu Q, Gao Y, Jiang F, Zhang H, Su F, Ge H, Li X, Pan X, Chen S, Chen F, Fang Q, Jiang H, Lau TK, Wang W. Noninvasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel

sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies: Sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test in twin pregnancies. *Prenat Diagn* 2014; **34**:335-40.

14. Grömminger S, Yagmur E, Erkan S, Nagy S, Schöck U, Bonnet J, Smerdka P, Ehrich M, Wegner RD, Hofmann W, Stumm M. Fetal aneuploidy detection by cell-free DNA sequencing for multiple pregnancies and quality issues with vanishing twins. *J Clin Med* 2014; **3** : 679-692.

15. Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaides KH, Ordoñez E, Cirigliano V, Dierickx H, Willems PJ, Jani JC. Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; **45** : 61-6.

16. Tan Y, Gao Y, Lin G, Fu M, Li X, Yin X, Du J, Li J, Li W, Peng H, Yuan Y, Chen F, Jiang F, Zhang H, Lu G, Gong F, Wang W. Noninvasive prenatal testing (NIPT) in twin pregnancies with treatment of assisted reproductive techniques (ART) in a single center. *Prenat Diagn* 2016; **36** : 1-8.

17. Sarno L, Revello R, Hanson E, Akolekar R, Nicolaides KH. Prospective first-trimester screening for trisomies by cell-free DNA testing of maternal blood in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016; **47** : 705-711.

18. Fosler L, Winters P, Jones KW, Curnow KJ, Sehnert AJ, Bhatt S, Platt LD. Aneuploidy screening by non-invasive prenatal testing in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; **49**: 470-477.

19. Du E, Feng C, Cao Y, Yao Y, Lu J, Zhang Y. Massively Parallel Sequencing (MPS) of cell-free fetal DNA (cffDNA) for Trisomies 21,18, and 13 in twins pregnancies. *Twin Res Hum Genet* 2017; **20** : 242-249.

20. Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaides KH. Analysis of Cell-Free DNA in Maternal Blood in Screening For Aneuploidies: Updated Meta-Analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; Apr 11.
21. Salomon LJ, Alfirevic Z, Audibert F, Kagan KO, Paladini D, Yeo G, Raine-Fenning N; ISUOG Clinical Standards Committee. ISUOG updated consensus statement on the impact of cfDNA aneuploidy testing on screening policies and prenatal ultrasound practice. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; **49** 815-816.
22. Leung TY, Qu JZ, Lioa GJ, Jiang P, Cheng YK, Chan KC, Chiu RW, Lo YM. Non-invasive twin zygosity assessment and aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Prenat Diagn* 2013; **33** : 675-681.
23. Benachi A, Letourneau A, Kleinfinger P, Senat MV, Gautier E, Favre R, Bidat L, Houfflin-Debarge V, Bouyer J, Costa JM; Collaborative SEquençage a Haut Debit et Aneuploidies (SEHDA) Study Group. Cell-free DNA analysis in maternal plasma in cases of fetal abnormalities detected on ultrasound examination. *Obstet Gynecol* 2015; **125** : 1330-7.
24. Jensen TJ, Zwiefelhofer T, Tim RC, Džakula Ž, Kim SK, Mazloom AR, Zhu Z, Tynan J, Lu T, McLennan G, Palomaki GE, Canick JA, Oeth P, Deciu C, van den Boom D, Ehrich M. High-throughput massively parallel sequencing for fetal aneuploidy detection from maternal plasma. *PLoS One* 2013; **8** : e57381.
25. Kim SK, Hannum G, Geis J, Tynan J, Hogg G, Zhao C, Jensen TJ, Mazloom AR, Oeth P, Ehrich M, van den Boom D, Deciu C. Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenat Diagn* 2015; **35** : 810-5.

26. Assisted Reproductive Technology Surveillance - United States, 2013.

http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss6411a1.htm?s_cid=ss6411a1

[w](#)

27. Amor DJ, Xu JX, Halliday JL, Francis I, Healy DL, Breheny S, Baker HW, Jaques AM. Pregnancies conceived using assisted reproductive technologies (ART) have low levels of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) leading to a high rate of false positive results in first trimester screening for Down syndrome. *Hum Reprod* 2009; **24** : 1330-1308.

28. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Brar H, Tomlinson MW, Pereira L, Spitz JL, Hollemon D, Cuckle H, Musci TJ, Wapner RJ. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med* 2015; **372**:1589-97.

29. Canick JA, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Deciu C, Palomaki GE. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. *Prenat Diagn* 2012; **32** : 730-4.

30. Qu JZ, Leung TY, Jiang P, Liao GJ, Cheng YK, Sun H, Chiu RW, Chan KC, Lo YM. Noninvasive prenatal determination of twin zygosity by maternal plasma DNA analysis. *Clin Chem* 2013; **59** : 427-425.

