

**APPEL D'OFFRES 2011 « AMP, diagnostic prénatal et  
diagnostic génétique »  
Résumés résultats et publications**

| Chercheur                    | Sujet de recherche   | THEME |
|------------------------------|--|-------|
| AZRIA Elie / LUTON Dominique | <a href="#"><u>Etude de la fonction thyroïdienne des foetus trisomiques 21</u></a>   | 4     |
| BADENS Catherine             | <a href="#"><u>Application du séquençage haut débit au diagnostic moléculaire de maladies génétiques rares</u></a>   | 3 & 5 |
| BARRAUD-LANGE Virginie       | <a href="#"><u>Traitement par thérapie cellulaire des infertilités masculines : caractérisation des cellules souches germinales humaines</u></a>                                       | 4     |
| CLAUSTRES Mireille           | <a href="#"><u>Recherche d'épimutations germinales et de mutations génétiques rares par pyroséquençage et séquençage de 2<sup>ème</sup> génération</u></a>                             | 4     |
| COSTA Catherine              | <a href="#"><u>Diagnostic prénatal non invasif de l'hémophilie : Nouvelle prise en charge des femmes avec néomutation</u></a>  | 4     |
| DE MAZANCOURT Philippe       | <a href="#"><u>Facteur XIII, localisation tissulaire et origine cellulaire ; implications pour la prise en charge des fausses couches à répétition</u></a>                             | 4     |
| DURIF-VAREMBONT Jean-Pierre  | <a href="#"><u>Insémination avec sperme de donneur (IAD). Approche psycho-clinique des liens croisés entre 4 protagonistes : couple donneur et couple receveur</u></a>                 | 1     |
| FANCHIN Renato               | <a href="#"><u>Développement de la folliculogenèse in vitro comme alternative thérapeutique pour la préservation de la fertilité féminine</u></a>                                      | 4     |
| FEREC Claude                 | <a href="#"><u>Développement d'un vecteur minigène pour l'analyse de l'effet des variations inconnues sur l'épissage de l'ARN CFTR</u></a>   | 3     |
| LE LANNOU Dominique          | <a href="#"><u>Apport de la congélation embryonnaire dans un programme de FIV avec ou sans culture prolongée</u></a>   | 4     |
| MANDEL Jean-Louis            | <a href="#"><u>Séquençage à haut débit et diagnostic de pathologies monogéniques à haute hétérogénéité non allélique</u></a>   | 4     |
| McELREAVEY Ken               | <a href="#"><u>Projet du Séquençage d'Exome de l'Homme Infertile</u></a>   | 4     |
| NOURI Nadjat                 | <a href="#"><u>Étude de la dynamique familiale et du processus de filiation chez des couples parentaux après assistance médicale à la procréation : Étude clinique comparative</u></a> | 1     |

|                         |  |          |
|-------------------------|--|----------|
| <b>RAVEL Cécilia</b>    | <a href="#"><u>Qualité du gamète mâle chez les hommes infertiles pris en charge en AMP : retentissement des folates sur l'épigénome</u></a>              | <b>5</b> |
| <b>SERRE Jean-Louis</b> | <a href="#"><u>Distribution de la consanguinité dans les communautés libanaises</u></a>  | <b>1</b> |
| <b>TORRE Antoine</b>    | <a href="#"><u>Syndrome d'hyperstimulation ovarienne et activation endothéliale : caractère prédictif du dosage de microparticules endothéliales</u></a> | <b>4</b> |

### THEMES DE RECHERCHE

1. Sciences humaines, économiques et sociales : impact sanitaire, sociétal ou psychologique en matière d'assistance médicale à la procréation, de diagnostic prénatal et préimplantatoire, et de génétique
2. Sécurité et qualité des pratiques en matière d'assistance médicale à la procréation, de diagnostic prénatal et préimplantatoire, et de génétique
3. Accès au soin en matière d'assistance médicale à la procréation, de diagnostic prénatal et préimplantatoire, et de génétique
4. Amélioration des méthodes, techniques et pratiques en matière d'assistance médicale à la procréation, de diagnostic prénatal et préimplantatoire, et de génétique
5. Qualité des gamètes

## **Etude de la fonction thyroïdienne des fœtus trisomiques 21**

Elie AZRIA / Dominique LUTON (hôpital Bichat, Paris)

### **Introduction**

La trisomie 21 est fréquemment associée à une dysfonction thyroïdienne responsable d'une hypothyroïdie. Ce risque d'hypothyroïdie augmente avec l'âge, principalement en raison du risque d'hypothyroïdie d'origine auto-immune. Cependant, outre cette hypothyroïdie acquise, il très est probable à la vue des résultats publiés qui témoignent de l'existence d'une fréquence accrue d'hypothyroïdie congénitale et de travaux préliminaires sur le statut thyroïdien des fœtus trisomiques 21, qu'une hypothyroïdie modérée se soit déjà installée dès la vie fœtale.

### **Hypothèses**

L'hypothyroïdie fœtale est plus fréquente chez le fœtus trisomique 21 que dans la population générale.

### **Objectif principal**

Déterminer la fréquence de l'hypothyroïdie fœtale dans une population de fœtus présentant une trisomie 21 confirmée.

### **Objectifs secondaires**

- Caractériser la dysfonction thyroïdienne des fœtus trisomiques 21 (TSH, FT4, FT3, diamètre et périmètre thyroïdien, maturation osseuse, croissance). - Constitution d'une sérothèque et d'une banque de tissu thyroïdien.

### **Critère d'évaluation principal**

Hypothyroïdie fœtale définie par une TSH dans le sang fœtal lors de l'issue de grossesse (au moment de la naissance après clampage du cordon ou par ponction de sang fœtal lors d'un foeticide si décision d'IMG), inférieure au 95<sup>ème</sup> percentile de courbes validées. **Critères d'évaluation secondaires**

Thyroxinémie (FT4) inférieure au 5<sup>ème</sup> percentile.

Thyroxinémie (FT4) inférieure au 10<sup>ème</sup> percentile.

TSH supérieur au 90<sup>ème</sup> percentile.

Volume thyroïdien fœtal, biométries fœtales et âge osseux évalués par échographie.

En cas d'interruption médicale de grossesse : poids et volume thyroïdien déterminé par examen foetopathologique, analyse histologique de la thyroïde fœtale.

### **Méthodologie : type d'étude et plan expérimental**

Etude observationnelle descriptive, multicentrique

Constitution d'une sérothèque et d'une banque de tissu thyroïdien fœtal

**Nombre de sujets nécessaires : 50**

### **Critères d'inclusion et principaux critères de non inclusion**

Tous les fœtus présentant une trisomie 21 confirmée par caryotype pourront être inclus sous réserve d'un accord de la part de la mère.

Les fœtus de mère présentant une pathologie thyroïdienne, ne parlant pas le français, mineures ou non affiliés à un régime de sécurité sociale ne pourront pas être incluses.

**Durée totale de l'étude : 3 ans –**

**Nombre de centres participants : 6**

### **Publication :**

Luton D, Azria E, Polak M, Carré A, Vuillard E, Delezoide AL, et al. Thyroid Function in Fetuses with Down Syndrome. Hormone Research in Paediatrics. 2012;78(2):88-93.

## **Application du séquençage haut débit au diagnostic moléculaire de maladies génétiques rares**

Catherine BADENS (AP-HM)

Il s'agit d'étudier l'impact scientifique, médical, thérapeutique, éthique et financier de l'approche pangénomique pour le diagnostic génétique des maladies neuromusculaires. Pour cela, nous proposons un test sur 2 ans et 100 patients en parallèle, en appliquant sur un même prélèvement d'une part la stratégie diagnostique "classique" en approche gène par gène, et d'autre part une approche de séquençage systématique de tous les exons du génome par NGS.

La mise à disposition des moyens (humains et en matériels) est fournie par notre structure de tutelle, nous demandons à l'Agence de Biomédecine une participation aux consommables pour un montant de 50 000 euros.

