

**APPEL D'OFFRES 2010**  
**« AMP, diagnostic pré-implantatoire, diagnostic génétique »**  
**Résumés résultats et publications**

Chercheur	Sujet de recherche	THEME
Virginie ROZEE GOMEZ	<a href="#">AMP sans frontière : de Paris à Bruxelles, Barcelone et Thessalonique</a>	1
Frédéric MOREL	<a href="#">Ségrégation méiotique et fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes de porteurs d'anomalie chromosomique constitutionnelle et ICSI</a>	5
Christophe ROUX	<a href="#">Recherche de maladie résiduelle au niveau du tissu ovarien autoconservé en cas de pathologie néoplasique</a>	2
Nikos KALAMPALIKIS	<a href="#">Le don et son récit. Paradoxes bioéthiques et enjeux psychosociaux du don de sperme</a>	1
Stéphane VIVILLE	<a href="#">Recherche de gènes impliqués dans l'infertilité humaine non syndromique</a>	4
Vanina DE LAROUZIERE	<a href="#">Intérêt de la stratégie de transfert au stade zygotique, en fécondation in vitro (FIV/ICSI), pour les couples présentant une fragmentation précoce massive et récurrente de leurs embryons</a>	4
Irène NETCHINE	<a href="#">Etude de la méthylation de la région 11p15 au cours du développement chez l'homme : tissus fœtaux et diagnostic anténatal de Syndrome de Silver Russell ou Wiedemann-Beckwith</a>	4
Jean-François GUERIN	<a href="#">Génotypage de patientes infertiles pour un nouveau facteur de survie maternel. Etude cas-témoins multicentrique</a>	5
Tristan GAUTHIER	<a href="#">Allogreffe utérine chez la brebis</a>	4
Charles PINEAU	<a href="#">Identification de marqueurs protéiques de la lignée germinale testiculaire dans le plasma séminal humain par une approche Omique combinatoire</a>	5
Anu BASHAMBOO	<a href="#">NR5A1 et l'infertilité</a>	4
Jean-Michel DUPONT	<a href="#">Diagnostic par puces à ADN des aneuploidies fœtales à partir du sang maternel</a>	4
Pierre SARDA	<a href="#">Evaluation médico-économique de 3 différentes puces à ADN dans le cadre du diagnostic prénatal</a>	4
Déborah BOURC'HIS	<a href="#">Reprogrammation chromatinienne de l'embryon vue par les techniques de micro-ChIP dans le modèle murin</a>	4
Nathalie DI CLEMENTE-RENAULD-BESSE	<a href="#">Amélioration de la valeur prédictive de l'hormone anti-Müllérienne (AMH) en AMP</a>	4
Anne BAUDOT	<a href="#">Nouveaux systèmes pour la cryopréservation d'ovocytes par congélation ou par vitrification</a>	2

**THEMES DE RECHERCHE**

- 1) Sciences humaines, économiques et sociales : étude en santé publique et / ou éthique ;**
- 2) Sécurité et qualité des pratiques, notamment dans les technologies innovantes ;**
- 3) Impact des diverses méthodes en matière de santé ;**
- 4) Amélioration des techniques et méthodes ;**
- 5) Qualité des gamètes**

## AMP sans frontière : de Paris à Bruxelles, Barcelone et Thessalonique

Virginie ROZEE GOMEZ (Unité mixte INED-INSERM-Paris Sud XI)

**Contexte** : A la veille de la révision de la loi de bioéthique française, le recours à l'AMP et ses contournements sont plus que jamais publics et suscitent de nombreux débats et controverses. La France n'autorise pas certaines pratiques et réserve l'AMP aux couples hétérosexuels. Par ailleurs, le recours à certaines pratiques reste très limité par les contraintes d'accès. Dans ce contexte légal et médical, des hommes, des femmes et des couples français partent à l'étranger pour recourir à une AMP. Des pays tels que la Belgique, l'Espagne ou la Grèce, ont une législation plus libérale en termes d'accès à l'AMP et proposent des services certes coûteux mais plus rapides. L'espace européen offre donc un autre recours médical pour les individus et couples français infertiles et/ou exclus de la prise en charge en France.

**Objectifs** : Ce projet s'inscrit dans le cadre des recherches sur le recours au système de soins dans le domaine de l'AMP. En se plaçant dans un contexte européen, ce projet vise à comprendre les motivations et le parcours des Français qui partent à l'étranger pour recourir à une AMP. Cette analyse, qui s'inscrit dans le cadre des discussions actuelles autour des lois de bioéthique, mettra en regard les réflexions académiques menées dans le cadre des possibles évolutions des lois de bioéthique et les attentes des Français à cet égard.

**Méthodologies** : Cette recherche s'appuie sur une équipe pluridisciplinaire qui mettra en œuvre des méthodes d'étude relevant de l'épidémiologie, de la sociologie et de la psychosociologie. Une approche à trois niveaux sera développée : (1) une analyse au niveau institutionnel, (2) une approche au niveau social, (3) une approche au niveau individuel. L'étude sera menée de manière transversale dans quatre centres médicaux en France, Belgique, Espagne et Grèce. L'approche individuelle portera sur l'ensemble des Français recourant à l'AMP dans ces centres qu'il s'agisse de couples (de même sexe ou non) ou d'individus, femmes ou hommes, célibataires. Elle s'appuiera sur une approche quantitative (400 auto-questionnaires) et une approche qualitative (60 entretiens semi-directifs).

**Résultats attendus** : A l'heure du débat sur les lois de bioéthique françaises, le recours à l'AMP des Français à l'étranger reste très peu étudié. A partir d'une triple approche (institutionnelle / sociologique / individuelle), cette étude permettra d'appréhender le recours à l'AMP et sa prise en charge dans quatre pays européens. Elle permettra de mettre en regard les motivations individuelles, ainsi que la réflexion politique et sociale autour de l'AMP. Cette recherche permettra de mieux comprendre les enjeux sociaux et politiques du recours à l'AMP et d'éclairer le débat politique actuel.

# Appel d'Offres

## « AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique »

### Objectifs:

La diversité des encadrements politiques et des pratiques médicales en matière d'AMP, dans le monde, y compris en Europe, entraîne des recours transnationaux de l'AMP, y compris par les Français. Mais si ces recours font l'objet de nombreux débats et controverses, peu d'études rendent compte de sa réalité.  
=> L'objectif de l'étude était d'identifier et de comprendre quels sont les Français qui partent, où vont-ils, comment s'organisent-ils et surtout quelles sont les raisons qui justifient selon eux un tel recours.

### Méthodes:

Une étude préliminaire, menée auprès de chercheurs, praticiens, responsables et membres d'associations, a permis de sélectionner 3 pays européens, apparus comme des destinations privilégiées par les Français (Belgique, Espagne, Grèce), et dans chacun d'entre eux 1 ou 2 centres médicaux qui ont accepté de participer à l'enquête. Un 4<sup>ème</sup> pays a par la suite été ajouté dans l'étude (Danemark).  
Par l'intermédiaire de ces centres, des questionnaires ont été mis à disposition des patients français et des entretiens semi-directifs ont été réalisés.

Tableau 1. Nombre de répondants par le centre médical

	Quest		Ent	
	n	%	n	%
Centre grec	22	16	21	24
Centre belge	22	16	31	16
Centre danois	9	6	2	1
Centre espagnol	87	62	77	59
<b>TOTAL</b>	<b>140</b>	<b>100</b>	<b>131</b>	<b>100</b>

Le recueil des données, qui s'est adapté aux conditions et difficultés de terrain, a été exhaustif en Grèce; aléatoire en Belgique et au Danemark; rétrospectif et exhaustif en Espagne.

=> Ont été ainsi recueillis 140 questionnaires et réalisés 131 entretiens.

Les caractéristiques et trajectoires des répondants questionnaires et entretiens sont semblables, tout comme celles des non-répondants en Espagne. L'étude a été financée par l'Agence de la biomédecine et l'Institut de recherche en santé publique (IReSP).

### Résultats

#### Caractéristiques sociodémographiques et trajectoires des répondants

Tableau 2. Caractéristiques et trajectoires des répondants

	Quest		Ent	
	n	%	n	%
Couple homme-femme	100	71	104	79
Couple de même sexe	21	15	8	6
Femme seule	19	14	19	15
Age des femmes au 1 <sup>er</sup> rendez-vous dans le centre < 43 ans	106	76	85	65
Femmes Artisans, commerçantes, chefs d'entreprise, cadres	55	40	50	45
Femmes exerçant une profession intermédiaire, employées, ouvrières	83	60	60	55
Partenaires Artisans, commerçants, chefs d'entreprise, cadres	68	58	49	55
Partenaires exerçant une profession intermédiaire, employés, ouvriers	50	42	40	45
Aucun enfant	99	71	96	74
Durée du projet d'enfant de 4 ans au moins	74	58	88	64
Réalisation d'une (ou plusieurs) AMP en France	74	53	82	63
Possibilité de prise en charge légale et remboursée en France	68	49	65	50

Les répondants au questionnaire et entretien sont principalement des couples homme-femme, des femmes de moins de 43 ans (hors du 1<sup>er</sup> rendez-vous dans le centre médical étranger), sans enfant. La majorité de l'échantillon appartient à la classe moyenne supérieure de la société française (tableau 2) mais l'échantillon contient également des ouvriers, employés et professions intermédiaires. En excluant les femmes recourant à la vitrification ovocytaire, les répondants tentent d'avoir un enfant majoritairement depuis plus de 4 ans.

Les femmes avaient alors 35 ans (âge médian), âge cohérent avec les évolutions de la société française. 20% des répondants ont commencé des démarches pour adopter et la majorité a réalisé une ou plusieurs AMP en France avant de partir à l'étranger (tableau 2). La moitié des répondants réunissaient les critères sociodémographiques pour bénéficier d'une prise en charge légale et remboursée par l'assurance maladie en France (PLRF). Parmi ceux ne réunissant pas ces critères (non-PLRF), 25% (questionnaires) et 42% (entretiens) ont bénéficié d'une AMP en France avant de partir à l'étranger.