31. Cirigliano V, Ordoñez E, Rueda L, Syngelaki A, Nicolaides KH. Performance of the neoBona test: a new paired-end massively parallel shotgun sequencing approach for cell-free DNA-based aneuploidy screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; **49**: 460-464.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Figure 1: Flow Chart

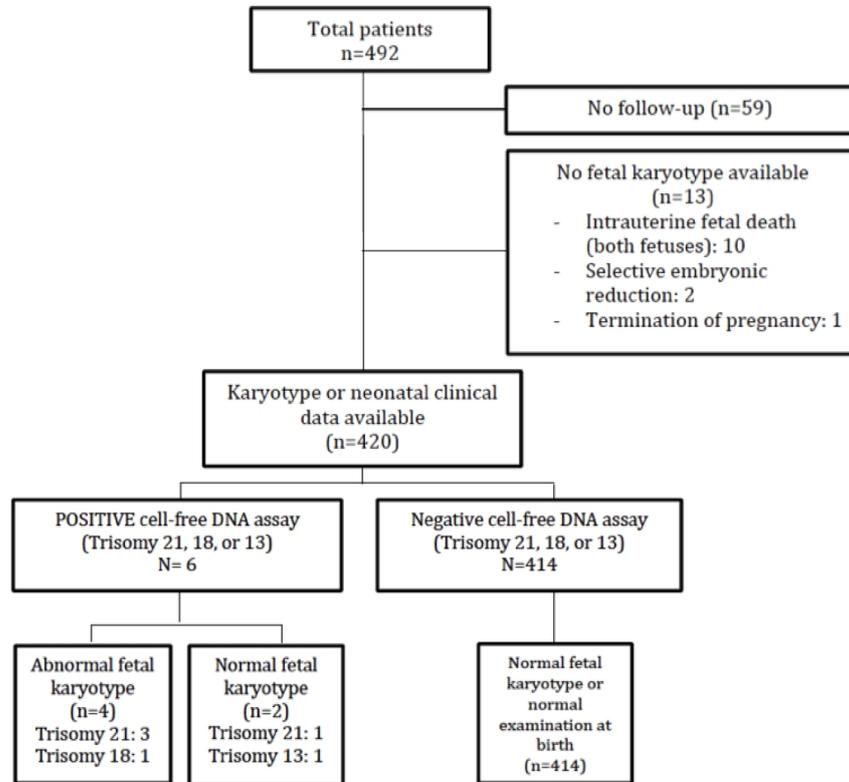


Table 1: Prospective studies on the use of cfDNA in twin pregnancies for trisomy 21 screening

Author, Date	N=	Lab/Assay	DC/MC	Risk	Mode of conception Spontaneous/ART	Maternal weight (kg)	BMI	Maternal age (years)	Gestational age (weeks)	No-result rate (%)	Fetal fraction (%)	Sensitivity for trisomy 21	False positive (N=)	Lost to follow-up (%)
Gil*, 2014 ¹²	68	Ariosa/MPS	52/16	Low	22/46	64.2	NA	37.2	10.6	13.2	7.4¶	100%	0	NA
Huang, 2014 ¹³	189	BGI/MPS	152/33 NA for 4	High	70/113 NA for 6	NA	NA	31	19	NA	NA	100%	NA	0.9
Grömminger, 2014 ¹⁴	38	Lifecodex/MPS	15/5 NA for 18	Low	23/15	NA	NA	NA	14.2	13.1	14.8	100%	0	0
Bevilacqua [§] , 2015 ¹⁵	515	Ariosa/MPS	301/67	Low	243/272	64.4	NA	36.8	13.6	5.6	8.7¶	91.6%	0	31.8
Tan, 2016 ¹⁶	565	BGI/MPS	544/18	Low/High	0/565	NA	NA	31	12	0.9	8.9	100%	0	3.1
Sarno, 2016 ¹⁷	438	Ariosa/MPS	373/65	Low	192/246	NA	23.5	37.3	11.7	7.4	8.0¶	100%	1	NA
Fosler, 2017 ¹⁸	487	illumina/MPS	544/18	High	NA	NA	NA	35.5	16.6	0.9	16.1	100%	1	35.7
Du, 2017 ¹⁹	92	illumina/MPS	53/39	Low/High	52/40	NA	NA	30.5	17.9	0**	20.65	100%	0	0
Le Conte (present study)	492	CERBA/MPS	387/101 NA for 4	Low/High	301/184 NA for 7	63	22.9	37	16.3	0.4	13.4	100%	1	12

DC/MC: dichorionic, monochorionic; ART: assisted reproductive technology; NA: not available; BMI: body mass index; MPS: massively parallel sequencing.

* Cases included in Sarno et al.

§ 129 cases were included in Sarno et al.