L'acquisition de l'équipement (séquenceur haut débit) est demandée à l'APHM dans le cadre de la Commission à l'Innovation. Le reste des consommables et du personnel est financé par les autres projets en cours (consortium européens, associations de patients).

Cette nouvelle technologie de séquençage permet en une seule expérimentation d'obtenir la séquence de l'ensemble des exons des gènes d'un individu. Elle a été validée en recherche, nous souhaitons l'appliquer au domaine du diagnostic génétique.

L'impact attendu sur la qualité de ce diagnostic concerne le délai de rendu de résultat, le coût global de l'analyse et l'efficacité du diagnostic en termes d'identification de mutations, ainsi que sur les avancées médicales et thérapeutiques offertes par la découverte de nouveaux gènes impliqués.

### **Publication :**

Lacoste C, Desvignes J-P, Salgado D, Pecheux C, Villard L, Bartoli M, et al. Coverage Analysis of Lists of Genes involved in Heterogeneous Genetic Diseases following Benchtop Exome Sequencing using the Ion Proton. J Genet. mars 2016;95(1):203-8.

## **Traitement par thérapie cellulaire des infertilités masculines : caractérisation des cellules souches germinales humaines**

Virginie BARRAUD-LANGE (CECOS)

L'amélioration de l'efficacité des traitements anticancéreux est associée à leur forte toxicité gonadique responsable souvent de stérilités ultérieures. Chez l'homme pubère l'autoconservation, préalable au traitement, de spermatozoïdes en vue d'AMP est possible. Chez le garçon prépubère, la seule possibilité est la cryoconservation de fragments de pulpe testiculaire en vue du développement de techniques de thérapie cellulaire permettant la recolonisation du testicule par des cellules souches germinales (CSG). Mais cette dernière technique peut aussi être proposée à l'homme adulte pour lui restaurer sa fertilité « naturelle ».

En effet, l'état actuel des connaissances acquises chez l'animal permet d'envisager l'utilisation des CSG par transplantation autologue pour restaurer la spermatogenèse. Cela justifie qu'une telle recherche soit développée chez l'humain. Le CECOS Cochin va conserver de telles biopsies testiculaires d'enfants impubères (PHRC 2008 Projet n°APN 13-14) et a pu s'entourer des collaborations nécessaires, au CEA et à l'université Paris Descartes, à la réalisation d'un projet de recherche de caractérisation des CSG humaines pour lesquelles très peu de données sont disponibles, et qui est indispensable à une future application en thérapie cellulaire.

Nous travaillerons, à partir de fragments de biopsies testiculaires adultes conformément à la loi de bioéthique de 2004. Nous identifierons les marqueurs cellulaires permettant de purifier par cytométrie en flux les cellules souches germinales humaines sur des critères antigéniques ou fonctionnelles. Nous développerons un système de culture de ces cellules afin de les amplifier dans des conditions qui leur permettront de conserver leur potentiel de régénération d'une spermatogenèse dans l'optique d'une auto greffe ultérieure. Les méthodes de congélation des cellules souches germinales seront établies afin de permettre leur conservation à long terme nécessaire à leur utilisation en thérapie cellulaire. Afin de s'assurer de l'innocuité du système de culture, la stabilité du caryotype des clones de CSG obtenus *in vitro* sera étudiée par CGH Array et la stabilité épigénétique des gènes soumis à empreinte par l'analyse du profil de méthylation selon la technique de PCR méthylation-dépendante par oligonucléotides dégénérés. A l'heure actuelle le seul test fonctionnel de régénération tissulaire, après transplantation dans le testicule de souris immunodéficientes, pour l'étude des CSG humaines, consiste en leur migration le long de la membrane basale des tubes séminifères (mais il n'y a pas de reprise de la spermatogenèse). Nous chercherons donc à développer un modèle de souris immunodéficientes « humanisées », pour l'étude du potentiel de colonisation des CSG humaines après transplantation. Notre étude amorcée à partir de CSG fonctionnelles prélevées chez l'adulte pourra être étendue à l'analyse des cellules souches spermatogoniales prélevées chez l'enfant prépubère, précurseurs des CSG chez l'adulte.

### **Publication :**

Firlej V, Barraud-Lange V, Fouchet P. Stem Cell Therapy for Male Infertility Takes a Step Forward. Cell Stem Cell. nov 2012;11(5):585-6.

## **Recherche d'épimutations germinales et de mutations génétiques rares par pyroséquençage et séquençage de 2<sup>ème</sup> génération**

Mireille CLAUSTRÉS (INSERM)

Malgré les progrès technologiques de ces dernières années dans le diagnostic moléculaire des maladies génétiques, il persiste un certain nombre de patients pour lesquels le diagnostic clinique est confirmé mais dont l'étude moléculaire n'a pas permis d'identifier le génotype. Dans ces familles, un diagnostic prénatal ou préimplantatoire peut être proposé en déterminant l'haplotype à risque (utilisation de marqueurs microsatellites) lorsqu'un prélèvement du cas index est disponible. Toutefois, en l'absence d'ADN du cas index, un certain nombre de couples ne peut accéder à ces diagnostics, seule l'identification de la (des) mutation(s) causale(s) permettra alors d'identifier le chromosome muté qui ségrège dans la famille. Dans ce projet, nous proposons de rechercher des mutations qui ne sont pas identifiables par les méthodes actuellement utilisées en diagnostic génétique, d'une part les épimutations germinales (méthylation de l'ADN) et d'autre part des mutations génétiques localisées dans des régions peu ou pas explorées (régions 5' et 3' non codantes et régions introniques profondes). Pour détecter ces mutations nous utiliserons des techniques nouvelles et puissantes : le pyroséquençage et le séquençage de 2<sup>ème</sup> génération. Deux pathologies liées aux mutations du gène *CFTR*, la mucoviscidose (Cystic Fibrosis ou CF) et l'absence bilatérale congénitale des canaux déférents (ABCD) seront utilisées comme modèles pour cette étude ; l'exploitation des résultats permettra d'envisager le développement de cette approche dans d'autres maladies génétiques. Les résultats de cette étude devraient permettre d'améliorer le diagnostic moléculaire et d'élargir le nombre de familles qui pourront bénéficier du DPN et du DPI.

### **Publication :**

Bergougnoux A, Rivals I, Liquori A, Raynal C, Varilh J, Magalhães M, et al. A balance between activating and repressive histone modifications regulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression in vivo. *Epigenetics*. 15 juill 2014;9(7):1007-17.

Poster

# Appel d'Offres

## « AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique »



Séquençage de Nouvelle Génération et pyroséquençage, nouveaux outils pour l'analyse génétique et épigénétique du gène *CFTR*



J. Varilh, A. Bergougnoux, J. Bonini, E. Beyne, M. Clautres, A. De Sario, M. Taulan-Cadars  
IURC, INSERM U827, CHU Montpellier, Université Montpellier

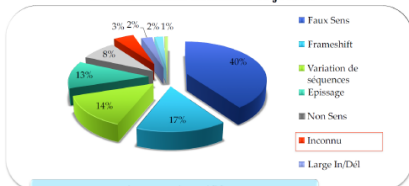


Ces travaux ont été financés par l'Agence de la Biomédecine et l'association Française Vaincre la Mucoviscidose



**Introduction**

1964 variations décrites à ce jour...