#### Principales raisons du recours transnational

Tableau 3. Techniques requises à l'étranger

	Quest		Ent	
	n	%	n	%
Don de sperme	34	24	20	15
Don d'ovocytes	87	62	87	66
Double don	5	4	8	6
Accueil d'embryons	1	1	1	1
Fécondation in vitro (FIV)	6	4	5	4
Vitrification ovocytaire	5	4	6	5
Gestation pour autrui	2	1	4	3
<b>TOTAL</b>	<b>140</b>	<b>100</b>	<b>131</b>	<b>100</b>

Les principales techniques sollicitées à l'étranger sont le don d'ovocytes et le don de sperme (tableau 3). La destination est déterminée par la situation matrimoniale et l'orientation sexuelle, la technique sollicitée et l'âge des femmes (+/- 43 ans). Les PLRF vont davantage en Grèce et en Espagne et requièrent surtout un don d'ovocytes. Pour une même technique, le choix du pays et du centre peut être également lié à la classe sociale: pour un don d'ovocytes, les femmes ayant une profession moins favorisée vont davantage en Grèce qu'en Espagne. En considérant uniquement les répondants questionnaires PPLR, la raison la plus fréquemment cochées pour justifier le recours à l'étranger est :

les démarches sont trop longues en France et considérées comme plus rapides à l'étranger (à noter que 20% des PLRF ont coché qu'ils traversaient les frontières pour des raisons légales). Dans les centres médicaux étrangers, les répondants ont déclaré avoir leur premier transfert d'embryons trois mois en moyenne après leur premier rendez-vous.

#### Choix du pays, du centre et organisation de recours

Concernant les sources d'information les plus fréquemment cochées : une association (77% des répondants recrutés en Grèce) ; des praticiens français (par 79% des répondants recrutés en Espagne) ; Internet (par 64% des répondants). Le choix du centre médical se fait différemment selon le centre de recrutement: proximité géographique pour les répondants recrutés en Belgique ; le coût pour les répondants recrutés en Grèce ; la recommandation du praticien pour les répondants recrutés en Espagne; la qualité des soins et la réputation du centre pour 69% de l'ensemble des répondants. Selon les entretiens, d'autres critères sont également décisifs : les origines culturelles et géographiques des répondants, le phénotype majoritaire du pays, etc. 86% étaient médicalement suivis en France ; 84% des femmes avaient, au moment de l'étude, un traitement hormonal; 92% d'entre elles obtenaient ce traitement en pharmacie en France, qu'elles soient PPLR ou non PPLR. D'après les entretiens, les répondants s'organisent en prenant des congés, parfois des congés sans solde, parfois des arrêts maladie. Pour payer, la plupart a fait des économies (69%); d'autres ont déclaré dans le cadre de l'entretien avoir fait un emprunt à la banque, à un proche ou avoir vendu ses biens (commerces, maisons). 58% des répondants ont déclaré ne pas avoir rencontré de difficultés; quand ils en ont néanmoins rencontrées, elles sont liées au centre de recrutement : prix en Espagne et l'attente en Belgique. 38% de l'ensemble de l'échantillon ont fait une demande de remboursement auprès de l'assurance maladie française (57% des PPLR).

### Conclusions:

L'étude n'est pas représentative de l'ensemble des Français qui partent à l'étranger pour bénéficier d'une AMP. Elle n'en donne pas moins de premiers éléments et pistes de réflexions pour de futures recherches. L'étude montre que les recours transnationaux de l'AMP sont des recours divers et complexes y compris pour une population provenant d'un même contexte socioculturel, politique et gouvernemental. Par ailleurs, ces recours ne sont pas le privilège des classes aisées, ne concernent pas uniquement des femmes « âgées », ni les couples de même sexe. Ils dépendent des réseaux sociaux mobilisés (associations, médecins, Internet). Les raisons légales du recours à l'AMP à l'étranger ne sont pas suffisantes pour expliquer ce phénomène puisque la moitié des répondants réunissaient les conditions sociodémographiques requises en France, sollicitaient une technique légale en France et avaient eu recours à une AMP en France avant de partir à l'étranger. Une importante raison de partir est la longueur des démarches en France (plusieurs années) pour obtenir un don d'ovocytes. L'étude souligne également le manque d'information concernant l'AMP en France puisque certains répondants considéraient ne pas pouvoir bénéficier d'une AMP en France du fait de l'âge de la femme (alors qu'elles avaient moins de 43 ans) ou de la technique requise (alors qu'il s'agissait du don d'ovocyte). Enfin, les résultats de cette étude interrogent plus largement sur 4 axes : (1) l'information à diffuser et vulgariser concernant en particulier le don d'ovocytes ; (2) les solutions à apporter aux femmes qui ont un long parcours d'AMP puis qui doivent partir à l'étranger pour concrétiser leur projet ; (3) les solutions en amont, telles que l'adoption ou la vitrification ovocytaire ; (4) l'émergence des nouvelles configurations familiales parentales qui viennent redéfinir les modèles sociaux dominants de la famille et de la parentalité.

## Ségrégation méiotique et fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes de porteurs d'anomalie chromosomique constitutionnelle et ICSI

**Frédéric MOREL** (INSERM U613 - CHU BREST)

Les objectifs de ce projet sont de déterminer pour chaque homme porteur d'une anomalie chromosomique de structure le pourcentage de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés et celui avec un ADN fragmenté dans l'éjaculat total et dans les spermatozoïdes sélectionnés en vue d'une ICSI, de rechercher l'incidence de ces fréquences de spermatozoïdes déséquilibrés et fragmentés sur les résultats de l'ICSI, et de déterminer si les gamètes chromosomiquement déséquilibrés ont un ADN plus fragmenté que ceux dont l'équipement chromosomique est normal ou équilibré. Dans cette étude nous allons inclure environ 60 patients porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle. L'équipement chromosomique des spermatozoïdes est évalué par FISH et la fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling assay). L'ICSI est réalisée selon les protocoles classiques. Les embryons sont classés d'après la classification de Puissant associée à la classification du Blefco. Les évaluations de l'équipement chromosomique et de l'ADN fragmenté réalisées sur éjaculat total et sur spermatozoïdes sélectionnés en vue d'une ICSI, chez un même patient permettront de voir s'il existe des variations de la fréquence des spermatozoïdes déséquilibrés et / ou fragmentés, notion jusqu'à présent jamais abordée dans la littérature. S'il existe de telles variations, la stratégie de préparation des spermatozoïdes permettant d'obtenir les pourcentages de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés et fragmentés les moins élevés sera utilisée au laboratoire pour effectuer les ICSI. L'étude multi-variée effectuée afin de corréler les résultats issus de la FISH et du TUNEL aux résultats après tentatives d'ICSI permettra peut-être de déterminer la fréquence de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés ou fragmentés à partir de laquelle les chances de succès d'ICSI sont minimales ou nulles, notion jusqu'à présent très peu étudiée et très controversée.

Enfin, concernant l'éventuelle relation entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et l'équipement chromosomique des gamètes, chez deux patients porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle, nous avons montré, pour la première fois, que les spermatozoïdes avec un ADN fragmenté sont majoritairement ceux dont l'équipement est déséquilibré. De plus, il apparaît lié au type de déséquilibre, dépendant du mode de ségrégation. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus sont très prometteurs et permettront peut-être de contribuer à la compréhension des origines de la fragmentation.

### **Publication :**

Perrin A, Nguyen MH, Delobel B, Guéganic N, Basinko A, Le Bris M-J, et al. Characterization and meiotic segregation of a supernumerary marker chromosome in sperm of infertile males: Case report and literature review. *European Journal of Medical Genetics*. déc 2012;55(12):743-6.

# Appel d'Offres

## « AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique »

### SEGREGATION MEIOTIQUE ET FRAGMENTATION DE L'ADN SPERMATIQUE CHEZ DES HOMMES PORTEURS D'ANOMALIE CHROMOSOMIQUE CONSTITUTIONNELLE

Morel F

INSERM U1078, laboratoire d'histologie, embryologie et cytogénétique,  
Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest.  
Service de cytogénétique, cytologie et biologie de la reproduction, hôpital Morvan, CHRU Brest, Brest

**Introduction:** L'infertilité affecte environ 15% des couples, dans 50% des cas, l'origine est masculine. De nombreuses études ont montré une élévation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique chez les patients infertiles porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle. Ces travaux ayant été réalisés sur éjaculat total, nous ne savons pas si les gamètes fragmentés sont majoritairement ceux dont l'équipement chromosomique est déséquilibré. Le but de ce travail est de déterminer si les gamètes chromosomiquement déséquilibrés ont un ADN plus fragmenté que ceux dont l'équipement chromosomique est normal.

**Méthode:** Nous avons étudié 10 patients infertiles dont 7 porteurs d'une translocation réciproque équilibrée et 3 porteurs d'une translocation robertsonienne dont le caryotype est précisé dans le tableau 1. La fragmentation de l'ADN spermatique est étudiée par la technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling assay). Après élimination de la rhodamine, la technique de FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) est réalisée sur les mêmes spermatozoïdes pour déterminer l'équipement chromosomique de chaque gamète.

### Résultats

Le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et le taux de gamètes déséquilibrés sont relevés dans le tableau 1.

Patients	Caryotype	Fragmentation (%)	Taux de gamètes déséquilibrés (%)
P1	46,XY,t(6;8)(q27;q24.1)	3,2	59
P2	46,XY,t(7;7)(p12;p22)	4,7	55,6
P3	46,XY,t(7;15)(p15.1;q13)	8,7	50,1
P4	46,XY,t(13;15)(p31;q26.2)	6,3	61,4
P5	46,XY,t(13;17)(p13;p12)	12,6	45,6
P6	46,XY,t(19)(q13;q23)	31,7	59,6
P7	46,XY,t(15;16)(p10;q10)	6,8	53,0
P8	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	8,3	30,1
P9	45,XY,rob(14;21)(q10;q10)	8,4	25,8
P10	45,XY,rob(13;15)(q10;q10)	12,5	27,2

Tableau 1 : Le caryotype, le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et le taux de gamètes déséquilibrés

La répartition des gamètes fragmentés se fait selon certains modes de ségrégation méiotique et non équitablement entre eux (Figures 1 et 2).

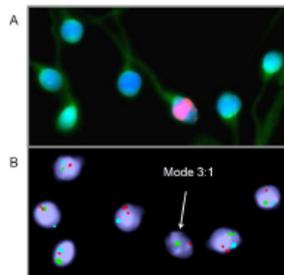


Figure 1 : Le spermatozoid fragmenté (en rouge) dans la photo A, dont l'équipement chromosomique se trouve dans la photo B est déséquilibré

La fragmentation de l'ADN spermatique est plus élevée dans les spermatozoïdes qui sont chromosomiquement déséquilibrés en comparaison avec ceux dont l'équipement chromosomique est normal pour les 10 patients (Tableau 2).