¶ Median of the lower fetal fraction

** No detail is given regarding the number of cases tested twice or more

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Table 2: Demographics of patients (median (range) or n (%))

Maternal age (years)	37 (19-49)
Weight (kg)	62 (43-110)
Gestational age (weeks)	16.3 (10.2-35.5)
Type of conception	
Assisted reproductive technology (ART)	158 (37.6)
Spontaneous pregnancy	258 (61.1)
Type of ART (n=158)	
IVF	95 (60.1)
IVF-ICSI	36 (22.8)
Egg donation	27 (17.1)
Chorionicity	
Dichorionic-diamniotic (DC)	331 (78.8)
Monochorionic (MC)	86 (20.5)
Monochorionic-diamniotic	82 (19.5)
Monochorionic-monoamniotic	4 (1)
NR	3 (0.7)

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Table 3: Logistic regression to predict failure of cfDNA testing in noninvasive prenatal testing in twins

Variable	n (%) or median (range)	Failure of cfDNA test			
		Univariate analysis		Multivariate analysis	
		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Maternal age (years)	37 (19-49)	0.987 (0.887-1.100)	0.844		
Gestational age (weeks)	16.3 (10.2-35.5)	0.898 (0.751-1.074)	0.513		
Weight (kg)	63 (43-110)	1.084 (1.041-1.129)	<0.001	1.082 (1.039-1.127)	<0.001
Chorionicity [†]					
MC	86 (20.5)	1.283 (0.342-4.884)	0.705		
DC	331 (78.8)	1			
Trisomy 21/18 or 13					
Yes	6 (1.4)	7.327 (0.789-68.078)	0.080	6.570 (0.485-89.088)	0.157
No	414 (98.6)	1		1	
IVF [‡]					
Yes	158 (37.6)	1.373 (0.412-4.574)	0.606		
No	258 (61.1)	1			

Calculations done on 420 cases with known outcome

[†] Missing data in 3 cases

[‡] Missing data in 4 cases

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Table 4: Comparison between spontaneous and ART pregnancies (median (range) or n (%))

Variables	Spontaneous pregnancies (n=256)	ART pregnancies (n=154)	P-value
Maternal age (years)	36,3 (19-47)	38,9 (28-49)	<0,001
Gestational age (weeks)	16,8 (10.2-35.5)	15,3 (11.6-30.1)	0,008
Weight (kg)	63 (43-105)	63 (44-110)	NS*
Fetal fraction (%)	13,6 (5.8-25.7)	12,9 (4.6-30.2)	<0,001
No-result rate after first test	6 (2,3)	6 (3,8)	NS*

*NS: not significant

This article is protected by copyright. All rights reserved.

b. Annexe II : Formulaire de recueil des issues de grossesses envoyé aux prescripteurs



A Paris, le 07/09/2015

Cher Confrère,

Nous avons réalisé un test génétique non invasif pour la trisomie 21 (et autres aneuploïdies) chez votre patiente.

Afin de répondre à nos obligations réglementaires, et pour la bonne tenue de nos dossiers, nous vous serions reconnaissants de bien vouloir nous retourner les informations ci-dessous dès que possible.

Nous avons conscience de la charge supplémentaire de travail que cela implique pour vos services. Néanmoins, il est important que nous puissions disposer de ces données afin de nous permettre de préparer le bilan de nos activités de diagnostic prénatal à remettre chaque année à l'Agence de la Biomédecine.

Mme

Née le : / /

Date de prélèvement : / /

DDG= / /

Date d'accouchement= / /

**PRISE EN CHARGE HABITUELLE ET DEROULEMENT NORMAL DE LA GROSSESSE,
AUCUN GESTE INVASIF, 2 ENFANTS NES VIVANTS BIEN-PORTANTS?**

08- Oui

09- Non

Si OUI :

10 - Poids de naissance :

10a - Du jumeau A :g

10b- Du jumeau B :g

11- Taille de naissance :

11a - Du jumeau A :cm

11b- Du jumeau B :cm

Si NON :

1/LA PATIENTE A-T-ELLE BENEFICIE D'UN GESTE INVASIF ?

12- Oui

13- Non

Si oui lequel ?

14- Biopsie de villosités chorales (VC)

14a - Sur le jumeau A

14b- Sur le jumeau B

14c- Sur les 2 foetus

15- Amniocentèse

15a - Sur le jumeau A

15b- Sur le jumeau B

15c- Sur les 2 foetus

16- Autre : Quel prélèvement?

16a - Sur le jumeau A

16b- Sur le jumeau B

16c- Sur les 2 foetus

DONNEES DE LA GROSSESSE

01- Grossesse gémellaire

- 01a- Bichoriale
- 01b- Monochoriale biamniotique
- 01b- Monochoriale monoamniotique

02- Grossesse gémellaire

- 02a- Spontanée
- 02b- Issue d'une PMA

03- Si grossesse obtenue par PMA, type de PMA :

- 03a- Stimulation simple
- 03b- Insémination intra-utérine
- 03c- FIV
- 03d- FIV-ICSI

04- La patiente a-t-elle bénéficié d'un dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs sériques?