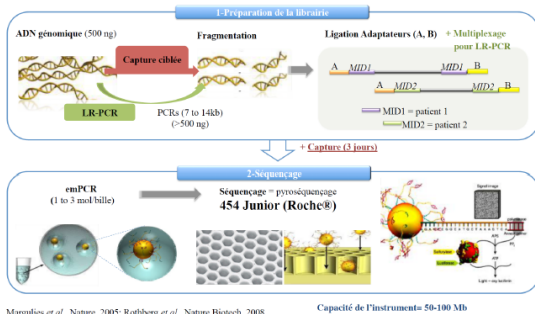


3% de mutations non identifiées en France

- Patients : patients avec 1 seule mutation identifiée → 18 ADN<sub>s</sub> recueillis  
Brest (M.P. Audrezet & C. Ferec)  
Montpellier (C. Raynal & M. des Georges)  
Paris (E. Girodon & T. Bienvenu) **Collaboration Nationale**
- Apparentés : 30 parents de patients CF

**Méthodes**

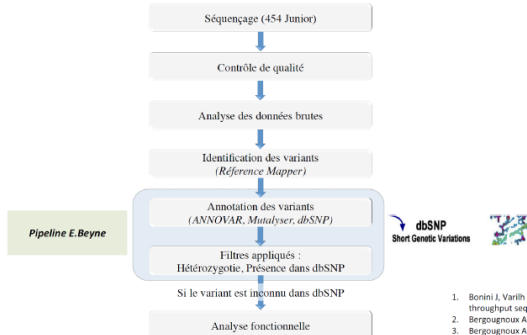
Séquençage Nouvelle Génération (NGS)  
du locus *CFTR* entier (250kb)



Mangulies et al., Nature, 2005; Rothberg et al., Nature Biotech, 2008 Capacité de l'instrument 50-100 Mb

→ Test en cours sur un Séquenceur MiSeq (Illumina®)

**Pipeline bio-informatique**



Pipeline E. Beyne



**Objectifs**

- 1) Recherche de la seconde mutation chez des patients CF bien caractérisés cliniquement et dont le génotype est incomplet (1 mutation)
- 2) Mise en place d'une méthode rapide et efficace pour analyser la méthylation de l'ADN dans le promoteur du gène *CFTR*.

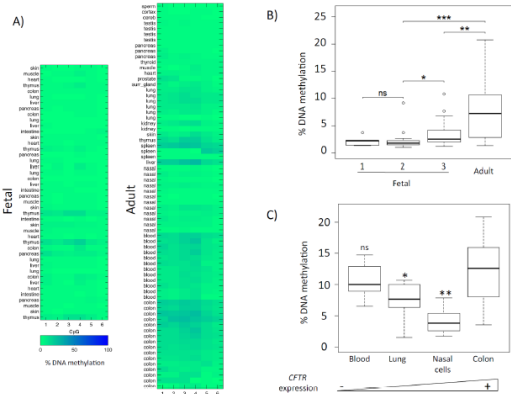
**Résultats**

Identification de nouvelles mutations introniques et établissement d'un catalogue de variants sur l'ensemble du gène *CFTR*  
(Bonini et al., 2015)

-Séquençage terminé :  
30 patients  
(CF 1mutation + CF 2 mutations + CFTR-RD)  
30 parents de patients

- CF 1 mutation (18 ADN<sub>s</sub>) :
- 5 mutations causales identifiées :
  - 1 exonique (1 patient)
  - 4 introniques (9 patients)
- 10 cas CF résolus (2 cas non résolus)
- 6 derniers cas (7 mutations introniques) : vérification sanger et analyses fonctionnelles en cours
- Construction d'un catalogue de variants sur l'ensemble du locus *CFTR*

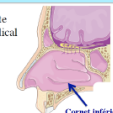
La méthylation de l'ADN dans le promoteur de *CFTR* est faible (<20%)  
(Bergougnoux et al., 2014)



La méthylation de l'ADN a été mesurée par pyroséquençage (PyroMarkQ24, Qiagen) dans 68 tissus humains adultes et 44 tissus fœtaux prélevés sur des individus sains. Cette étude a été autorisée par l'Agence de la Biomédecine.

Les cellules épithéliales nasales sont un modèle pour étudier la méthylation de l'ADN dans des pathologies du système respiratoire  
(Bergougnoux et al., 2015)

Les cellules épithéliales nasales sont prélevées par microcuretage du cornet inférieur, ensuite utilisées pour extraire l'ADN génomique. Image adaptée de « Cavité Nasale » de Servier Medical Art. <http://smart.servier.fr/servier-medical-art>



**Publications**

1. Bonini J, Varilh J, Raynal C, These C, Beyne E, Audrezet MP, Ferec C, Bienvenu T, Girodon E, Tuffery-Giraud S, Des Georges M, Clautres M, Taulan-Cadars M. Small-scale high-throughput sequencing-based identification of novel therapeutic tools in cystic fibrosis. *Genet Med*. 2015 Jun 8. doi: 10.1038/gm.2014.194.
2. Bergougnoux A, Clautres M and De Sario A. Nasal epithelial cells, a tool to study DNA Methylation in airway diseases. *Epigenetics* 7(11):119-26. doi: 10.2217/epi.14.65 (2015).
3. Bergougnoux A, Rivalo J, Liqori A, Raynal C, Varilh J, Magalhães M, Perez M, Bigi N, Des Georges M, Chiron R, Squalli-Houssaini AS, Clautres M, De Sario A. A balance between activating and repressive histone modifications regulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression in vivo. *Epigenetics*. 2014 Jul;9(7):1007-17.



**Journées de l'Agence**  
**28-29 mai 2015**

## **Diagnostic prénatal non invasif de l'hémophilie : Nouvelle prise en charge des femmes avec néomutation**

Catherine COSTA (hôpital Henri Mondor)

### **Objectif primaire**

Développement d'un test de génétique moléculaire permettant :

- La détection de mosaïques somatiques chez les mères de patients atteints de maladies génétiques liées à l'X avec néomutation. Ce test reposera sur une méthode de détection fiable et sensible de mutations ponctuelles par PCR en temps réel couplée à la validation par miniséquençage.
- Le diagnostic prénatal non invasif des formes sporadiques vraies de ces maladies, sans mosaïque somatique chez la mère, par étude de l'ADN fœtal circulant à partir du sang maternel. Ce test reposera sur une méthode déjà utilisée pour le génotypage fœtal non invasif fondée sur :
  - une méthode d'enrichissement de l'ADN fœtal plasmatique selon un protocole publié
  - une extraction fiable et sécurisée de l'ADN dans un système fermé - un contrôle de la présence d'ADN fœtal dans l'échantillon analysé

### **Objectif secondaire**

Validation d'une nouvelle approche dans la prise en charge des femmes enceintes ayant donné naissance à un premier enfant hémophile par survenue d'une mutation *de novo* (absence de la mutation délétère par méthode conventionnelle (séquençage)

### **Résultats attendus**

- Détermination de la sensibilité du test sur les différents types de mutations.
- Identification des femmes en mosaïques somatiques et évaluation du pourcentage de mosaïcisme. Le nombre de femmes conductrices est actuellement sous-estimé du fait du peu de sensibilité des techniques utilisées. Réévaluation des formes sporadiques vraies.
- Nouvelle proposition de prise en charge des patientes dans les cas sporadiques. Les patientes négatives dans cette première étude, mais qui restent à risque de mosaïque germinale et/ou somatique localisée à d'autres tissus, pourront bénéficier d'un diagnostic prénatal non invasif sur sang maternel en lieu et place du diagnostic prénatal conventionnel invasif par amniocentèse.

### **Méthodologie**

Etude collaborative et multicentrique nationale non interventionnelle



Poster

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

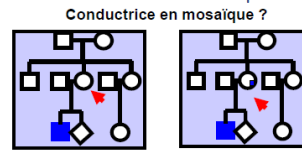
## Diagnostic prénatal non invasif de l'hémophilie : Nouvelle prise en charge des femmes avec néomutation

Costa C<sup>1,2</sup>, Goossens M<sup>1,2</sup>, Costa JM<sup>3</sup>, Delpech M<sup>2</sup>

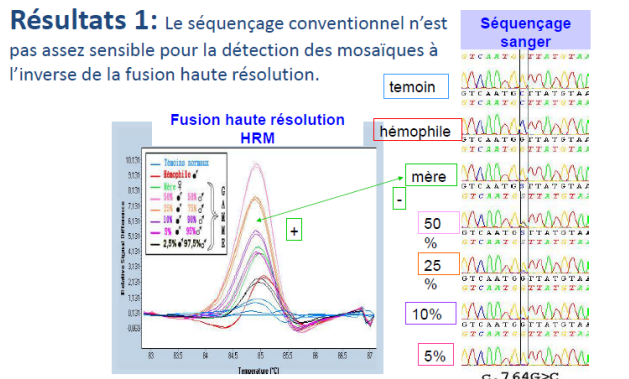
<sup>1</sup>APHP, CHU Henri Mondor, Génétique Moléculaire, <sup>2</sup>APHP, CHU Cochin, Biochimie et Génétique Moléculaire, <sup>3</sup>Laboratoire CERBA, Saint-Ouen L'Aumone, France

**Introduction:** L'hémophilie est maladie génétique liée au chromosome X, qui touche les garçons → hémophiles. Les filles ne sont pas atteintes sauf exceptions → conductrices. Les formes sporadiques représentent 30% des cas d'hémophilie et sont dues généralement à des mutations de novo. Seule l'analyse génétique des mères permet d'établir avec certitude le diagnostic de conductrice et de distinguer ainsi les vrais cas sporadiques avec néomutation, des cas isolés correspondant à des formes familiales méconnues. La prévalence des mères non porteuses de la mutation est estimée à environ 12% mais est largement sous estimée. Ces mères restent cependant à risque de présenter une mosaïque somatique et/ou germinale.