Patients	Equipement chromosomique	ADN spermatique		Valeur p
		F (%)	MF (%)	
P1	Normal	1	56	0,0001
	Déséquilibré	4,6	55,4	
P2	Normal	2,9	57,1	0,0001
	Déséquilibré	6,2	63,8	
P3	Normal	0,6	56,4	0,0001
	Déséquilibré	12,5	67,5	
P4	Normal	4,5	55,7	0,001
	Déséquilibré	7,6	62,4	
P5	Normal	3,3	56,7	0,0001
	Déséquilibré	26,4	79,6	
P6	Normal	12,7	67,3	0,0001
	Déséquilibré	33,8	67	
P7	Normal	0,8	56,2	0,0001
	Déséquilibré	12,2	67,8	
P8	Normal	0,7	53,3	0,0001
	Déséquilibré	12,2	67,8	
P9	Normal	0,8	55,2	0,0001
	Déséquilibré	13,4	66,6	
P10	Normal	0,2	51,8	0,0001
	Déséquilibré	28,8	71,2	

Tableau 2 : Répartition des gamètes fragmentés par rapport à l'équipement chromosomique chez les 10 patients

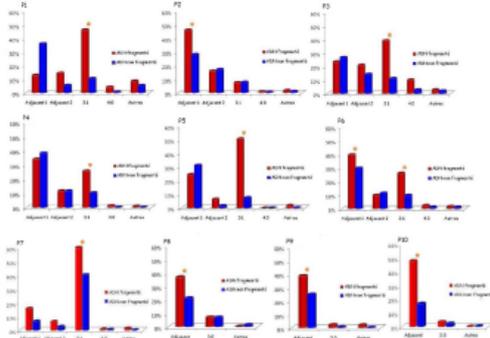


Figure 2 : Répartition des gamètes fragmentés ou non fragmentés selon le mode de ségrégation méiotique chez les 10 patients. L'étoile indique une différence significative dans la répartition des gamètes fragmentés selon le mode de ségrégation méiotique

**Conclusion:** Notre étude est la première permettant d'observer la fragmentation de l'ADN et l'équipement chromosomique sur un même gamète et de lier ainsi ces deux paramètres (Figure 1). Le taux de fragmentation de l'ADN spermatique chez les 10 patients porteurs d'une anomalie chromosomique est plus élevé que la norme. L'apoptose abortive est un des mécanismes responsables de la fragmentation de l'ADN spermatique. Les gamètes chromosomiquement déséquilibrés sont étiquetés comme devant être détruits par apoptose pendant la spermiogénèse. Mais ce processus ne mène pas jusqu'à la mort cellulaire pour un certain nombre d'entre eux. Ainsi, cela pourrait expliquer l'existence de spermatozoïdes vivants et féconds dans l'éjaculat avec un ADN fragmenté et un équipement chromosomique déséquilibré. De plus, la répartition des gamètes fragmentés ne semble pas se faire au hasard mais selon les modes de ségrégation méiotique aboutissant à la formation d'équipements chromosomiques déséquilibrés. En conclusion, cette étude permet de mieux comprendre le mécanisme de la fragmentation de l'ADN spermatique et montre l'intérêt d'étudier la ségrégation méiotique et la fragmentation de l'ADN chez des hommes infertiles porteurs d'anomalie chromosomique constitutionnelle.

## Recherche de maladie résiduelle au niveau du tissu ovarien autoconservé en cas de pathologie néoplasique

**Christophe ROUX** (Service de génétique, histologie, biologie du développement et de la reproduction - centre d'AMP, CHU Saint Jacques)

L'autoconservation de tissu ovarien est proposée à des fillettes ou des femmes âgées de moins de 35 ans, devant subir un traitement gonadotoxique stérilisant, dans le but de préserver leur fertilité. Actuellement et en l'absence d'autres techniques (maturation in vitro, greffe de follicules ovarien isolés...), l'autogreffe de ce tissu autoconservé est la seule technique permettant de restaurer la fertilité. L'autogreffe est possible si l'indication de la cryoconservation d'ovaire est une pathologie non néoplasique ou une pathologie maligne à faible risque de localisation métastatique ovarienne. Dans les autres cas de pathologies néoplasiques, le tissu ne peut pour l'instant pas être réutilisé du fait de l'absence de technique codifiée pour évaluer la maladie résiduelle.

L'objectif principal de ce projet sera de développer et de valider des outils pour s'assurer de l'absence de cellules néoplasiques résiduelles au niveau du tissu ovarien autoconservé en cas de pathologie néoplasique. Les hémopathies malignes seront les premières pathologies étudiées car l'UMR645 dispose d'outils sensibles (cytométrie « multi-couleur », biologie moléculaire) et d'un savoir-faire pour détecter cette maladie résiduelle au niveau sanguin, médullaire ou ganglionnaire.

La mise à disposition de techniques et d'outils attestant de l'absence de maladie résiduelle dans les tissus ovariens ajoutera une dimension sécuritaire carcinologique aux dimensions microbiologique et fonctionnelle des contrôles pré-greffes mis en œuvre en prévision de la réutilisation du tissu cryoconservé par technique d'autogreffe.

Les objectifs méthodologiques seront les suivants : (i) codifier les techniques de préparation du tissu ovarien (dissociation mécanique, enzymatique,...) pour l'obtention de préparations tissulaires et/ou des populations cellulaires analysables (ii) développer et/ou adapter des techniques de détection des cellules néoplasiques, en déterminant leur sensibilité et leur spécificité. Les techniques mises en œuvre feront appel à l'identification de marqueurs de malignité par cytométrie en flux ou encore à l'amplification de transcrits anormaux par PCR sur les extraits tissulaires ou sur cellules isolées.

Une modélisation préalable consistera à ajouter différentes dilutions de cellules leucémiques « étrangères » (lignées cellulaires commercialisées) parfaitement caractérisables.

Un modèle de xéno-greffes de tissu ovarien humain chez la souris immunodéficiente pourra parallèlement être mis au point pour tenter d'obtenir une phase d'amplification de la maladie résiduelle in vivo et accroître la sensibilité de la technique pendant la phase de mise au point.

La mise au point des techniques de qualification fera appel à du matériel humain - fragments de corticale ovarienne obtenus au cours de résection percoelioscopique chez des patientes présentant un syndrome des ovaires polykystiques (matériel de référence du tissu ovarien sain), - matériel provenant d'autopsies scientifiques documentées, - matériel d'autoconservation de tissu ovarien provenant de patientes chez lesquelles une autoconservation a été effectuée et qui sont décédées, ces patientes ayant préalablement donné leur accord pour de telles études lors du recueil de leur consentement avant l'autoconservation du tissu ovarien.

### Publication :

Amiot C, Angelot-Delettre F, Zver T, Alvergnas-Vieille M, Saas P, Garnache-Ottou F, et al. Minimal residual disease detection of leukemic cells in ovarian cortex by eight-color flow cytometry. Human Reproduction. 1 août 2013;28(8):2157-67.

# Appel d'Offres « AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique »

## RECHERCHE DE LA MALADIE RESIDUELLE AU NIVEAU DU TISSU OVARIEN AUTOCONSERVE EN CAS DE PATHOLOGIE NEOPLASIQUE

### Objectifs

La cryoconservation de cortex ovarien est la principale technique utilisée pour préserver la fertilité chez les fillettes et les jeunes femmes atteintes de pathologie néoplasique et devant bénéficier d'un traitement hautement gonadotoxique. Actuellement, en l'absence d'autres techniques (maturation in vitro, injection de follicules ovariens isolés...), la réutilisation de ce tissu se fait par technique d'autogreffe. Il est donc nécessaire d'évaluer la présence de maladie résiduelle (MRD) dans le tissu avant autogreffe. Ce travail a pour but d'évaluer la présence de cellules leucémiques dans le cortex ovarien par cytométrie en flux 8 couleurs et PCR quantitative.

### Méthodologie

Obtention d'une suspension de cellules de corticale ovarienne isolées par action mécanique et enzymatique à partir de :

- tissu ovarien de référence : fragments de corticale ovarienne provenant de résections percoelioscopiques en cas de SOPK
- fragments de cortex ovarien autoconservé provenant de patientes leucémiques

Recherche de marqueurs cytologiques par cytométrie en flux 8 couleurs

3 anticorps fixes : syto 13, 7-AAD et CD45

5 anticorps choisis en fonction de l'immunophénotype des cellules leucémiques (ex: CD3, CD7, CD10, CD13, CD19, CD38, CD58, CD123, CD304...)

Recherche de marqueurs tumoraux moléculaires par Q-PCR (quand disponibles)

- Gènes cibles : BCR-ABL, NPM1 variant A...
- Gène de référence : ABL

Xéno greffes

(souris CD-1 nude) d'un fragment de corticale ovarienne pour tenter d'amplifier la MRD.

### contacts

Centre d'Investigation Clinique en BioThérapies (CIC-1431)

Unité Mixte de Recherche (UMR1098) : EFS/INSERM/UFC

Centre d'Assistance Médicale à la Procréation

Service de Biologie et Médecine de la Reproduction, Cryobiologie

CHRU J. Minjoz, 3 Bd Fleming 25000 Besançon

Tél. secrétariat : +33 (0)3 81 21 86 98

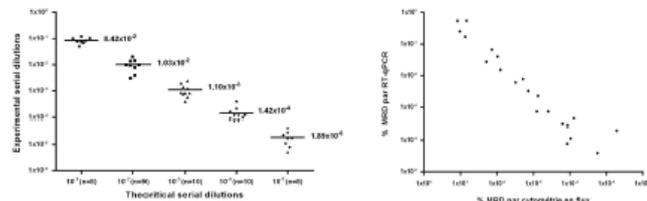
christophe.roux@univ-fcomte.fr

clotilde.amiot@univ-fcomte.fr

### Résultats

Nombre de cellules nucléées vivantes (syto13 +, 7-AAD -) obtenues  $1,82.10^6 \pm 1,49.10^6$  pour 100mg de cortex ovarien (n=32). Absence de cellules ovariennes avec un immunophénotype de cellules leucémiques.