- 04a- Oui
 - PAPP-A= MoM
 - BhCG= MoM
 - AFP= MoM

04b- Non

DONNEES MATERNELLES

05- Poids de la mère :kg

06- Taille de la mère :cm

07- Tabagisme actif pendant la grossesse :

- 07a- Oui
- 07b- Non

Pour quel motif ?

- 17- Signe d'appel échographique
18- Infection au cours de la grossesse
19- Convenance personnelle

Quels sont les résultats (chromosomes uniquement)?

20- qPCR

- 20a - Jumeau A : Normal T 21/T18/T13 Autre
20b- Jumeau B : Normal T 21/T18/T13 Autre

21- FISH

- 21a - Jumeau A : Normal T 21/T18/T13 Autre
21b- Jumeau B : Normal T 21/T18/T13 Autre

22- Examen direct (VC)

- 22a - Jumeau A : Normal T 21/T18/T13 Autre
22b- Jumeau B : Normal T 21/T18/T13 Autre

23- Caryotype culture

- 23a - Jumeau A : Normal T 21/T18/T13 Autre
23b- Jumeau B : Normal T 21/T18/T13 Autre

24- CGH

- 24a - Jumeau A : Normal T 21/T18/T13 Autre
24b- Jumeau B : Normal T 21/T18/T13 Autre

2/QUELLE EST L'ISSUE DE LA GROSSESSE ?

25- Fausse-couche

26- Mort fœtale in utero

- 26a - Du jumeau A
26b- Du jumeau B

27- Interruption médicale de grossesse

- 27a - Du jumeau A
27b- Du jumeau B

28- Accouchement d'un enfant mort né ou mort néonatale précoce

28a - Du jumeau A

28b- Du jumeau B

29- Accouchement d'un enfant porteur d'une trisomie 13, 18 ou 21

29a - Du jumeau A

29b- Du jumeau B

30- Accouchement d'un enfant porteur d'une autre anomalie chromosomique

30a - Du jumeau A

30b- Du jumeau B

31- Poids de naissance :

31a - Du jumeau A :g

31b- Du jumeau B :g

32- Taille de naissance :

32a - Du jumeau A :cm

32b- Du jumeau B :cm

Merci de me retourner le questionnaire pré-rempli

- par fax au numéro suivant : 01.45.37.43.66 à l'attention du Dr LETOURNEAU

- par courrier à l'adresse suivante :

Maternité Antoine Béclère
Secrétariat du Diagnostic anténatal
Dr Letourneau
157 rue de la Porte de Trivaux
92140 CLAMART

- par mail à l'adresse suivante : letourneau.alexandra@aphp.fr

Un grand merci pour votre aide précieuse !

Jean Marc Costa

c. Annexe III : Ancien formulaire et attestation d'information de la patiente sur l'ADNc21 par le laboratoire CERBA et recueil du consentement



Test génétique non invasif de la trisomie 21 fœtale et autres aneuploïdies

FORMULAIRE D'INFORMATION DE LA PATIENTE *

NATURE DU TEST

Le test qui vous est proposé consiste à analyser les fragments d'ADN provenant du (ou des) fœtus et qui sont présents dans le sang maternel pendant la grossesse. Bien qu'il s'agisse d'un test génétique, l'objectif n'est pas d'analyser le génome du fœtus mais seulement d'évaluer la proportion relative de chacun des chromosomes 13, 18, 21 afin de mettre en évidence l'excès de matériel chromosomique observé lorsque le fœtus est porteur d'une trisomie 13, 18 ou 21.

INDICATIONS DU TEST

Selon le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français, le test doit pouvoir être proposé aux patientes à risque élevé (test de dépistage sérique $\geq 1/250$), quelle que soit la stratégie utilisée en l'absence d'hyperclarté nucale (clarté nucale inférieure au 95^{ème} percentile). Sont également éligibles :

- Les patientes appartenant à un groupe à risque accru, en l'absence de tout signe d'appel échographique
 - o Patientes ayant un antécédent de grossesse avec aneuploïdie fœtale
 - o Couples dont l'un des membres est porteur d'une translocation Robertsonienne impliquant le chromosome 13 ou 21
- Les patientes âgées de plus de 38 ans n'ayant pas pu bénéficier d'une évaluation du risque d'aneuploïdie fœtale par un test de dépistage sérique ou par échographie
- Les grossesses gémellaires, sans hyperclarté nucale ou autre anomalie échographique

En revanche, ce test ne doit pas être proposé à ce jour :

- pour les patientes n'appartenant pas à un groupe à haut risque en raison d'un manque de données et d'un risque accru de faux positif.
- en cas de signes d'appels échographiques (dont une clarté nucale supérieure au 95^{ème} percentile) en raison d'un risque d'anomalie déséquilibrée autres que celles étudiées dans ce test de l'ordre de 2,5%.