**Objectifs:** Développer un test de génétique moléculaire pour:  
La détection de mosaïques somatiques chez les mères de patients atteints de maladies génétiques liées à l'X avec néomutation.  
Le diagnostic prénatal non invasif des formes sporadiques vraies de ces maladies, par étude de l'ADN foetal circulant à partir du sang maternel.

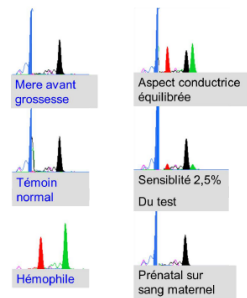
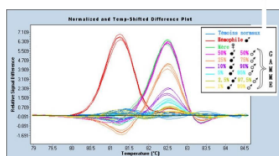


**Méthode:** Ce test repose sur une méthode utilisée pour le génotypage fœtal non invasif fondée sur :  
 -une méthode d'enrichissement de l'ADN foetal  
 -une extraction fiable et sécurisée de l'ADN dans un système fermé  
 -un contrôle de la présence d'ADN foetal dans l'échantillon analysé  
 -Test de détection sensible de la mutation par PCR en temps réel, HRM, High Resolution Melting  
 -Test de confirmation par mini séquençage, snapshot  
 -Evaluation du pourcentage de mosaïcisme  
 -Test de sensibilité préalable au diagnostic prénatal non invasif par dilution au 1/100 et 1/1000 de la gamme de mosaïque artificielle préalablement établie.  
 -Corrélation avec le séquençage haut débit NGS, technologie PGM Ion torrent

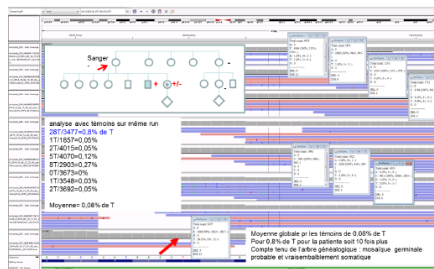


**Exclusion de mosaïque**  
 impérativement avant grossesse avec la même approche technologique que pour le DPNI

**HRM :** sensible mais non spécifique → artefacts  
**Snapshot :** pour confirmer la mutation



### Résultats 2



Trente-neuf mères sans mutation. Mosaïque étudiée chez 25 patientes.  
 Mosaïque positive : 5/25 = 20% (7% de plus que la littérature)  
 Attention: mutations homopolymères (8/39) = problème technique pour PCR-Snapshot. La technologie NGS : + performante mais + de calculs statistiques pour valider et sécuriser les calculs d'estimation.  
 Diagnostic prénatal non invasif DPNI proposé aux 39 patientes, 3/5 réalisés. Pas de faux positifs ni faux négatifs.

Mise au point de tests de détection ciblés sur 16 mutations différentes par PCR en temps réel → évolution vers séquençage haut débit NGS. La sensibilité des deux méthodes est semblable, estimée entre 1 et 5% suivant les mutations étudiées (n=25).

**Conclusion:** Par cette nouvelle approche nous avons pu montrer :  
 Le diagnostic des patientes en mosaïque est plus performant, 20% comme attendu. Les deux approches PCR-temps réel couplée au miniséquençage et NGS présentent la même sensibilité mais cette dernière ne demande pas le développement d'un test « mutation spécifique ».  
 Le diagnostic prénatal non invasif de l'hémophilie a été réalisé avec succès chez 3 patientes par analyse de l'ADN foetal plasmatique, dans les cas sporadiques. Compte tenu de l'évolution technologique le protocole recherche DPNI hémophilie n'est plus réservé au néomutations mais peut-être étendu à toutes les patientes dans les cas sporadiques et familiaux.

## **Facteur XIII, localisation tissulaire et origine cellulaire ; implications pour la prise en charge des fausses couches à répétition**

Philippe de MAZANCOURT (Université de Versailles Saint-Quentin)

Le facteur XIII de la coagulation a des fonctions tissulaires. A l'interface fœto-maternelle il permet l'ancrage embryonnaire en catalysant la liaison de molécules de fibrine et de protéines d'adhésion (fibrine, fibronectine, intégrines, vitronectine et collagène). Les souris KO pour le facteur XIII (ou son substrat le fibrinogène/fibrine) font des avortements. Les déficits en facteur XIII sont caractérisés par des fausses couches à répétition chez les femmes porteuses du déficit. Il existe du facteur XIII dans le placenta, mais il est majoritairement d'origine fœtale et le déficit fœtal en facteur XIII est *a priori* sans grande incidence sur le déroulement de la grossesse. Nous souhaitons clarifier l'origine (tissulaire et/ou circulante) du facteur XIII maternel responsable de l'ancrage et de l'invasion correcte des trophoblastes. Notre approche immuno-histochimique complétée par de la dissection laser, de la biologie moléculaire et de la protéomique a pour but de répondre à des questions fondamentales de physiopathologie, et peut débiter sur une modification du bilan de prise en charge des femmes sujettes aux fausses couches à répétition.

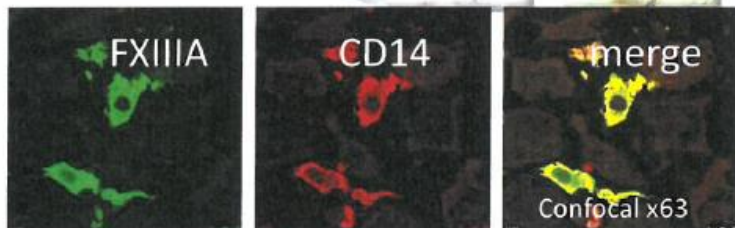
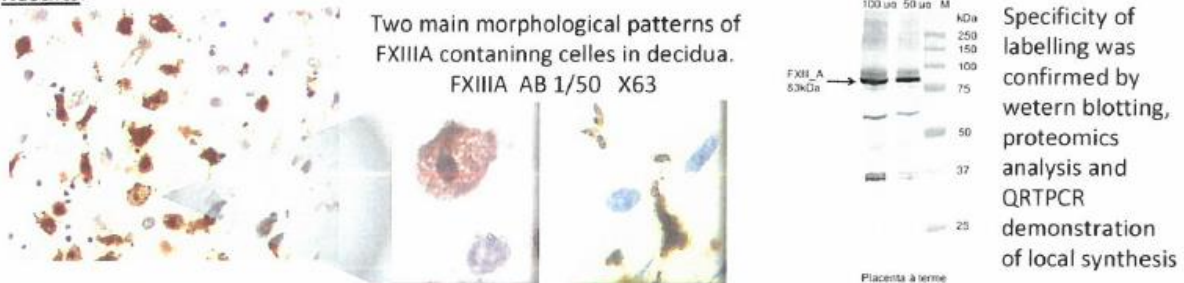
Poster