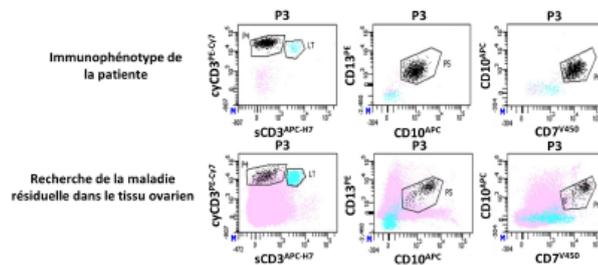
Spécificité et sensibilité de la technique par dilution de cellules leucémiques dans une suspension de cellules ovariennes de tissu de référence



Sensibilité atteinte < 10<sup>-4</sup> (n=10)

r=0,8840, p<0,0001 (n=21)

Exemple de recherche de la maladie résiduelle au niveau de fragments de cortex ovarien de patiente leucémique



365 événements détectés correspondant à des cellules leucémiques vivantes / 1 360 814 événements nucléés vivants détectés → Soit un niveau de MRD = 2,7.10<sup>-4</sup>

### Conclusion

La recherche de la MRD par cytométrie en flux 8 couleurs permet de détecter la présence de cellules leucémiques vivantes au niveau du cortex ovarien cryoconservé en fonction de leur immunophénotype. Elle peut être proposée en cas d'absence de marqueurs moléculaires identifiables.

Ainsi la maîtrise du risque carcinologique permettra d'élargir les indications d'autoconservation de tissu ovarien chez les femmes jeunes et de favoriser la réutilisation, par autogreffe, des fragments cryoconservés.

## Le don et son récit. Paradoxes bioéthiques et enjeux psychosociaux du don de sperme

**Nikos KALAMPALIKIS** (Groupe de Recherche en Psychologie Sociale (GRePS – EA 4163 - Institut de Psychologie – Université Lyon 2)

### Objectifs

Ce projet s'intéresse à une technique de procréation spécifique, l'insémination avec donneur de sperme (IAD). Il se focalise sur un sujet d'une importance capitale, le devenir du récit de conception proposé aux enfants nés par don de sperme. Ce type de recherches, rarissimes à ce jour en France, pourrait contribuer de manière solide à mettre en évidence le vécu et les paradoxes de ces enjeux bioéthiques. Il compte approfondir les acquis d'outils validés (questionnaire national, guides d'entretiens, analyse législative), de partenariats établis (Fédération française des Cecos), de connaissance fine des populations sensibles impliquées (donneurs, couples), pour investiguer de manière ciblée de nouvelles pistes de recherche. Les partenariats nationaux et européens envisagés donneront une nécessaire dimension internationale à l'étude.

### Méthodologies

Nous opterons pour la construction d'un échantillon de couples demandeurs de don basé sur trois variables : (i) le genre du membre du couple, (ii) le fait d'être dans une démarche initiale de demande de don ou de la renouveler, (iii) l'âge de l'enfant (temporalité de la première démarche). Le questionnaire, l'entretien individuel et l'entretien collectif (focus group) sont les trois techniques préconisées dans un esprit de triangulation méthodologique.

### Résultats

1. une connaissance plus approfondie des systèmes de représentations et pratiques mis en jeu dans les positions adoptées vis-à-vis de l'IAD par une population directement impliquée et peu étudiée en France.
2. une compréhension des écarts observés dans la littérature scientifique internationale entre les possibilités offertes par les cadres législatifs, les intentions parentales et le devenir effectif du récit de conception proposé.
3. une toute première étude des préconisations des Etats généraux de bioéthique en matière de dons de gamètes.

### Publications :

1. Haas V, Kalampalikis N. Triangulation méthodologique à partir de l'énigme du don de sperme. 2010;59-73.
2. Kalampalikis N, Haas V, Fieulaine N, Doumergue M, Deschamps G, Chiron H. Enjeux psychosociaux du don de sperme: le point de vue des couples. Androl. 24 févr 2010;20(1):37-44.
3. Kalampalikis N, Doumergue M, Haas V, Fieulaine N. Enjeux bioéthiques et psychosociaux du don de sperme. Une recherche nationale. Carnets du GRePS. 2012;(4):20-5.
4. Kalampalikis N, Haas V, Fieulaine N, Doumergue M, Deschamps G. Giving or giving back: New psychosocial insights from sperm donors in France. Psychology, Health & Medicine. 1 janv 2013;18(1):1-9.

## Recherche de gènes impliqués dans l'infertilité humaine non syndromique

**Stéphane VIVILLE** (IGBMC, Strasbourg)

Un nombre croissant de couples fait appel à l'assistance médicale à la procréation et 1 à 3.6 % des grossesses dans les pays occidentaux sont obtenues grâce à ces techniques d'AMP<sup>1</sup>. Pour plus de la moitié de ces couples, la cause des dysfonctionnements à l'origine de l'infertilité reste inconnue et la FIV est souvent proposée de façon systématique sans connaître l'étiologie de cette infertilité, ce qui n'est pas satisfaisant. Nous proposons donc dans cette étude d'identifier et de caractériser des gènes impliqués dans des cas supposés génétiques d'infertilité humaine permettant ainsi une meilleure prise en charge des couples en AMP.

L'objectif de cette étude est de sélectionner dans le génome d'hommes et de femmes infertiles issus de familles infertiles consanguines ou originaires d'une même région géographique, une région d'homozygotie. L'origine géographique commune des patients nous laisse espérer qu'un même événement génétique ancestral est responsable du phénotype observé (effet fondateur). Le fait que plusieurs individus atteints soient issus de germains plaide en faveur d'une transmission sur un mode autosomique récessif, les individus atteints auraient hérité de chacun de leurs parents d'une même copie de l'allèle morbide arrière-grand paternel ou maternel. Les individus atteints présenteront donc une région d'homozygotie au locus morbide. Une étude *in silico* des gènes présents dans cette région nous permettra de sélectionner des gènes candidats : en priorité des gènes impliqués dans la méiose et exprimés préférentiellement dans les gonades. Les étapes suivantes de l'étude consisteront à séquencer l'ensemble des exons/jonctions intron-exon du /des gènes candidats afin d'identifier la ou les mutations causales. Enfin, pour confirmer que le gène identifié est bien responsable du phénotype d'infertilité, une étude fonctionnelle est nécessaire ; en raison de la difficulté d'atteinte de la protéine (gonadique exclusive ou préférentiellement), un recours à des modèles

### Publications :

1. Koscinski I, Ellnati E, Fossard C, Redin C, Muller J, Velez de la Calle J, et al. DPY19L2 Deletion as a Major Cause of Globozoospermia. *The American Journal of Human Genetics*. 11 mars 2011;88(3):344-50.
2. Ellnati E, Kuentz P, Redin C, Jaber S, Meerschaut FV, Makarian J, et al. Globozoospermia is mainly due to DPY19L2 deletion via non-allelic homologous recombination involving two recombination hotspots. *Hum Mol Genet*. 15 août 2012;21(16):3695-702.
3. El Inati E, Muller J, Viville S. Autosomal mutations and human spermatogenic failure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. déc 2012;1822(12):1873-9.

## **Intérêt de la stratégie de transfert au stade zygotique, en fécondation in vitro (FIV/ICSI), pour les couples présentant une fragmentation précoce massive et récurrente de leurs embryons**

**Vanina DE LAROUZIERE** (Histologie, Biologie de la Reproduction, CECOS, hôpital Tenon)

La qualité des embryons obtenus en FIV (Fécondation In Vitro) est évaluée essentiellement sur des critères morphologiques et cinétiques, avant le transfert in utero qui se fait habituellement au deuxième (J2) ou troisième jour (J3) du développement embryonnaire. Les embryons de qualité satisfaisante qui n'ont pas été transférés, pour éviter le risque de grossesse multiple, sont congelés pour un transfert ultérieur. Parmi ces critères morpho-cinétiques, la fragmentation de l'embryon est un marqueur incontournable de qualité, inversement corrélée à son devenir. Or, 3% des couples présentent de façon imprévisible et récurrente une fragmentation précoce de la majorité de leurs embryons, aboutissant à une absence de transfert ou un échec d'implantation. Il a été montré dans certains modèles animaux que les facteurs régulateurs de mort cellulaire et de réponse au stress d'origine maternelle jouent un rôle crucial dans le développement embryonnaire précoce.

Nous avons alors fait l'hypothèse que les embryons de ces couples subissent de façon excessive les effets délétères des conditions de culture in vitro et, de ce fait, sont incapables de se développer normalement dans les conditions classiques de l'AMP. Nous proposons d'appliquer à ces couples une stratégie de transfert précoce à J1 au stade zygotique (ovocyte fécondé au stade des deux pronuclei ou 2PN) afin de soustraire leurs zygotes à l'effet potentiellement délétère de l'environnement in vitro. Les zygotes non transférés seront cultivés jusqu'à J2 pour valider le phénotype de fragmentation. Ceux qui échapperaient à cette fragmentation et évolueraient en embryons clivés de qualité satisfaisante seront congelés à J2.

Une étude préliminaire prospective non contrôlée, a été menée sur 53 couples présentant en moyenne 2.8 échecs de FIV/ICSI, associés à 50% de zygotes ou d'embryons massivement fragmentés et moins de 3% d'embryons de qualité optimale (« top embryos »). Quatorze grossesses cliniques ont résulté du premier transfert au stade zygotique, dont 10 évolutives avec naissance de 11 enfants en bonne santé, soit des taux de grossesse et d'accouchement respectivement de 26.4 % et 18.9 % par transfert. Ainsi, alors que chez ces couples, aucune grossesse n'avait été obtenue au cours de 147 tentatives précédentes aboutissant à 121 transferts au stade d'embryon clivé (Jour 2 ou 3 du développement embryonnaire), près de 20% des mêmes couples ont obtenu 1 enfant en 1 tentative de transfert zygotique.

## Etude de la méthylation de la région 11p15 au cours du développement chez l'homme : tissus fœtaux et diagnostic anténatal de Syndrome de Silver Russell ou Wiedemann-Beckwith

**Irène NETCHINE** (Laboratoire de biologie moléculaire endocrinienne, INSERM U938, hôpital Armand Trousseau)

### Objectifs

La région 11p15 chez l'homme est l'une des régions soumises à empreinte parentale très importante durant la vie foetale chez l'homme. Elle comporte des gènes essentiels pour la prolifération et le cycle cellulaire KCNQ1OT1, CDKN1C (ICR2, domaine centromérique) et IGF2, H19 (ICR1, domaine télomérique). Les troubles d'empreinte (LOI) de cette région telle que perte (LOM) ou gain (GOM) de méthylation sont en cause dans deux syndromes cliniquement opposés, le syndrome de Wiedemann-Beckwith (SBW) et le syndrome de Silver-Russell (SRS). Ces LOI se produisent le plus souvent en mosaïque ce qui rend leur détection avec les méthodes d'analyse conventionnelles très difficile. Les syndromes de SRS et BWS se caractérisent par une hétérogénéité clinique complexe qui peut être expliquée par l'aspect en mosaïque des LOI de la région 11p15 pouvant être différent d'un tissu à un autre.

