

## Demande d'amendement au projet

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

**Soumis à l'AO PHRC national**

### **Résumé**

#### **Méthode (dernière phrase):**

Nous avons prévu 2 ans d'inclusion, avec un nombre attendu de plus de 100 cas de trisomie 21 et 300 cas normaux. Une évaluation des résultats sera effectuée chaque 100 échantillons. Pour les premiers 100 échantillons nous avons prévu d'effectuer une comparaison entre ISET et la méthode de séquençage à haut débit de l'ADN foetal libre dans le sang maternel récemment décrite (Fan et al [28]).

#### **Résultats attendus et perspectives :**

Le succès déjà obtenu de l'étude de validation clinique de la méthode ISET pour le DPN-NI de l'amyotrophie spinale nous permet d'être optimistes sur le succès de l'application de la même approche au DPN-NI de la trisomie 21. Ce projet représente un défi international et un enjeu majeur de la médecine obstétricale moderne et de la recherche française. Il permettra également de comparer les résultats obtenus par ISET et par la méthode de séquençage à haut débit de l'ADN foetal libre dans le sang maternel récemment décrite (Fan et al [28]).

### **6.2 Modalités techniques**

#### **6.2.1 Recueil des prélèvements et stockage**

Après inclusion dans le protocole, et avant la choriocentèse ou l'amniocentèse, chaque patiente aura un prélèvement de 20 ml de sang effectué sur EDTA. Le sang sera centrifugé à 1600 g pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite transféré dans un autre tube et centrifugé à 16000g pendant 10 minutes et stocké à -80°C en attente de l'extraction d'ADN.

#### **6.2.4 Comparaison entre méthode sur ADN foetal libre dans le sang (Fan et al[28]) et méthode ISET**

Notre projet prévoit l'évaluation des résultats obtenus chaque 100 femmes incluses dans l'étude (voir 10.3.2 ). Pour les premiers 100 échantillons, une comparaison entre la méthode ISET et la méthode sur ADN foetal libre dans le sang sera effectuée . L'ADN sera extrait à partir du plasma par le kit d'extraction QIAamp DNA micro kit (Qiagen) et l'ADN foetal sera quantifié par PCR digitale sur appareil TaqMan comme décrit (Fan et al[28]). La procédure de séquençage par shotgun utilisée par Fan et al[28] sera suivie. Deux nanogrammes d'ADN (avec et sans sonication) seront utilisés pour la ligation des adaptateurs aux extrémités rendues « blunt » de l'ADN. Après 18 cycles de PCR avec des amorces complémentaires aux adaptateurs, le produit de PCR sera quantifié par Agilent et par PCR digitale et analysé par séquençage par l'appareil Solexa Analyzer acquis par l'Institut Pasteur et en collaboration avec l'Institut Pasteur. L'analyse et la quantification des fragments sera effectué par le centre de séquençage de l'IP. L'évaluation des résultats sera effectuée en collaboration avec le DR JP Jais (Necker).

### **10. Gestion des données et analyse statistique**

#### **10.3.3 Comparaison des résultats obtenus par la méthode ISET et par la méthode sur ADN foetal libre (Fan et al[28]).**

La première analyse sur 100 grossesses comprendra la comparaison des résultats obtenus par ISET et par séquençage de l'ADN libre dans le sang maternel. Les résultats de cette comparaison indiqueront l'opportunité de poursuivre les tests avec les deux méthodes ou avec une seule des deux.