## FXIII-containing fetal macrophages in decidua and negative control of trophoblast invasion

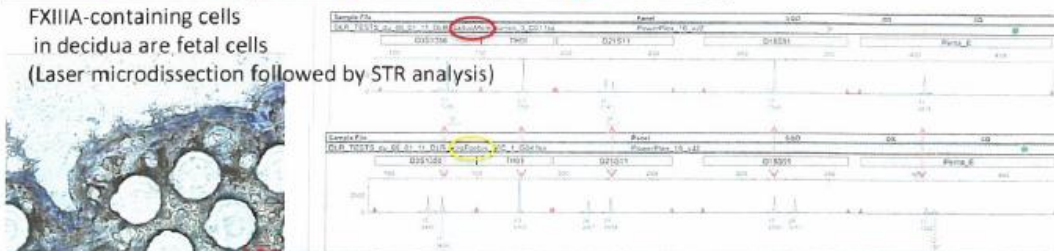
Quélin F, Syslak L, Guillaume A, Loeillet L, Leroy B, Höfer N, de Mazancourt P., Université de Versailles Saint-Quentin, funded by Agence de Biomédecine

**Introduction:** The FXIII is a blood coagulation factor facilitates the formation of a stable blood clot preventing excessive bleeding and aiding wound healing. Activated FXIIIa is a transglutaminase forming intermolecular  $\gamma$ -glutamyl  $\epsilon$ -lysine crosslinks between fibrin monomers. Pregnant patients with congenital FXIIIa deficiency suffer decidual bleeding from 5 to 6 weeks of gestation and spontaneous abortions always occur subsequently if no substitute therapy is given. On the other hand, the patients with congenital FXIII-B (the FXIIIa carrier in plasma) are able to maintain pregnancies without substitute therapy. The aim of this study was to investigate and possibly clarify its function in the development of the placenta. For this, we first characterized the location of FXIII at the fetal-uterine interphase, and second we studied the possible involvement of FXIII in the control of embryonic invasion in maternal tissue, by focusing on the crosslinking of extracellular matrix proteins.

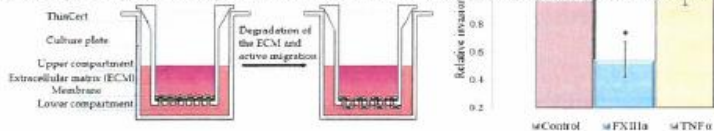
**Results:**



FXIIIa-containing cells in decidua are fetal cells (Laser microdissection followed by STR analysis)



Human extravillous trophoblast cells cultured in presence of activated FXIII for 24h have higher mRNA expression of  $\alpha$ v,  $\beta$ 1 and  $\beta$ 3 integrins whereas  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 5 integrins mRNA were unchanged.



Addition of activated FXIIIa to cultured trophoblast cells in transwell prevents invasion (without affecting proliferation or MMP activity; not shown)

**Conclusion:** This work established that FXIIIa is present in decidua of 11 weeks gestation samples. Specificity of FXIIIa labelling was verified by western-blotting, and proteomic analysis of band gels, QRT-PCR of decidua mRNA and dideoxysequencing. Labelled cells have two distinct morphological patterns, consistent with monocyte/macrophage lineage that was ascertained by CD14 costaining. Intracellular distribution of FXIIIa was diffuse in the cytoplasm. Microsatellite analysis of FXIIIa containing cells, studied by microdissection laser sampling followed by comparison with the maternal profile demonstrated that the FXIIIa-labelled cells have the fetal genotype. To gain insight into the FXIIIa functions, we cultured isolated extravillous cytotrophoblast in the presence of activated FXIIIa. Transwell migration studies demonstrated that FXIIIa negatively controls invasion, and this control did not rely on proliferation modification. Zymography demonstrated that MMP activity was not involved either. In contrast, the integrin expression pattern was affected. Since some of the overexpressed integrin subunits are FXIIIa substrates, the present study indicates that FXIIIa might be critical in maintaining controlled fetal cells invasion through catalysing binding to extracellular matrix proteins.

## **Insémination avec sperme de donneur (IAD). Approche psycho-clinique des liens croisés entre 4 protagonistes : couple donneur et couple receveur**

Jean-Pierre DURIF-VAREMBONT (Université de Lyon 2)

### **Objectifs**

Ce projet s'inscrit dans une perspective de recherche clinique sur le vécu psychique (motivations, angoisses et fantasmes) des hommes et des femmes des couples concernés à titre de donneurs ou de receveurs dans l'insémination avec donneur de sperme (IAD). Il propose d'approfondir la connaissance des processus psychologiques sous un angle qui a été très peu abordé dans les recherches jusqu'à présent :

- 1) Les représentations et liens croisés entre les quatre personnages impliqués, en particulier en ce qui concerne la conception pour chacun de la parentalité (paternité, maternité) et du don
- 2) Le rôle fondamental et jusqu'à présent plutôt méconnu de la femme (compagne ou épouse) dans les deux catégories de couple, et donc du rapport Homme/Femme.

### **Résultats attendus**

- Une connaissance plus approfondie des processus psychiques complexes qui président aux positions et au lien imaginaire des quatre figures impliquées dans l'IAD
- Une meilleure compréhension des motivations et des freins en jeu dans l'acte de don, ce qui permettrait notamment d'améliorer le recrutement des donneurs.
- Une meilleure prise en compte des enjeux de la parentalité et du couple, qui permettrait d'élaborer des dispositifs spécifiques d'accompagnement. Ces dispositifs existent peu actuellement et pourraient être proposés aussi bien en préalable que dans l'après-coup aux donneurs et aux receveurs (facilitation de la démarche, accès à la parentalité et rapport aux enfants)

### **Méthodologie**

L'abord et la compréhension des phénomènes psychiques complexes en jeu dans l'IAD nécessitent le recours à une méthode de recherche qualitative. Nous prévoyons donc de mener un entretien individuel semi-directif avec chacun des partenaires des couples donneurs vs couples receveurs selon le flux annuel observé au CECOS de Lyon, soit 10 à 15 donneurs.

Les couples demandeurs étant dix fois plus nombreux, nous constituerons un échantillon de taille équivalente et suffisamment diversifiée pour les receveurs.



Poster : Double cliquer pour afficher le poster dans Acrobat Reader

# Insémination avec sperme de donneur (IAD), approche psycho-clinique Les liens croisés entre quatre protagonistes (couple donneur, couple receveur)

Jean-Pierre Durif-Varembont, Patricia Mercader, Monique Dalud-Vincent, Jean-François Guérin  
Zohra Perret, André de Souza, Nathalie Dumet

## 1. Introduction

Depuis les années 1970, la France a organisé l'IAD selon trois principes: une solidarité de couple à couple, la gratuité, l'anonymat. Mais le débat est régulièrement réouvert, en particulier sur l'anonymat. Notre ambition est de comprendre de façon clinique les processus psychologiques qui sous-tendent les opinions en présence :



- Le lien ambivalent entre les quatre personnages;
- La place peu étudiée des deux femmes dans le processus;
- La dynamique asymétrique dans chacun des couples.

## 2. Méthodologie

- 24 couples receveurs, 5 couples donneurs
- 58 entretiens semi-directifs
- Trois niveaux d'analyse
  - Lexicométrique (logiciel Alceste)
  - Thématique (énoncés)
  - Clinique (énonciation)

## 3. Résultats

*Un travail psychique nécessaire pour que chacun construise sa place.*

Pour les quatre protagonistes, il faut construire une identification minimale différenciant les places de chacun, au prix d'un blanc provisoire de représentations. Pour les donneurs comme pour les receveurs, hommes et femmes, il faut se détacher d'une paternité imaginaire pour faire à « l'autre homme » sa juste place.

Pour les receveurs, supposer des motivations altruistes et bienveillantes au couple donneur contribue à la déssexualisation du don et permet de l'accepter.

*Représentations croisées*

- Les femmes de donneurs ont assez peu de représentations des couples receveurs.
- Les hommes donneurs s'identifient à l'homme receveur, mais *a minima*.
- Les femmes des couples receveurs imaginent assez facilement les motivations des couples donneurs, moins facilement leurs personnes.
  - Les hommes des couples receveurs sont dans un blanc de pensée provisoire sur le donneur.