Ces LOI se produisent très tôt durant le développement fœtal et affectent ainsi le devenir du futur individu. A ce jour aucune étude exhaustive du pattern de méthylation de la région 11p15 n'a été réalisée chez l'homme. Or cette étude peut permettre d'avancer dans la compréhension de la physiopathologie du SRS et SBW. Beaucoup d'études ont été néanmoins réalisées chez la souris et les résultats sont extrapolés chez l'humain. Par ailleurs, le diagnostic anténatal (DPN), réalisé sur l'ADN extrait à partir d'échantillons biologiques fœtaux, permet la recherche de causes moléculaires de certaines maladies graves in utero. A ce jour, le DPN moléculaire des anomalies de méthylation de la région 11p15 pour les suspicions de SRS ou de SBW, n'est pas disponible.

Notre objectif à travers ce projet est donc d'étudier la méthylation différentielle de la région 11p15 dans différents tissus fœtaux normaux et pathologiques de façon aussi exhaustive que possible pour comprendre la physiopathologie complexe du SRS et SBW. Par ailleurs, le développement d'un diagnostic anténatal devient une nécessité pour répondre aux demandes croissantes de ce type de test pour lequel nous sommes de plus en plus sollicités en tant que le centre de référence en France du suivi médical et de l'analyse moléculaire de ces deux syndromes.

### Résultats attendus

Des profils de méthylation différents de la région 11p15 peuvent être identifiés dans les différents tissus fœtaux normaux ou pathologiques qui seront analysés. Ces résultats aideront dans la compréhension de la physiopathologie du SRS et SBW. Par ailleurs, la mise au point du DPN moléculaire de la région 11p15 sur l'ADN amniocytaire nous permettra d'offrir un outil de diagnostic pour le dépistage du SRS et SBW *in utero*.

### Méthodes

L'étude de la méthylation différentielle de la région 11p15 (ICR1 et ICR2) sera réalisée grâce à la technique quantitative, allele specific methylated multiplex real time quantitative PCR (ASMM RTQ-PCR) que nous avons récemment développée et validée au laboratoire, rendant possible une exploration moléculaire y compris sur une faible quantité d'ADN.

### Publications :

1. Azzi S, Blaise A, Steunou V, Harbison MD, Salem J, Brioude F, et al. Complex Tissue-Specific Epigenotypes in Russell-Silver Syndrome Associated with 11p15 ICR1 Hypomethylation. *Human Mutation*. oct 2014;35(10):1211-20.

2. Azzi S, Steunou V, Tost J, Rossignol S, Thibaud N, Neves CD, et al. Exhaustive methylation analysis revealed uneven profiles of methylation at IGF2/ICR1/H19 11p15 loci in Russell Silver syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 1 janv 2015;52(1):53-60.

## Génotypage de patientes infertiles pour un nouveau facteur de survie maternel. Etude cas-témoins multicentrique

**Jean-François GUERIN** (Service de médecine de la reproduction, Hôpital femme-mère-enfant, Bron)

### Objectifs

Des signes d'apoptose, une forme de suicide cellulaire programmé, ont été décrits dans les ovocytes et l'embryon préimplantatoire à la fois in vitro et in vivo. En dépit de leur rôle crucial, les processus de mort cellulaire restent mal caractérisés dans ces tissus, notamment au niveau de leur contrôle génétique. Les régulateurs d'apoptose appartenant à la famille Bcl-2 occupent une place centrale dans les voies de décision de vie ou de mort cellulaire. Parmi ses membres, le facteur de survie Bcl2l10 est spécifiquement exprimé dans les ovocytes et l'embryon précoce humain. Le but du projet est d'étudier la variabilité génétique le long du gène Bcl2l10 chez des femmes fertiles et infertiles

### Résultats attendus

Nous déterminerons si certaines variations alléliques détectées sur Bcl2l10 sont corrélées à l'infertilité féminine. Les effets possibles des variations observées sur l'expression du gène Bcl2l10 ou sur la fonction de son produit seront prédits, ouvrant la voie à des études fonctionnelles.

### Méthodologie

Etude multicentrique de type cas – témoins portant sur des populations de femmes fertiles et infertiles. Séquençage moléculaire et analyse des séquences. Construction et test fonctionnel d'une protéine mutante recombinante.

## Allogreffe utérine chez la brebis

**Tristan GAUTHIER** (Service de Gynécologie-Obstétrique Hôpital Mère Enfant, CHU LIMOGES)

Actuellement, les patientes ayant une absence d'utérus acquise ou congénitale ou des synéchies utérines complètes et désireuses d'un enfant ont comme seules solutions l'adoption ou la grossesse de substitution. Cette dernière, autorisée dans certains pays, est interdite en France. La greffe d'utérus pourrait être une alternative intéressante chez les patientes ayant une infertilité utérine et souhaitant mener une grossesse. Les allogreffes utérines pratiquées sur le porc, la brebis et le singe sont peu nombreuses dans la littérature. A ce jour aucune grossesse après allogreffe utérine n'a été décrite excepté chez les souris syngéniques.

**Objectifs** : Après avoir étudié la greffe ovarienne chez la brebis et la femme, nous désirons montrer la faisabilité chez la brebis d'une allogreffe utérine orthotopique associée à une immunosuppression optimale avec épargne en corticoïdes. L'objectif à terme est l'obtention de grossesse sur utérus greffé.

**Résultats attendus** : Nous prévoyons la réalisation de 10 transplantations utérines orthotopiques. Nous espérons un taux survie du greffon supérieur à 90 % avec le protocole immunosuppresseur. A 6 mois minimum du geste, les brebis seront inséminées. Nous espérons ainsi obtenir les premières grossesses après allogreffe utérines orthotopiques.

**Méthodologie** : Un prélèvement utérin avec les annexes et un large patch vasculaire sera réalisé chez la brebis donneuse sous anesthésie générale suivi d'euthanasie. La greffe orthotopique avec macroanastomoses vasculaires sera réalisée chez la brebis receveuse dans les suites immédiates du prélèvement de façon à réduire le temps d'ischémie froide. 10 greffes seront réalisées impliquant 10 brebis donneuses euthanasiées et 10 brebis receveuses.

Chaque greffe sera suivie d'un protocole d'immunosuppression comportant une induction par anticorps monoclonal anti-IL2, une association cyclosporine et mycophénolate mofetil et une corticothérapie brève sur 7 jours. Une artériographie sera réalisée à 8 semaines de chaque greffe afin contrôler la vascularisation utérine. A 3 mois de la greffe, une laparotomie exploratrice permettra l'analyse macroscopique du greffon. Une analyse histologique y sera systématiquement associée. A 6 mois de la transplantation et après stabilité du greffon, une substitution du mycophénolate, tératogène, par de l'azathioprine sera effectuée avant d'envisager une insémination de l'utérus greffé.

### Publication :

Gauthier T, Marquet P, Kanoun D, Maubon A, Piver P, Couquet C, et al. Pelvic magnetic resonance imaging in the ewe: A model for experimental gynecologic research: Pelvic MRI in the ewe. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. janv 2014;40(1):133-8.

## Identification de marqueurs protéiques de la lignée germinale testiculaire dans le plasma séminal humain par une approche Omique combinatoire

**Charles PINEAU** (Unité Inserm 625)

L'ICSI (intracytoplasmic sperm injection) est proposée aux couples infertiles souhaitant procréer dans les cas d'azoospermie non obstructive (NOA) chez le partenaire masculin. Ses chances de succès dépendent avant tout de la possibilité de récupérer des spermatozoïdes à partir de fragments de biopsies testiculaires. Malheureusement, il n'existe à ce jour aucune méthode permettant de prédire avec un fort degré de confiance la présence de cellules germinales post-méiotiques dans les testicules avant intervention chirurgicale, ce qui explique le taux extrêmement important de biopsies négatives.

**Objectifs :** Notre étude a pour objectif de vérifier si des biomarqueurs protéiques spécifiques des cellules germinales post-méiotiques peuvent être détectés dans le plasma séminal humain. Ces biomarqueurs pourraient être utilisés avec pertinence pour proposer une biopsie testiculaire seulement aux patients chez lesquels il y a de très hautes probabilités d'obtenir des spermatozoïdes après l'intervention chirurgicale.

**Résultats attendus :** Cette étude devrait permettre : 1) d'améliorer notre connaissance sur le protéome du plasma séminal humain chez l'homme fertile sain et chez les patients présentant des étiologies distinctes d'azoospermie; et 2) l'identification de biomarqueurs protéiques dont la présence dans le plasma séminal sera utilisée comme un indicateur prédictif fort de la probabilité de récupérer des spermatozoïdes vivant à partir de fragments de biopsies testiculaires.

**Méthodologie :** 500mg de protéines issues d'un pool de plasma séminal non-liquéfié provenant de donneurs sains seront pré-fractionnés sur deux chimiothèques de ligands hexapeptidiques (Proteominer™). En conditions de surcharge, les protéines fortement exprimées seront théoriquement diluées tandis que les protéines à faible nombre de copies seront concentrées. Les protéines adsorbées seront éluées sous 4 conditions différentes, produisant 8 sous-protéomes complémentaires. Chaque fraction sera digérée à la trypsine et injectée dans un spectromètre de masse LTQ-ORBITRAP™ XL en vue de l'identification de protéines à l'aide d'un algorithme innovant de « liste d'exclusion dynamique ». La liste de protéines identifiées sera comparée, fusionnée et complétée avec différents jeux de données déjà publiés de protéines du plasma séminal humain, conduisant à une liste de protéines uniques non-redondantes.