RECOMMANDATIONS

- Il est recommandé de ne pas réaliser le test avant 10 semaines d'aménorrhées.
- Il ne dispense pas et ne remplace pas l'échographie du premier trimestre qui doit être effectuée au préalable afin de confirmer l'évolutivité de cette grossesse, de permettre la datation précise de la grossesse, la mesure de la clarté nucale et l'identification des grossesses multiples.

LIMITES DU TEST

- Ce test ne doit pas être assimilé à un caryotype obtenu après villosités chorionales ou amniocentèse qui apporte des informations supplémentaires.
- Ce test se limite aux seules trisomies 13, 18 et 21 complètes. Les anomalies chromosomiques telles que les translocations déséquilibrées, les délétions et duplications ne sont pas détectées.
- Ce test ne détecte pas les maladies génétiques telles que la mucoviscidose
- Ce test ne dépiste pas les anomalies de non fermeture du tube neural telles que le spina bifida
- Ce test ne permet pas de prédire des complications tardives de la grossesse (éclampsie, retard de croissance, accouchement prématuré)

* Ce document a été établi sur la base de recommandations internationales : American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) and Society for Maternal-Fetal Medicine, Décembre 2012, National Society of Genetic Counselors (NSGC) Janvier 2013 et



RESULTATS

Le déla habituel d'obtention des résultats est de 5 à 15 jours ouvrables à réception de l'échantillon par le laboratoire qui réalise le test. Toutefois, dans environ 1-2% des cas, un résultat ne peut être obtenu ce qui peut conduire à un retard au diagnostic ou à la prise en charge de la patiente. Ce peut être le cas notamment en raison d'une trop faible proportion d'ADN fœtal circulant, en particulier si l'âge gestationnel est trop précoce (< 10 semaines d'aménorrhée), si l'indice de masse corporel (IMC) est élevée chez la patiente ou lors de pathologies placentaires. Dans ce cas, il sera proposé à la patiente soit de réitérer le test, soit d'avoir recours sans attendre à un geste invasif.

- La sensibilité du test qui m'est proposé est supérieure à 99% pour les trisomies 13, 18 et 21 mais un résultat négatif n'exclut pas formellement l'absence d'anomalie chromosomique. Par conséquent, la surveillance échographique de la grossesse doit restée inchangée, les échographies morphologiques du 2^{ème} et 3^{ème} trimestre permettant également de rechercher des signes d'appels d'autres pathologies.
- Un résultat positif ne signifie pas obligatoirement que le fœtus est atteint. Il ne s'agit pas d'un test portant un diagnostic définitif.

Il est alors recommandé que la patiente soit reçue en conseil génétique afin d'être informée :

- de la possibilité d'un résultat faussement positif (0.1-0.4% pour le test qui m'est proposé)
- de la nécessité dans ce cas d'un test de confirmation après amniocentèse ou choriocentèse

PRISE EN CHARGE DU TEST

Ce test n'est pas remboursé par la Caisse Nationale d'Assurance Maladie à ce jour et reste donc à la charge de la patiente. Son montant est de 800 €.

Je soussigné Docteur certifie avoir reçu en consultation ce jour la patiente signataire et lui avoir précisément expliqué le but, les modalités ainsi que les limites du test.

Date : Signature du médecin :

Je soussigné Madame atteste avoir été reçue en consultation ce jour par le médecin signataire qui m'a expliqué le but, les modalités ainsi que les limites du test.

Date : Signature de la patiente :

Ce document est réalisé en 3 exemplaires, dont l'original est conservé par le médecin prescripteur, une copie est remise à la patiente et une autre est adressée au laboratoire Cerba avec l'échantillon sanguin.

* Ce document a été établi sur la base de recommandations internationales : American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) and Society for Maternal-Fetal Medicine, Décembre 2012, National Society of Genetic Counselors (NSGC) Janvier 2013 et

d. Annexe IV : Nouveau formulaire et attestation d'information de la patiente sur l'ADNc21 par le laboratoire CERBA et recueil du consentement



DEPISTAGE DES TRISOMIES 13, 18 ET 21 PAR ANALYSE DE L'ADN FŒTAL CIRCULANT

Secrétariat :
Tél : 01 34 40 21 84
Fax : 01 34 40 19 84

e-mail : adncirculant@lab-cerba.com
www.lab-cerba.com

INFORMATION PATIENTE

Madame,

Le test qui vous est proposé consiste à analyser les fragments d'ADN provenant du (ou des) fœtus et qui sont présents dans le sang maternel pendant la grossesse. Bien qu'il s'agisse d'un test génétique, l'objectif n'est pas d'analyser le génome du fœtus mais seulement d'évaluer la proportion relative de chacun des chromosomes 13, 18 et 21 afin de mettre en évidence l'excès de matériel chromosomique observé lorsque le fœtus est porteur d'une trisomie 13, 18 ou 21.