*Rôle des femmes dans l'IAD*

- Les femmes de donneurs, un accord résigné sous garantie d'anonymat.
- Les femmes receveuses, un angoissant chemin pour accepter la pénible médicalisation de leur corps et soutenir leur conjoint dans la construction de sa paternité.

*Dire ou ne pas dire*

- Les couples donneurs se confient à quelques amis proches.
- Les couples receveurs recherchent le soutien de leur famille.

## 4. Conclusions

*Une parenté déjà plurielle, une construction symbolique*

Malgré les angoisses et les fantasmes que suscite la situation, les receveurs savent et assument que l'enfant ne naît pas d'un sperme, mais d'un désir, le leur et celui du couple donneur (ce dont leur discours sur la gratuité témoigne). Tous distinguent clairement « parent » et « géniteur », mais pour les donneurs, être géniteur est assimilé à être « rien ». Donneurs et receveurs sont attachés moins à l'anonymat qu'à sa fonction de protection de leur couple et du lien de filiation.

Ils sont ouverts à la possibilité de conserver pour les enfants des données non identifiantes sur le donneur. Ils souhaitent dire la vérité sur leur recours à l'IAD, mais sont embarrassés pour choisir le moment et la façon de dire.



## Références bibliographiques

- Brunet, L. & Kunstmann, J.M. (2013). Gamete donation in France : the future of the anonymity doctrine. *Medicine, Health Care and Philosophy*, 16, 69-81.
- Delaisi de Pareseval, G., Depadt-Sébag, V. (2010). Accès à la parenté. Assistance médicale à la procréation et à l'adoption. Pour une vision progressiste de la loi bioéthique.

- Paris, Terra Nova.
- Jouannet, P., Mieuisset R. et al. (2010). *Donner et après... La procréation par don de spermatozoïdes avec ou sans anonymat ?* Paris, Springer-Verlag France
- Théry, I., Leroyet, A. -M. (2014). *Filiation, origines, parentalité. Le droit face aux nouvelles valeurs de responsabilité générationnelle*. Rapport du groupe de travail Filiation, origines, parentalité. Ministère des affaires sociales et de la santé. Ministère délégué chargé de la famille

## Avec la collaboration de

Audrey Broqueville, Charlotte Garnier

### Contact:

jean-pierre.durif@univ-lyon2.fr

## **Développement de la folliculogénèse *in vitro* comme alternative thérapeutique pour la préservation de la fertilité féminine**

Renato FANCHIN (hôpital Antoine Béclère, Clamart)

**Objectifs :** Notre projet vise à développer la folliculogénèse *in vitro* chez la femme à partir de follicules primordiaux. Sur le plan clinique, une des retombées importantes de ce développement sera la préservation de la fertilité féminine, en particulier face aux traitements anti-cancéreux gonadotoxiques. Notre centre d'AMP à l'Hôpital Béclère à Clamart est une plateforme active pour la préservation de la fertilité. Néanmoins, les techniques actuellement disponibles doivent progresser afin de répondre à l'ensemble des situations cliniques, en leur garantissant de bons taux de succès. La folliculogénèse *in vitro* à partir de fragments de cortex ovariens prélevés chirurgicalement avant traitement gonadotoxique pourrait constituer une alternative permettant de palier aux inconvénients des techniques actuelles.

**Méthodologie :** Des résultats encourageants ont été obtenus ces dernières années aussi bien chez la souris que dans l'espèce humaine. Cependant, l'objectif final de la technique reste l'obtention d'un ovocyte mature. Nous proposons une stratégie en deux étapes: 1. culture du cortex ovarien pour faire croître les follicules du stade primordial au stade préantral et 2. culture de follicules isolés du stade préantral au stade petit antral. Par la suite, les ovocytes seront maturés *in vitro* pendant 24h mais ne feront pas l'objet de fécondation, cette dernière technique étant déjà utilisée en routine dans notre centre d'AMP. La mise au point de la technique sera faite à partir d'ovaires de femmes transsexuelles suivies à l'Hôpital Foch et de femmes opérées pour des pathologies gynécologiques à l'Hôpital Béclère.

Par ailleurs, nous comptons améliorer l'efficacité et l'innocuité de la technique de folliculogénèse *in vitro* chez la femme. Actuellement, les équipes internationales qui s'y intéressent utilisent un inhibiteur de PTEN, qui est un gène suppresseur de tumeur, pour stimuler la croissance folliculaire. Bien que l'inhibition de PTEN semble être une voie prometteuse, l'innocuité d'un tel procédé sur l'embryon futur n'est pas garantie. Il nous semble nécessaire d'identifier d'autres facteurs capables de stimuler la croissance folliculaire *in vitro*. L'hormone anti-Müllérienne (AMH), connue pour inhiber le recrutement des follicules primordiaux, semble être un candidat de choix. Nous souhaitons ainsi en parallèle identifier par criblage à haut débit des antagonistes de l'AMH via la plateforme CIBLOT (Chatenay Malabry) qui possède deux chimiothèques de 6500 et 1500 composés.

**Résultats attendus:** Obtention d'un ovocyte humain en stade métaphase II à partir de follicules primordiaux. Ce développement pourra offrir de nouvelles perspectives cliniques dans le cadre de la préservation de la fertilité ou bien des infertilités du couple. En outre, la maîtrise de la folliculogénèse *in vitro* féminine permettra des progrès cognitifs considérables en particulier sur les facteurs impliqués dans sa stimulation et son inhibition.

### **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. J Clin Endocrinol Metab. 1 juin 2016;101(6):2602-11.

## **Développement d'un vecteur minigène pour l'analyse de l'effet des variations inconnues sur l'épissage de l'ARN CFTR**

Claude FEREC (CHRU Brest)

Le gène CFTR est le siège de plus de 1600 anomalies différentes décrites au sein du Consortium international d'étude des mutations du gène CFTR ([www.genet.sickkids.on.ca](http://www.genet.sickkids.on.ca)), et à côté des mutations fréquentes, il existe de nombreuses variations dont le caractère délétère n'est pas clairement établi, qui mettent parfois en difficulté les généticiens moléculaires et les cliniciens. Ceci est particulièrement vrai lorsqu'il s'agit de variations introniques ou de variations exoniques silencieuses, dont on sait qu'elles peuvent affecter l'épissage de l'ARN *CFTR* et donner ainsi naissance à des protéines tronquées ou en quantité insuffisante. Plusieurs outils de prédiction *in silico* de l'impact des variants de séquence sur l'épissage existent et sont maintenant largement utilisés dans les laboratoires. Mais, même s'ils ont prouvé leur efficacité dans l'analyse de variants d'épissage de nombreux gènes, il est important de pouvoir valider ces prédictions bioinformatiques par une analyse fonctionnelle *in vitro*.

Le projet de travail que nous nous proposons de réaliser a pour but de proposer une technique compatible avec une utilisation en situation d'urgence diagnostique pour l'analyse des variations nucléotidiques rapportées dans le gène *CFTR* et plus particulièrement d'étudier leur impact sur l'épissage de l'ARN *CFTR*.

A partir d'une construction originale d'un vecteur pcDNA3.1 dans laquelle nous avons introduit les exons 1, 2 et 3 du gène ubiquitaire PolR2G sous l'influence du promoteur CMV, nous allons cloner par une technique de recombinaison homologue, différentes séquences sauvages et mutées du gène *CFTR* dont nous étudierons parallèlement les transcrits à partir de prélèvements d'épithélium nasal. Ces vecteurs produits seront utilisés pour transfecter deux lignées cellulaires (les cellules Hela et les cellules T84), à partir desquelles les ARNm seront extraits et analysés au bout de 24h de culture.

Seize variations à étudier ont été sélectionnées sur la base des résultats obtenus par les prédictions bioinformatiques, et sont regroupées en quatre classes en fonction de l'effet attendu sur l'épissage de l'ARN (exclusion complète d'exon, exclusion partielle, utilisation d'un site cryptique d'épissage, ou absence d'effet).