Une analyse de profilage tissulaire utilisant des données d'expression Affymetrix sera utilisée pour cribler l'ensemble de données protéiques et identifier des biomarqueurs fonctionnels potentiellement spécifiques pour chacun des organes participant dans la composition de protéique du plasma séminal (testicule, épидидyme, vésicules séminales et prostate). Dans le présent projet, la priorité sera donnée aux protéines spécifiques de la présence dans le testicule de cellules germinales méiotiques et post-méiotiques. La spécificité de ces biomarqueurs germinaux sera validée sur des plasmas séminaux normaux et pathologiques (NOA, agénésie bilatérale des canaux déférents, syndrome Sertoli-cell only, post-vasectomie) par des techniques de biochimie conventionnelles (e.g. Western blot). Une étude Pilote a démontré que l'approche « Omique combinatoire » est un outil puissant pour identifier des marqueurs biologiques pertinents à partir de fluides biologiques complexes sans avoir besoin de recourir aux lourdes et coûteuses approches de protéomique différentielle.

### **Publications :**

1. Freour T, Com E, Barriere P, Bouchot O, Jean M, Masson D, et al. Comparative proteomic analysis coupled with conventional protein assay as a strategy to identify predictors of successful testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia. *Andrology*. 1 mai 2013;1(3):414-20.

2. Rolland AD, Lavigne R, Dauly C, Calvel P, Kervarrec C, Freour T, et al. Identification of genital tract markers in the human seminal plasma using an integrative genomics approach. *Human Reproduction*. 1 janv 2013;28(1):199-209.

## NR5A1 et l'infertilité

**Anu BASHAMBOO** (Institut Pasteur)

NR5A1 (également appelé SF-1), membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, est un régulateur de la transcription des gènes clés impliqués dans l'axe hypothalamo-hypophysio-stéroïdogène. Nous avons identifié plusieurs mutations dans le gène *NR5A1* associées à certains phénotypes d'infertilité humaine : insuffisance ovarienne primaire et infertilité masculine. Ces mutations sont peut-être la cause génétique la plus importante de ces phénotypes. Cette proposition vise à comprendre le mécanisme par lequel ces mutations sont associées à ces phénotypes. Pour y parvenir, nous allons analyser les propriétés biochimiques et fonctionnelles des protéines mutées en analysant leur capacité à subir des modifications post-traductionnelles, ainsi que leur capacité à se lier à des éléments connus de régulation, en synergie avec les cofacteurs de transactivation de gènes cibles. La capacité de chacune des protéines mutées qui vont directement interagir physiquement avec des cofacteurs spécifiques, notamment l'ARN non codant SRA, sera étudiée. Ces données seront utilisées pour déterminer le mécanisme par lequel des mutations de *NR5A1* entraînent une défaillance des ovaires et de la spermatogenèse et permettront d'identifier les autres facteurs génétiques responsables d'infertilité.

### **Publication :**

Bashamboo A, Ferraz-de-Souza B, Lourenço D, Lin L, Sebire NJ, Montjean D, et al. Human Male Infertility Associated with Mutations in NR5A1 Encoding Steroidogenic Factor 1. The American Journal of Human Genetics. oct 2010;87(4):505-12.

## Diagnostic par puces à ADN des aneuploïdies fœtales à partir du sang maternel

**Jean-Michel DUPONT** (Institut Cochin - INSERM U 567)

La technique de référence pour le diagnostic prénatal des anomalies chromosomiques est aujourd'hui encore le caryotype réalisé après prélèvement invasif de matériel biologique fœtal, le plus souvent une amniocentèse. Cette approche qui offre une excellente fiabilité présente cependant l'inconvénient d'un risque de perte foetale qui en limite l'utilisation aux situations les plus à risque. La mise au point d'une méthodologie fiable et reproductible de diagnostic non invasif des aneuploïdies fœtales se heurte depuis de nombreuses années à l'impossibilité d'isoler de manière spécifique le matériel biologique fœtal présent dans le sang maternel, qu'il s'agisse de cellules ou d'ADN libre circulant. Notre objectif est de contourner cette étape de tri et d'enrichissement et de mettre à profit la technologie des puces à ADN pour réaliser une analyse pan génomique de l'ADN libre circulant dans le sang maternel afin de détecter une aneuploïdie foetale. Notre projet repose sur l'utilisation de puces SNP qui, par leur capacité à identifier les allèles présents dans un échantillon d'ADN, nous permettront d'identifier les allèles fœtaux en comparant les allèles présents dans les lymphocytes maternels (ADN maternel uniquement) et dans le plasma (ADN fœtal + ADN maternel). Au niveau de ces allèles fœtaux, l'analyse du ratio d'intensité de fluorescence entre allèle paternel et allèle maternel et sa comparaison après normalisation pour le chromosome entier avec le reste des chromosomes devrait nous permettre d'en déduire le nombre d'exemplaire de chaque paire. Une première étude de faisabilité a été réalisé en mélangeant de l'ADN fœtal trisomique pour le chromosome 21 à de l'ADN lymphocytaire de sa mère dans une proportion de 20% / 80% qui reflète la situation in vivo. L'analyse des intensités de fluorescence montre une variation significative du ratio pour les marqueurs du chromosome 21 par rapport à ceux des autres chromosomes prouvant ainsi la validité de l'approche.

Les objectifs du projet de recherche sont d'une part d'évaluer la faisabilité de l'analyse à partir d'ADN fœtal circulant dont la qualité est moins bonne que l'ADN lymphocytaire utilisé dans l'étude préliminaire et d'autre part d'analyser le sang de 30 femmes enceintes dont le caryotype fœtal a été obtenu par ailleurs.

# Appel d'Offres

## « AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique »



### SNP microarray and digital PCR as alternatives to NGS in non invasive prenatal testing for fetal aneuploidies : a feasibility study



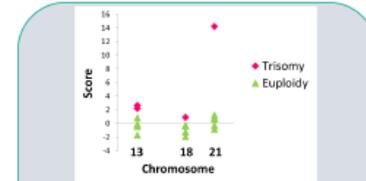
Laïla El Khattabi<sup>1,2</sup>, Nicolas Cagnard<sup>1,3</sup>, Aurélie Coussement<sup>2</sup>, Nathalie Le Dû<sup>2</sup>, Valérie Serazin<sup>4,5</sup>, Aziza Lebbar<sup>2</sup>, Christelle Le Sciellour<sup>4</sup>, Fatma Abdelhedi<sup>2</sup>, Franck Letourneur<sup>1</sup>, Vassilis Tsatsaris<sup>6</sup>, François Vialard<sup>4,5</sup>, Jean-Michel Dupont<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U1016, Institut Cochin, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, Paris, France, <sup>2</sup>Laboratoire de Cytogénétique, CHU Cochin-Maternité Port-Royal, AP-HP, Paris, <sup>3</sup>Plateforme de Bioinformatique, Université Paris Descartes, Paris, <sup>4</sup>Fédération de Génétique, CHI de Poissy St Germain, <sup>5</sup>Faculté des Sciences de la Santé, UVSQ, Versailles, <sup>6</sup>Département d'Obstétrique et de Gynécologie, CHU Cochin, Université Paris Descartes, Paris.

E-mail: laila.el-khattabi@cch.aphp.fr, laila.el-khattabi@inserm.fr

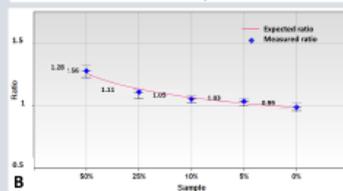
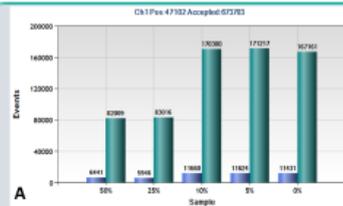
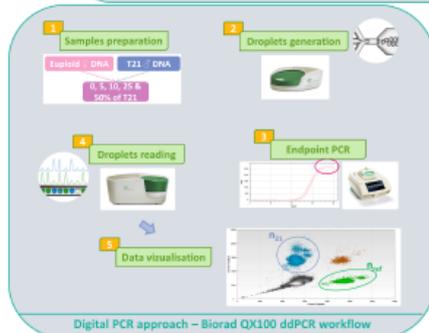
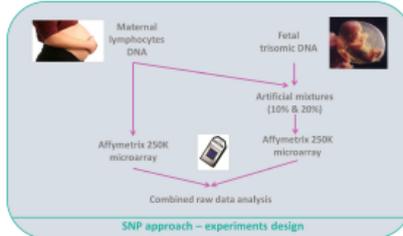
**Objectives:** Most of works on Non Invasive Prenatal Testing (NIPT) for fetal aneuploidies were based on Next Generation Sequencing (NGS) resulting in a commercial screening test available in USA and some European countries. NGS proved to be highly sensitive and specific in published series of high risk pregnancies but its use of NGS in large population is limited because of the complexity of the workflow, the excessive cost and ethical concerns. Hence, we sought to develop new approaches either based on SNO allelic ratio or digital PCR (dPCR), but no clinical study has been based on yet, because of technical limitations. We aimed to adjust the use of SNP array and digital droplet PCR (ddPCR) to set up a targeted test with easier and quicker technical and bioinformatic workflow ending with a reduced cost.

### Results



SNP approach – 6 samples (3 euploid, 1 T18, 1 T21 & 2 T13) have been analyzed using an inhouse algorithm. Each chromosome has been scored based on allelic ratio.

### Methods



Results of ddPCR for chromosome 21 - A. Number of accepted droplets. Each sample (0%, 5%, 10%, 25% and 50% of T21). Each sample is characterized by  $n_{11}$ =all droplets (green) and  $n_{21}$ =droplets positive for chromosome 21 (blue). B. Chromosomal ratio (chromosome 21/reference) obtained for each sample after Poisson correction. The curve in pink represents the expected ratio.

**Conclusions:** The Non invasive prenatal testing of foetal aneuploidies is possible by two original ways:

- by diverting the use of SNP microarray technology (We used whole genome SNP arrays and developed an algorithm integrating information of maternal and plasmatic DNA for all SNPs without needing the identification of paternal alleles). We are now validating our algorithm on a new microarray (OncoScan FFPE<sup>®</sup>, Affymetrix) using Molecular Inversion Probe technology which fits well with the fragmented and small amounts of cfDNA.
- by a molecular counting high sensitive technology ddPCR (We took advantage of a newly available ddPCR platform to design an optimized PCR assay giving the required positive events to distinguish between a ratio of 1 and 1.025)

Our results show that these approaches have a potential to meet the requirements for aneuploidy NIPT. We are conducting now a validation study on plasmatic DNA from high risk pregnancies to test their accuracy.