Ce test ne doit pas être assimilé à un caryotype foetal (analyse de l'ensemble des chromosomes) qui ne peut être obtenu qu'après biopsie de villosités chorales (placenta) ou amniocentèse (liquide amniotique). Il ne détecte pas les maladies génétiques (exemple: mucoviscidose), les anomalies de non fermeture du tube neural telle que le spina bifida et ne permet pas de prédire des complications ultérieures de la grossesse (éclampsie, retard de croissance, accouchement prématuré).

RECOMMANDATIONS POUR LA REALISATION DU TEST

La Haute Autorité de Santé (mai 2017) recommande dans le contexte d'une grossesse monofoetale :

- Que le dépistage de la trisomie 21 foetale par analyse de l'ADN circulant soit **proposé à toutes les femmes enceintes dont le niveau de risque de trisomie 21 foetale est compris entre 1/1000 et 1/51** à l'issue du dépistage par dosage des marqueurs sériques. Dans le cas où deux tests ADN foetal consécutifs ne permettraient pas d'obtenir un résultat interprétable, la HAS considère que la conduite à tenir doit être la même quel que soit le niveau de risque entre 1/1000 et 1/51. Dans ce cas particulier, la prise en charge du caryotype foetal devra être possible.
- La possibilité de réalisation d'un caryotype foetal d'emblée soit proposée à toutes les femmes enceintes dont le niveau de **risque de trisomie 21 foetale est supérieur ou égal à 1/50** à l'issue du dépistage par dosage des marqueurs sériques (à titre principal dépistage combiné du 1er trimestre). **Un test ADN foetal circulant pourra cependant être réalisé avant un éventuel caryotype foetal selon la préférence de la femme enceinte.**

Par ailleurs, il est rappelé que :

- la procédure standard de dépistage par marqueurs sériques préconisée est le dépistage combiné reposant sur la mesure échographique de la clarté nucale et le dosage des marqueurs sériques du 1er trimestre ;
- l'accès de toutes les femmes à une échographie biométrique et morphologique réalisée entre 11+0 et 13+6j semaines d'aménorrhée selon les critères de qualité édictés par la HAS doit être garanti ;
- en cas de clarté nucale $\geq 3,5$ mm (ou $>$ 99ème percentile) et autres signes échographiques, la réalisation d'un caryotype foetal (ou d'une analyse chromosomique sur puce à ADN) doit être proposée d'emblée conformément à la procédure standard. *En effet, le risque pour le fœtus d'être porteur d'une anomalie chromosomique déséquilibrée autre que trisomie 13, 18 ou 21 est estimée à environ 8% (données Cerba, étude SEHDA, Benachi A et al. Obstet Gynecol. 2015;125:1330-7.)*

La Haute Autorité de Santé renvoie aux recommandations des sociétés savantes pour le dépistage de la trisomie 21 foetale dans les situations particulières telles que les patientes ayant eu recours à l'assistance médicale à la procréation et les grossesses multiples, ainsi que la détection d'autres anomalies chromosomiques (notamment la trisomie 18 ou 13).

En complément des recommandations de l'HAS, il est rappelé que l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF) a émis les recommandations suivantes (version 2 – 2015):

- Le test est préconisé pour la recherche de la trisomie 21 foetale. Il peut également s'appliquer pour la recherche des trisomies 13 et 18.
- Les indications recevables pour le moment sont les suivantes :
 - o Age maternel ≥ 38 ans pour les patientes n'ayant pas pu bénéficier du dépistage par les marqueurs sériques maternels
 - o Couple dont l'un des membres est porteur d'une translocation robertsonienne impliquant un chromosome 21
 - o Patientes chez qui les marqueurs sériques ne sont pas fiables (grossesses gémellaires, marqueurs sériques hors bornes)
 - o Patientes avec antécédent de grossesse avec aneuploidie foetale.
 - o Patientes ayant un risque accru de trisomie 13 et/ou 18 (translocation robertsonienne impliquant un chromosome 13, marqueurs sériques évocateurs)
- Il n'est actuellement pas recommandé pour le dépistage des autres anomalies chromosomiques (anomalies des chromosomes sexuels, syndromes micro-délétionnels, autres anomalies chromosomiques déséquilibrées).



DEPISTAGE DES TRISOMIES 13, 18 ET 21 PAR ANALYSE DE L'ADN FŒTAL CIRCULANT

Secrétariat :
Tél : 01 34 40 21 84
Fax : 01 34 40 19 84

e-mail : adncirculant@lab-cerba.com
www.lab-cerba.com

EN PRATIQUE

La prescription est réalisée par un médecin ou une sage-femme au cours d'une consultation adaptée (loi n°2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique) :