La première étape va consister à tester quatre échantillons d'ADN appartenant à ces quatre classes, et à confronter les résultats obtenus *in vitro* à partir des transfections réalisées dans les deux types cellulaires avec les résultats des prédictions bioinformatiques et à partir de l'ARN des patients. Enfin, nous compléterons cette étude par l'analyse d'un nombre important de variants, avant de pouvoir proposer cet outil à la communauté scientifique.

### **Publication :**

Bonini J, Varilh J, Raynal C, Thèze C, Beyne E, Audrezet M-P, et al. Small-scale high-throughput sequencing-based identification of new therapeutic tools in cystic fibrosis. *Genetics in Medicine*. oct 2015;17(10):796-806.

## **Apport de la congélation embryonnaire dans un programme de FIV avec ou sans culture prolongée**

Dominique LE LANNOU (CHU Rennes)

Si le transfert mono-embryonnaire des embryons frais ou congelés à J2-J3 permet d'obtenir des taux cumulés de grossesses par ponction élevés en diminuant le risque de grossesse multiple, c'est au prix de nombreux transferts d'embryons congelés.

Le transfert au stade de blastocyste, en améliorant la sélection des embryons potentiellement évolutifs, permet d'augmenter le taux d'implantation, et de diminuer ainsi le nombre de transferts. Les résultats de la congélation lente de blastocyste étant malheureusement modestes, les taux de grossesse cumulés observés après transferts frais ou congelés de blastocystes restent inférieurs à ceux obtenus après transfert à J2-J3. Les techniques de vitrification utilisées dans de nombreux pays semblent cependant avoir amélioré de manière spectaculaire les taux d'implantation des blastocystes congelés. L'objectif de cette étude est donc de comparer les taux de grossesse cumulés obtenus après transfert à J2-J3 versus blastocyste.

Il s'agit d'une étude clinique prospective randomisée réalisée chez des patientes de moins de 38 ans lors du premier cycle de FIV-ICSI et, chez lesquelles au moins 5 embryons de bonne qualité (type I ou II) ont été obtenus à J2-J3. Deux groupes seront définis par tirage au sort : soit transfert et congélation lente des embryons au stade J2-J3, soit transfert et vitrification au stade blastocyste J5-J6. Tous les transferts seront mono-embryonnaires. Les résultats seront appréciés en terme de taux d'implantation frais et congelé, de taux de développement en blastocyste, de taux de survie à la décongélation, mais surtout en terme de taux cumulés (transfert d'embryons frais + congelés) de grossesse par ponction, notre objectif étant essentiellement de diminuer le nombre de transferts frais et congelé sans diminuer les taux cumulés de grossesse.



Poster

# Appel d'Offres

## « AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique »



### VITRIFICATION OVOCYTAIRE EN DON D'OVOCYTES Constitution d'une banque d'ovocytes



Deville M<sup>2</sup>, Lopes M<sup>1</sup>, Griveau JF<sup>1</sup>, Jouve G<sup>1</sup>, Veau S<sup>1</sup>, Morcel K<sup>2</sup>, Leveque J<sup>2</sup>, Kazdar N<sup>1</sup>, Viard P<sup>1</sup>, Ravel C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Service de Biologie de la reproduction-CECOS, CHU de Rennes, 16 Bd de Bulgarie, 35 000 Rennes

<sup>2</sup>Service de Gynécologie, CHU de Rennes, 16 Bd de Bulgarie, 35 000 Rennes

#### Introduction

Grâce à la mise en place de la technique de vitrification (technique de congélation ultra-rapide des ovocytes) dans les centres d'AMP, l'organisation des traitements inhérents au don d'ovocytes a été bouleversée, offrant désormais un meilleur confort aux receveuses puisque le transfert embryonnaire peut à présent être programmé, selon les mêmes principes que ceux du transfert d'un embryon congelé.

#### Méthodologie

Dans notre laboratoire, au CECOS de Rennes, la vitrification a été introduite dès 2012 et, depuis janvier 2014, tous les ovocytes destinés au don sont vitrifiés.

- Nous utilisons un système de vitrification en système fermé, ce qui garantit une sécurité sanitaire optimale.
- Le système utilisé est le RAPID-IT<sup>TM</sup> VITRIFICATION SYSTÈME (VITROLIFE) associé au milieu de cryoconservation Vit Kit<sup>®</sup>-Freeze/Thaw (Irvine Scientific) selon les recommandations du fabricant.
- 2 ovocytes intacts sont attribués à chaque don sur 3 dons ce qui correspond à 6 ovocytes intacts au total par receveuse.



Vitrification ovocytaire



SmartBox<sup>TM</sup> (Vitrolife)



Ovocyte humain vitrifié

#### Résultats

| Don d'ovocyte (DO) asynchrone avec vitrification ovocytaire     | 100%  |
|---|-------|
| Ovocytes vitrifiés dans le cadre du don d'ovocytes :            | 779   |
| Taux de survie des ovocytes réchauffés                          | 78%   |
| Taux de fécondation des ovocytes ayant survécu au réchauffement | 72.5% |
| Taux de clivage des ovocytes fécondés                           | 98%   |
| Taux de grossesse clinique en DO                                | 22.8% |
| a. par transfert d'embryon frais                                |       |
| b. par transfert d'embryon issu d'ovocyte vitrifié/réchauffé.   | 22%   |

#### Conclusions

Grâce à la vitrification, une véritable banque d'ovocytes a pu être constituée, sur le même principe que la banque de sperme.

Nous pouvons proposer aujourd'hui une prise en charge optimale à nos patientes, en conservant les mêmes taux de grossesse avec des ovocytes vitrifiés qu'avec des ovocytes frais.

La vitrification ovocytaire permet ainsi une meilleure gestion de la liste d'attente, les délais étant particulièrement longs en France.

## **Séquençage à haut débit et diagnostic de pathologies monogéniques à haute hétérogénéité non allélique**

Jean-Louis MANDEL (IGBMC, Strasbourg)

De nombreuses maladies génétiques définies cliniquement sont caractérisées par une très importante hétérogénéité génétique non allélique, des mutations dans de nombreux gènes pouvant entraîner des expressions cliniques identiques ou très proches, et la recherche exhaustive de mutations devient impossible en pratique avec les stratégies « classiques » (séquençage capillaire, avec ou sans prescreening par analyse de fusion type HRM ou DHPLC). Or le diagnostic étiologique précis est essentiel pour le conseil génétique, et dans certains cas pour la prise en charge médicale et dans le futur pour des approches thérapeutiques mutations spécifiques ou de thérapie génique. Très récemment, l'introduction du séquençage à très haut débit a révolutionné les approches de génomique, et commence à trouver des applications dans l'identification de nouveaux gènes impliqués dans des maladies monogéniques. Mais les applications diagnostiques hors projet de recherche restent à développer, en tenant compte des aspects de coût, de fiabilité, et de complexité de l'analyse bioinformatique.

Nous proposons, à travers 3 pathologies hétérogènes, de développer des stratégies d'applications diagnostiques basées sur le séquençage à haut débit utilisant le séquenceur Illumina/Solexa (le plus répandu) et des stratégies de capture d'exons et de « DNA pooling ». Les 3 pathologies dont notre laboratoire diagnostic est un spécialiste reconnu, sont le syndrome de Bardet-Biedl, les ataxies (et notamment les ataxies récessives ou sporadiques) et enfin le retard mental lié au chromosome X. Une première étape de validation fera appel à des ADN porteurs de mutations connues, et sera suivie d'une étape de test d'ADN à mutations non connues. Nous calculerons le coût et l'efficacité des diverses stratégies testées.

### **Publication :**

Redin C, Gerard B, Lauer J, Herenger Y, Muller J, Quartier A, et al. Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. *Journal of Medical Genetics*. 1 nov 2014;51(11):724-36.