## Evaluation médico-économique de 3 différentes puces à ADN dans le cadre du diagnostic prénatal

**Pierre SARDA** (Département de génétique médicale, hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier)

Le dépistage des maladies génétique avec handicap, en particulier avec un retard psychomoteur, constitue un enjeu majeur de santé publique. Le diagnostic prénatal de ces pathologies est extrêmement important et leur étiologie génétique difficile à identifier. Une anomalie chromosomique est retrouvée dans environ 10% des caryotypes fœtaux réalisés pour anomalie(s) échographique(s) et ce taux varie selon la ou les malformations constatées. Un caryotype fœtal normal ne permet pas d'éliminer une cause chromosomique, de plus en plus d'anomalies cryptiques (microremaniements) indétectables sur un caryotype classique étant décrites. Pour pallier cette insuffisance du caryotype à identifier plus d'anomalies chromosomiques lors d'un diagnostic prénatal, se développe depuis quelques années une nouvelle technique utilisant des puces à ADN. Cette méthode a révolutionné la génétique clinique et la cytogénétique car elle offre une meilleure résolution et permet de détecter plus d'anomalies chromosomiques que la cytogénétique classique. Son utilisation pour le diagnostic prénatal est encore limitée à quelques équipes et il n'y a pas encore eu d'évaluation des différentes puces disponibles sur le marché.

Notre projet actuel a pour objectifs :

1. de comparer 2 nouvelles puces à ADN, Cytogenetics Focused Array (Affymetrix) et 60K (Agilent), entre elles et avec notre puce de référence « GeneChip® Human Mapping 6.0 Set » (Affymetrix) pour la mise en évidence de déséquilibres chromosomiques (CNV) dans le cadre du diagnostic prénatal,
2. de comparer leur facilité d'utilisation (protocole, temps techniques, rendu du résultat),
3. d'évaluer leur coût dans le cadre du diagnostic prénatal.

Nous espérons ainsi doubler, par rapport au caryotype fœtal seul, le pourcentage d'anomalies chromosomiques identifiées en diagnostic prénatal pour malformations fœtales.

Dans une étude précédente, nous avons étudié la faisabilité de la réalisation d'un diagnostic prénatal des microremaniements chromosomiques chez des fœtus présentant au moins deux malformations dépistées lors d'une échographie obstétricale par la technique d'hybridation génomique sur puces à ADN. Nous utiliserons les ADN de cette étude et les résultats obtenus (puce de référence) pour comparer les nouvelles puces entre elles (concordance des résultats, facilité et simplicité technique, coût). Nous évaluerons également le délai de rendu des résultats, qui ne devrait pas être supérieur à celui du caryotype fœtal.

## Reprogrammation chromatinienne de l'embryon vue par les techniques de micro-ChIP dans le modèle murin

**Déborah BOURC'HIS** (Equipe « Décisions épigénétiques et reproduction chez les mammifères », Institut Curie)

Les évènements de différenciation inhérents au développement sont initiés par des facteurs de transcription ayant une spécificité de séquence, et sont maintenus par des modifications épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. Le développement précoce des mammifères se caractérise par un remaniement drastique des profils épigénétiques hérités des gamètes. Cette reprogrammation est essentielle à l'acquisition d'un état de pluripotence à l'origine de la capacité de l'embryon à former une pléthore d'identités cellulaires. Elle est aussi impliquée dans la première décision de lignage de l'embryon, qui consiste à maintenir un état embryonnaire pluripotent ou à former le trophoctoderme à l'origine des tissus extraembryonnaires. Malgré l'importance de ce phénomène, la cinétique développementale, les cibles et les effets transcriptionnels de ces remaniements épigénétiques sont mal connus. Les études de profils de méthylation de l'ADN ont révélé une déméthylation massive des éléments transposables (TE) et de gènes de pluripotence de la fécondation à l'implantation, puis une reméthylation des TE dans la phase suivante. En revanche, les données quant aux modifications d'histones sont plus parcellaires et les quelques études cytologiques menées sur des embryons préimplantatoires ne donnent qu'une information nucléaire globale. La plupart des effets corrélatifs entre profils chromatinien, statut transcriptionnel et pluripotence ont été étudiés *in vitro* sur des cellules ES. La difficulté d'étudier la conformation chromatinienne de séquences particulières sur une quantité réduite de matériel a limité jusqu'à présent l'analyse des embryons très précoces.

Nous proposons de développer au laboratoire une méthode d'immunoprécipitation de chromatine spécialement adaptée à un nombre limité de cellules (micro-ChIP), dans le but de comprendre la spécificité, la cinétique et la fonction des remaniements des profils d'histones des embryons préimplantatoires. Cette technique sera validée dans le modèle murin, par l'étude des éléments transposables qui subissent une relaxation épigénétique dans les cellules pluripotentes. Nous utiliserons les TE comme marqueurs de la reprogrammation de l'embryon, en corrélation avec leur taux d'expression. Leur statut hautement répété devrait améliorer le seuil de détection de la micro-ChIP. L'étude de ces séquences a de plus un intérêt immédiat en pathologie puisque ces éléments mobiles peuvent perturber l'architecture et la transcription des gènes. Ce projet fournira des données originales et importantes sur les liens entre profils épigénétiques, pluripotence et protection du génome. Il représente de plus un préalable indispensable à l'étude d'embryons humains pour lesquels les relations entre épigénétique et potentiel développemental sont quasiment inconnus.

## Amélioration de la valeur prédictive de l'hormone anti-Müllérienne (AMH) en AMP

**Nathalie DI CLEMENTE-RENAULD-BESSE** (INSERM U782 PARIS XI)

L'hormone anti-Müllérienne (AMH) *Müllerian inhibiting substance* est un membre de la famille du *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) dont le rôle de plus connu est d'induire la régression des canaux de Müller, les ébauches des trompes et de l'utérus, chez le fœtus mâle. Chez la femelle où l'AMH est exprimée par les follicules en croissance, elle intervient dans le contrôle du recrutement des follicules primordiaux et leur maturation. Ces dernières années, son dosage s'est beaucoup développé en gynécologie. L'AMH sérique est un bon marqueur des tumeurs des cellules de la granulosa et de l'efficacité de leur traitement. Elle est surtout devenue un outil très précieux en Médecine de la Reproduction pour évaluer la réserve folliculaire d'une femme et la capacité de ses ovaires à être stimulés. L'objectif de ce projet est d'améliorer la valeur prédictive de l'AMH en AMP. Plus précisément, nous étudierons 1/ si la mesure de l'activité biologique de l'AMH ne serait pas plus pertinente, question qui n'a jamais été soulevée jusqu'à présent, 2/ comment l'AMH pourrait être un marqueur de la qualité embryonnaire et 3/ quel serait le rôle de l'AMH dans le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), qui est une des principales cause d'infertilité chez les femmes en âge de procréer. En effet, l'AMH doit être clivée pour être active mais on ne connaît pas la proportion d'AMH clivée dans le sérum et le liquide folliculaire. Nous prévoyons donc de la déterminer par des expériences d'immunoprécipitation suivies d'une analyse par western-blotting. Puis nous étudierons l'activité biologique de l'AMH dans ces fluides à l'aide d'un test sur plaque que nous venons de mettre au point au laboratoire. Nous chercherons également à confirmer que l'AMH est marqueur de la qualité embryonnaire dans les cycles semi-naturels, mais aussi dans les cycles stimulés. Nous étudierons pour cela le lien entre l'activité biologique de l'AMH folliculaire, la production d'AMH par les cellules de la granulosa et le taux de grossesses. Enfin nous poursuivrons l'exploration du rôle de l'AMH dans le SOPK, en mettant en culture des cellules de la granulosa obtenues après ponction et en étudiant leur réponse à différents stimuli.

### **Publication :**

Pierre A, Estienne A, Racine C, Picard J-Y, Fanchin R, Lahoz B, et al. The Bone Morphogenetic Protein 15 Up-Regulates the Anti-Müllerian Hormone Receptor Expression in Granulosa Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 12 avr 2016;101(6):2602-11.

# Appel d'Offres « AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique »

## Amélioration de la valeur prédictive de l'hormone anti-Müllérienne (AMH) en AMP

Nathalie Di Clemente<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U782, 32 rue des Carnets, Clamart F-92140, France

<sup>2</sup>Univ Paris-Sud, UMR-S0782, Clamart F-92140, France

<sup>3</sup>AP-HP, Service de Biochimie Hormonologie Gynécologie Obstétrique, Hôpital Antoine Bécclère, Clamart F-92140, France

### Objectifs

L'AMH est exprimée chez la femelle par les cellules de la granulosa (CGs) des follicules en croissance. Elle inhibe le recrutement des follicules primordiaux et leur maturation.

Ces dernières années, son dosage s'est beaucoup développé en gynécologie car il est un outil très précieux en Médecine de la Reproduction pour évaluer la réserve folliculaire d'une femme et la capacité de ses ovaires à être stimulés.

Ce projet de recherche a eu pour objectifs d'étudier:

1. si la mesure de l'activité biologique de l'AMH ne serait pas plus pertinente que le dosage de l'AMH.
2. le rôle de l'AMH dans le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), la principale cause d'infertilité chez les femmes en âge de procréer, qui est caractérisée par des taux d'AMH sériques et folliculaires élevés et par un grand nombre de follicules immatures.

### Méthodologie

- 1) Mesure des formes biologiquement actives de l'AMH dans le liquide folliculaire et le serum, et comparaison avec les différentes formes d'AMH présentes dans ces fluides biologiques:

Mesure des formes biologiquement actives de l'AMH par le test que nous avons mis au point (di Clemente et al., 2010) et dont nous avons récemment amélioré la sensibilité.

Ce dosage consiste à fixer un anticorps anti-AMH sur une plaque ELISA, d'y ajouter l'AMH, puis une protéine de fusion constituée de la partie extracellulaire du récepteur spécifique de l'AMH humain (AMHR-II) couplée à la partie Fc des immunoglobulines (AMHR-II-Fc) et un anticorps contre les IgG humaines couplé à l'HRP. Par comparaison avec la quantité totale d'AMH, nous avons déterminé le % d'AMH bioactive dans différents liquides folliculaires (399, 400, 208, 3) et sera (mâle et femelle). Puis nous avons comparé ce résultat aux différentes formes d'AMH détectées dans les mêmes échantillons par immunoprécipitation et western-blotting.