- Ce test ne doit pas être réalisé avant 10 semaines d'aménorrhée
- Le délai habituel d'obtention des résultats est d'environ 5 jours à réception de l'échantillon par le Laboratoire Cerba
- Le résultat est adressé au prescripteur qui est seul habilité à vous les remettre
- La sensibilité clinique du test est de 100% pour la trisomie 13, 90% pour la trisomie 18 et de 98.9% pour la trisomie 21. La spécificité est >99,9% pour la trisomie 13, la trisomie 18 et la trisomie 21. (Données Illumina. Résultat de l'étude de validation clinique du test)
- Dans moins de 0,5 % des cas, un résultat ne peut être obtenu ce qui peut conduire à un retard au diagnostic ou à la prise en charge de la patiente. Ce peut être le cas notamment en raison d'une trop faible proportion d'ADN fœtal circulant, en particulier si l'indice de masse corporelle (IMC) est élevé, en cas de grossesse multiple ou lors de pathologies placentaires. Dans ce cas, il vous sera proposé soit de réitérer le test (sans frais), soit d'avoir recours sans attendre à un geste invasif.
- Ce test se limite aux seules trisomies 13, 18 et 21. Les anomalies chromosomiques telles que les translocations déséquilibrées, les délétions et duplications ne sont pas détectées.
- Ce test n'est pas remboursé par la Caisse Nationale d'Assurance Maladie à ce jour et reste à la charge de la patiente.

ATTESTATION D'INFORMATION ET CONSENTEMENT DE LA FEMME ENCEINTE A LA REALISATION DU TEST

Je soussignée.....

Conformément à l'article 20 de la loi n°2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique, atteste avoir reçu au cours d'une consultation ce jour, une information loyale, claire et adaptée qui porte sur :

- le risque pour l'enfant à naître d'être atteint d'une maladie d'une particulière gravité, notamment la trisomie 21, les moyens d'en faire le diagnostic et les possibilités de prise en charge,
- la possibilité d'avoir recours à ma demande soit à un geste invasif (amniocentèse ou biopsie de villosités chorionales) en vue d'établir un caryotype fœtal, soit à un dépistage de la trisomie 21 fœtale par analyse de l'ADN libre circulant, la nature, les avantages, inconvénients et limites de chacune des options.

Il m'a notamment été expliqué le but, les modalités concernant le test ADN libre circulant ainsi que ses limites :

- un résultat négatif n'écarte pas complètement la possibilité pour le fœtus d'être atteint d'une des anomalies recherchées, et que le suivi échographique de ma grossesse doit être poursuivi,
- un résultat positif ne permet pas d'affirmer formellement que le fœtus est atteint d'une des anomalies recherchées, et qu'un prélèvement invasif devra m'être proposé pour confirmation ou exclusion du diagnostic au cours d'une consultation adaptée par un médecin ou une sage-femme, le cas échéant, membre d'un centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal

Je consens au prélèvement et à la réalisation de cet examen qui sera effectué par le Laboratoire Cerba autorisé par l'Agence Régionale de Santé à pratiquer le diagnostic prénatal. Il s'agit d'une simple prise de sang qui ne présente aucun risque pour mon fœtus. Le résultat de l'examen me sera rendu et expliqué par le médecin/ la sage-femme qui me l'a prescrit.

Je consens à ce que la partie de mon prélèvement restant non utilisée après ce test, soit intégrée dans un programme d'études scientifiques. L'ensemble des données médicales me concernant seront protégées. En conséquence, les études scientifiques effectuées seront sans bénéfice, ni préjudice pour moi.

Le prescripteur conserve l'original du présent document. Deux copies me sont remises, une pour mon dossier personnel et une à remettre au Laboratoire Cerba devant effectuer ce test. Le Laboratoire Cerba dans lequel exerce le praticien ayant effectué ce test conserve ce document dans les mêmes conditions que le compte-rendu de ce test.

Fait à le

Signature de la patiente

Signature du prescripteur

f. Annexe VI : Information sur les conditions de recueil et d'envoi des échantillons par le laboratoire CERBA



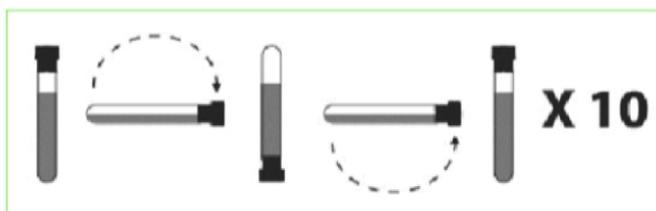
Dépistage des trisomies 13, 18 et 21 par analyse de l'ADN foetal circulant

Secrétariat :
Tél : 01 34 40 21 84
Fax : 01 34 40 19 84
e-mail : adncirculant@lab-cerba.com
www.lab-cerba.com

Laboratoire autorisé pour pratiquer en vue du diagnostic prénatal les examens de cytogénétique y compris de cytogénétique moléculaire, de génétique moléculaire, de biochimie foetale y compris les marqueurs sériques maternels et les examens en vue du diagnostic des maladies infectieuses.

CONDITIONS DE RECUEIL ET D'ENVOI DES ECHANTILLONS

1. Identifier le tube « Streck » fourni.
2. Prélever 10 ml de sang total. Le tube doit être **totalemment rempli**.
Attention le tube est à remplissage **LENT**.
3. Bien mélanger le tube par au moins 10 retournements doux.