- 2) Rôle de l'AMH dans le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) Après avoir montré que l'AMH et l'AMHR-II étaient surexprimés par les CGs des femmes SOPK (Catteau-Jonard et al., 2008), nous avons voulu en comprendre la raison.

Pour cela, nous avons étudié si la régulation de l'AMH et de l'AMHR-II par les gonadotropines était différente dans des cultures de CGs obtenues après ponction de femmes normo-ovulantes et de femmes SOPK normo-ovulantes ou dysovulantes.

Nous avons testé l'effet d'un traitement de 48 h par la FSH ou la LH sur la synthèse et les ARNm de l'AMH et de l'AMHR-II par RT-qPCR.

### Résultats

- 1) Mesure des formes biologiquement actives de l'AMH:

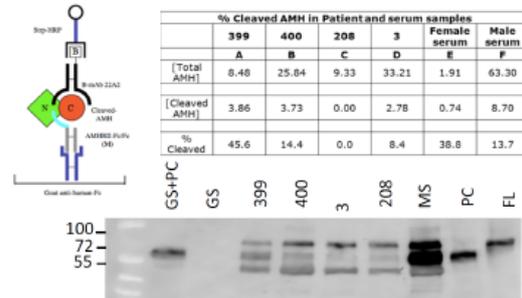


Figure 1: Pourcentage de formes actives de l'AMH présentes dans le liquide folliculaire (femmes 399, 400, 3, 208) ou le serum déterminée avec le dosage, et comparaison avec la proportion des différentes formes d'AMH détectée par immunoprécipitation et western-blotting. S : serum, G : goat, F : serum féminin, M : serum masculin, PC : AMH clivée, FL : AMH non clivée.

Nous trouvons une bonne corrélation entre le % de formes bioactives de l'AMH et celui de la forme clivée de l'AMH(PC).

- 2) Rôle de l'AMH dans le syndrome des ovaires polykystiques

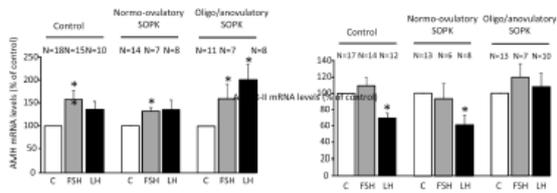


Figure 2: Effet de la FSH et de la LH sur l'expression des ARNm de l'AMH et de l'AMHR-II par des CGs de femmes contrôles, SOPK normo-ovulantes et SOPK dysovulantes.

Nous avons mis en évidence un effet stimulateur de la FSH sur l'expression de l'AMH dans les 3 groupes de femmes mais un effet stimulateur de la LH uniquement sur les CGs de femmes SOPK dysovulantes. Concernant l'expression de l'AMHR-II, nous

avons montré qu'elle était inhibée dans les CGs des femmes contrôles et SOPK normo-ovulantes par la LH, alors que cette hormone n'a pas d'effet sur les CGs des femmes SOPK dysovulantes. Ce travail a été publié dans Human Reproduction en 2013 (Pierre et al., 2013).

### Conclusion

Nous avons amélioré la sensibilité de notre dosage des formes biologiquement actives de l'AMH et montré que ce qui est mesuré correspond bien à de l'AMH clivée. Nous pouvons donc envisager à présent de comparer le % de formes biologiquement actives de l'AMH dans le liquide folliculaire de différents groupes de femmes. Nous avons montré que des hormones souvent dérégulées dans le SOPK comme la LH concourent à une surexpression du système AMH, ce qui pourrait expliquer le nombre accru de follicules immatures chez les femmes SOPK.

## Nouveaux systèmes pour la cryopréservation d'ovocytes par congélation ou par vitrification

**Anne BAUDOT** (INSERM U698, Hôpital Bichat)

Les avancées réalisées au niveau des traitements anticancéreux entraînent aujourd'hui un nombre de plus en plus croissant de jeunes femmes guéries souhaitant avoir un enfant. Or les traitements de chimiothérapie et de radiothérapie sont à l'origine d'une perte importante de fertilité, voire de stérilité précoce. En réponse à ce problème, la cryoconservation de systèmes biologiques semble une solution pleine de promesse puisqu'elle peut être en particulier envisagée pour les ovocytes, soit par la méthode de congélation lente (refroidissement lent en présence d'une faible quantité d'agent cryoprotecteur, avec formation de glace extracellulaire), soit par la méthode de vitrification (refroidissement rapide en présence d'une quantité élevée d'agent cryoprotecteur, sans aucune formation de glace). Cependant, malgré de récents progrès, ces deux techniques appliquées aux ovocytes ne donnent pas encore satisfaction. La cryopréservation des ovocytes matures est en effet délicate du fait du volume cytoplasmique important de cette cellule germinale qui contient une teneur en eau beaucoup plus élevée que les autres cellules, posant des problèmes au moment de la congélation. De plus, le noyau est bloqué en métaphase méiotique II, ce qui rend le fuseau mitotique très fragile et particulièrement sensible à la température et au stress osmotique. A la suite d'une congélation lente, moins de 2% des ovocytes décongelés donnent jusqu'à présent lieu à la naissance d'un enfant. En ce qui concerne la vitrification des ovocytes, elle n'est actuellement pas envisagée dans la plupart des pays (dont la France) à cause de la cytotoxicité des solutions cryoprotectrices nécessaires pour vitrifier.

Le projet que nous souhaitons développer propose, en se basant sur les compétences précédemment développées en chimie, conservation de cellules, tissus et cryobiologie, d'utiliser des techniques innovantes pour résoudre les problèmes liés aux procédures de refroidissement et de réchauffement en synthétisant de nouveaux polymères biocompatibles ou cryogels utilisables aux températures cryogéniques). Ce projet vise 1) à mettre au point, avec les cryogels, des conditions de congélation de gamètes femelles viables et fonctionnels en utilisant des techniques de congélation permettant de s'affranchir ou de réduire la quantité des cryoprotecteurs cytotoxiques, source de dérives possibles au niveau du patrimoine génétique ; 2) à étudier les protocoles de réchauffement adapter à utiliser pour obtenir des gamètes fonctionnels ; 3) à mettre au point les techniques de vitrification de ces gamètes en l'absence, ou avec une diminution très importantes en concentration, des cryoprotecteurs.

### **Publication :**

Bruyère P, Baudot A, Guyader-Joly C, Guérin P, Louis G, Buff S. Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology*. oct 2012;78(6):1294-302.

## Development of a polysaccharide hydrogel to cryopreserve endothelial cells and aortic tissue

Hatte Louis<sup>#,§</sup>, Abed Aïcha<sup>#,§</sup>, Baudot Anne<sup>‡</sup>, Louis Gérard<sup>‡</sup>, Aoudia Souad<sup>‡</sup>, Assoul Nabila<sup>#,§</sup>, Letourneur Didier<sup>#</sup>, Meddahi-Pellé Anne<sup>#,§</sup>.

<sup>#</sup> Inserm, U1148, LVTS, Université Paris 7, Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Hôpital Bichat, Paris, <sup>‡</sup> Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, <sup>§</sup> Université Paris 5, Sorbonne Paris Cité

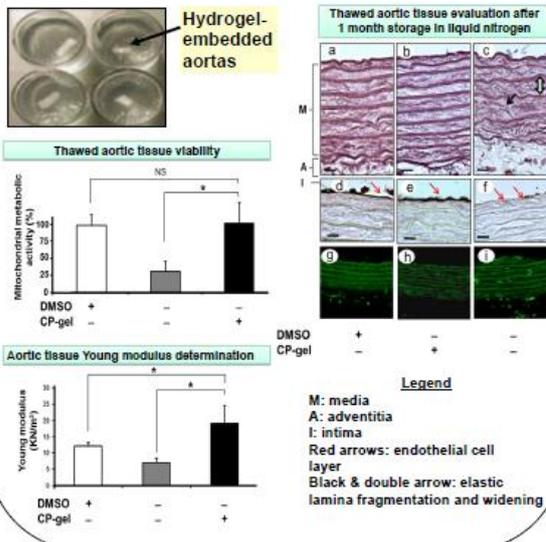
Isolated cells and tissues are routinely cryopreserved and stored in biobanks for cell or clinical therapy. Cryopreserved vessels have been considered as potential alternatives to prosthetic materials when autogenous veins are unavailable and/or inappropriate in vascular surgery. However, tissue fractures and reduction of endothelial function are observed after thawing. Because of their function, endothelial cell preservation is a crucial point to consider in the mid and long-term viability of arterial grafts. Recently, our laboratory developed and patented a biocompatible polysaccharide-based hydrogel (CP-gel) as a new medical device for cell or tissue preservation.

This study evaluated the ability of CP-gel to improve the preservation of endothelial cells and aortic vessels after cryopreservation by using slow freezing protocol and compared the results with the clinical gold standard protocol (10%DMSO).

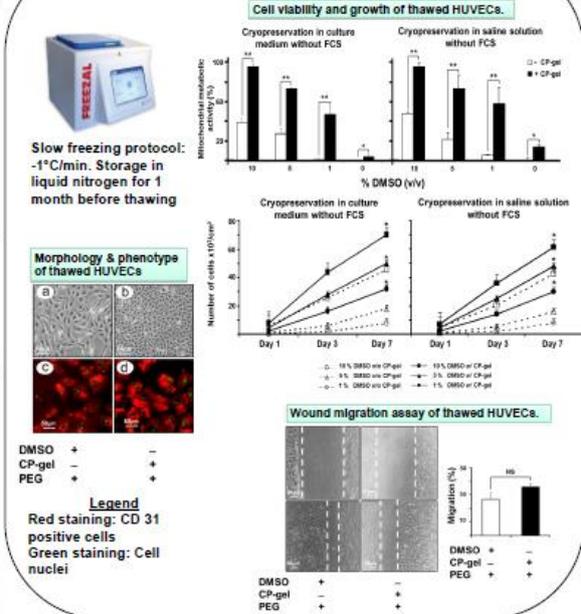
### Hydrogel synthesis



### Aorta cryopreservation



### Endothelial cell cryopreservation



### Conclusion

Cell viability and functionality were preserved in CP-gel after slow freezing procedure. Aortic tissue cryopreserved in CP-gel exhibited an endothelial cell layer and an improvement of mechanical vessel properties compared to the control group after thawing. CP-gel could be used to improve cells or tissue cryopreservation in biobanking.

Authors thank the Agency of Biomedicine for its financial support.

\* These authors contributed equally to this work.