4. Déposer le tube dans un sachet « réfrigéré ».
5. Conserver le sachet contenant le tube entre **+ 4° C et + 8° C**.
Le transport se fera à température réfrigérée.
L'ECHANTILLON DOIT PARVENIR AU LABORATOIRE CERBA SOUS 5 JOURS.
6. **NE PAS CONGELER.**
7. Insérer les documents suivants dans la pochette externe du sachet :
 - La feuille de demande d'examen
 - Formulaire et attestation d'information de la patiente et recueil du consentement signés par le médecin et la patiente
 - Une copie du compte-rendu de l'échographie du 1^{er} trimestre
 - Les différents documents requis selon l'indication
 - Le règlement de l'examen en cas de facturation directe à la patiente

Conservation du tube "Streck" avant utilisation :

- A température ambiante jusqu'à date de péremption inscrite sur le tube
- Ne pas congeler le tube

Titre

Analyse de l'ADN fœtal dans le sang maternel comme test de dépistage pour la trisomie 21 pour les grossesses gémellaires

Résumé

Objectif. Évaluer les performances du dépistage prénatal non invasif par l'ADN libre circulant fœtal dans le sang maternel (ADNlc) dans le dépistage de la trisomie 21 en cas de grossesse gémellaire.

Méthodes. L'ADNlc a été utilisé chez 492 patientes ayant une grossesse gémellaire sans anomalie échographique au premier trimestre ou après le dépistage par les marqueurs sériques. Les données ont été recueillies de façon prospective et une analyse rétrospective a été réalisée. L'analyse de l'ADNlc a été réalisée par technique de séquençage massif parallèle. Le seuil de fraction fœtal pour l'évaluation du test était de 8%. Une analyse par régression logistique a été réalisée pour évaluer l'effet de différents paramètres sur le taux d'échec du test. Les performances du test ont également été évaluées.

Résultats. Le test a été prescrit en première intention chez 377 patientes, et chez 115 après dépistage standard par marqueurs sériques. 12 tests (2,9%) étaient non rendus au départ sur les 420 grossesses pour lesquelles les issues de grossesses étaient disponibles et les analyses de régression logistique retrouvaient uniquement le poids maternel comme facteur indépendant statistiquement significatif sur le taux de non rendus. Un deuxième test a été réalisé chez 10 patientes, tous ont pu être rendus. Les résultats de l'ADNlc ont permis d'identifier 3 cas de trisomie 21. La sensibilité du test était de 100% et la spécificité de 99,8%. Il n'y avait pas de différence significative entre les grossesses spontanées et celles issues d'une aide médicale à la procréation (AMP), que ce soit en terme de taux de fraction fœtale, de non rendus, de poids maternel, ou sur les performances du test entre les deux groupes.

Conclusion. Chez les grossesses gémellaires, les performances et le taux de succès du ADNlc sont excellents et par conséquent le test pourrait être proposé en routine comme test de dépistage de première ligne dans cette population.

Mots clés : dépistage non invasif, AND fœtal circulant, grossesse gémellaire

Title

Cell-free fetal DNA analysis in maternal plasma as a screening test for trisomy 21 in twin pregnancies

Abstract

Objectives. To evaluate the performance of noninvasive prenatal testing by cell-free circulating fetal DNA in maternal blood (cfDNA) in screening for trisomies 21 in twin pregnancies.

Methods. CfDNA was performed in 492 patients with twin pregnancies without ultrasound anomalies in the first trimester as a first-line screening test or after serum screening. Data were collected prospectively and a retrospective analysis was done. CfDNA was executed by massive parallel technique. The fetal fraction threshold for test evaluation was 8%. Regression analysis was performed to evaluate the effect of different parameters on the test failure rate. Performance of the test was also considered.

Results. In 377 patients, the test was prescribed first line and in 115 after standard serum screening. 12 tests (2.9%) have initially failed on the 420 pregnancies with available outcomes, and regression analysis found only maternal weight as a significant independent factor of test failure. A second test was performed on 10 patients, all of them had an available result. cfDNA identified all 3 cases of trisomy 21. The sensitivity was 100.0% (95% CI [29.2% - 100.0%]) and specificity was 99.8% (95% CI [98.7% - 100.0%]). There was no significant difference between spontaneous pregnancies and those induced by assisted reproductive technologies (ART), in terms of fetal fraction percentage, no-call results for cfDNA screening, maternal weight, or test performance between the two groups.

Conclusion. In twin pregnancies, the performance and success rate of the cfDNA are excellent. Therefore, cfDNA could be offered in routine practice as a first-line screening test in this population.

Keywords : Noninvasive prenatal testing, cell-free DNA, twin pregnancy

Université Paris Descartes
Faculté de Médecine Paris Descartes
15, rue de l'École de Médecine
75270 Paris cedex 06