## Projet du Séquençage d'Exome de l'Homme Infertile

Ken McElreavey (Institut Pasteur)

Le séquençage d'exome entier est une technique efficace de séquençage des régions codantes de l'ensemble du génome humain permettant une stratégie, devenue abordable financièrement, d'identification de nouveaux gènes associés à des pathologies Mendéliennes communes ou rares. L'intérêt de cette technologie est d'identifier les variants fonctionnels responsables de la maladie sans le coût exorbitant du séquençage du génome entier ni l'aspect chronophage du séquençage de plusieurs gènes candidats. Environ 85% des mutations entraînant une pathologie sont localisées dans les régions codantes protéiques du génome. Le séquençage d'exome est donc logiquement devenu la méthode de choix pour l'identification des mutations pathogènes en génétique médicale sans connaissance à priori des gènes impliqués. L'objectif de ce projet est d'identifier les causes génétiques d'infertilité dans des groupes spécifiques d'hommes infertiles qui sont difficiles à analyser par les approches génétiques classiques. Les analyses vont inclure des individus présentant :

- (i) une azoospermie par arrêt en méiose
- (ii) une azoospermie par absence de cellules germinales (Sertoli cell Only)
- (iii) une tératozoospermie monomorphe
- (iv) une oligozoospermie avec anomalies de méthylation.

Nous proposons de réaliser un séquençage d'exome sur des échantillons d'ADN représentatifs de patients bien définis cliniquement et phénotypiquement dans chacun de ces groupes (total de 16 échantillons). L'Unité de Génétique du Développement Humain possède déjà une expertise dans ce domaine et maîtrise cette nouvelle technologie. L'ADN génomique est enrichi pour tous les exons puis le séquençage est réalisé en utilisant la technologie Life Sciences SOLiD system. Les analyses bioinformatiques complètes seront réalisées sur l'ensemble des datasets et les mutations pathogéniques potentielles identifiées seront validées par une confirmation moléculaire génétique ainsi que par des études fonctionnelles. Cette puissante approche devrait apporter un nouvel éclairage aux différentes formes d'infertilité masculine réfractaires jusqu'à présent aux analyses génétiques. Il en résultera de nouveaux diagnostics et de nouveaux tests pronostiques, fournissant de nouvelles informations sur la transmission et le risque de développer une infertilité aux générations futures issues des techniques d'Assistance Médicale à la Procréation.

## **Étude de la dynamique familiale et du processus de filiation chez des couples parentaux après assistance médicale à la procréation : Étude clinique comparative**

Nadjet NOURI (Université Paul Sabatier)

Les techniques de procréations médicalement assistées (AMP) qui ont été développées ces dernières années permettent à des couples infertiles, voire stériles, de procréer avec ou sans leurs gamètes. Ces couples deviennent parents en maintenant la filiation reconnue légalement comme étant charnelle, sans pouvoir cependant se représenter les effets subjectifs qui en découlent. Face à la multitude des discours suscités par ces techniques, il est opportun de s'intéresser au mode de réponse formulée par les parents, et en particulier à l'investissement paternel de l'enfant issu d'une telle intervention sur la réalité de la procréation par ces méthodes.

Dans ce contexte, l'étude clinique proposée dans cette recherche se base sur une analyse du discours des couples parentaux rencontrés lors d'un entretien semi-structuré en présence de leur enfant âgé de 6 à 9 ans, puis lors d'entretiens individuels avec chacun des membres de la famille (père, mère, enfant(s)). La population étudiée de couples présentant une infertilité d'origine masculine, comptera deux groupes : - un groupe de 30 couples ayant eu des enfants par AMP intraconjugale et un autre groupe formé de 30 couples ayant eu des enfants par AMP avec don de sperme.

Nous faisons l'hypothèse que ces techniques d'assistance à la procréation marquent l'identité parentale et nous pensons notamment retrouver dans notre échantillon des différences entre les couples ayant eu recours à une AMP avec ou sans don de sperme. Les résultats attendus de cette recherche vont permettre d'une part de repérer les indicateurs cliniques pouvant être pertinents pour les équipes de médecine de la reproduction dans la prise en charge proposée aux couples, et d'autre part d'analyser le mode du fonctionnement paternel, la filiation, et ses conséquences sur le destin de l'enfant.

## **Qualité du gamète mâle chez les hommes infertiles pris en charge en AMP : retentissement des folates sur l'épigénome**

Cécilia RAVEL (Institut Pasteur)

### **OBJECTIFS :**

- *Objectif principal*

Evaluer l'impact du traitement par folates sur la méthylation de l'ADN spermatique de patients infertiles avant prise en charge en Assistance Médicale à la Procréation.

- *Objectifs secondaires*

Evaluer l'efficacité du traitement par acide folique comparée à celle de son placebo chez des hommes infertiles sur le résultat de la prise en charge habituelle en FIV ± ICSI (taux de grossesse). Evaluer le retentissement des anomalies de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes et leur correction éventuelle après traitement sur les résultats de la prise en charge habituelle en FIV ± ICSI (taux de grossesse).

### **RESULTATS ATTENDUS :**

- corrélations indiquant des gènes ou des groupes de gènes (voies de signalisation, réseaux) qui présentent des altérations de méthylation chez l'homme en situation pathologique.
- déterminer si les profils de méthylation modifiés sont constants chez les patients eux-mêmes avec ou sans traitement par acide folique.

### **METHODOLOGIE :**

Dans le cadre du **PHRC (AOM 10052) FOLFIV**, l'impact des folates dans la prise en charge de l'infertilité masculine va être analysé par une grande étude multicentrique contrôlée randomisée en double insu comparant deux groupes parallèles de 390 patients dans chaque bras: Acide folique 15 mg/j versus placebo, par voie orale pendant 3 mois au minimum (durée d'un cycle de spermatogenèse).

Cette étude permettra d'évaluer l'efficacité du traitement par l'acide folique sur les paramètres spermatiques et sur la qualité nucléaire des gamètes et d'évaluer également l'impact du génotype MTHFR des patients sur les taux de grossesse et les paramètres masculins en fonction du traitement pris (acide folique ou placebo). Le recrutement des 780 patients va débuter dans les semaines à venir avec une durée d'étude prévue de trois ans.

**La présente demande concerne donc le financement des analyses de biologie moléculaire (génotypage, analyses de méthylation de l'ADN spermatique) des sujets de cette importante cohorte.**

Il s'agit de la première étude de grande envergure sur le sujet.

Poster

# Appel d'Offres

## « AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique »



### VITRIFICATION OVOCYTAIRE EN DON D'OVOCYTES Constitution d'une banque d'ovocytes



Deville M<sup>2</sup>, Lopes M<sup>1</sup>, Griveau JF<sup>1</sup>, Jouve G<sup>1</sup>, Veau S<sup>1</sup>, Morcel K<sup>2</sup>, Leveque J<sup>2</sup>, Kazdar N<sup>1</sup>, Viard P<sup>1</sup>, Ravel C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Service de Biologie de la reproduction-CECOS, CHU de Rennes, 16 Bd de Bulgarie, 35 000 Rennes

<sup>2</sup>Service de Gynécologie, CHU de Rennes, 16 Bd de Bulgarie, 35 000 Rennes

### Introduction

Grâce à la mise en place de la technique de vitrification (technique de congélation ultra-rapide des ovocytes) dans les centres d'AMP, l'organisation des traitements inhérents au don d'ovocytes a été bouleversée, offrant désormais un meilleur confort aux receveuses puisque le transfert embryonnaire peut à présent être programmé, selon les mêmes principes que ceux du transfert d'un embryon congelé.

### Méthodologie

Dans notre laboratoire, au CECOS de Rennes, la vitrification a été introduite dès 2012 et, depuis janvier 2014, tous les ovocytes destinés au don sont vitrifiés.

- Nous utilisons un système de vitrification en système fermé, ce qui garantit une sécurité sanitaire optimale.
- Le système utilisé est le RAPID-I<sup>TM</sup> VITRIFICATION SYSTÈME (VITROLIFE) associé au milieu de cryoconservation Vit Kit<sup>®</sup>-Freeze/Thaw (Irvine Scientific) selon les recommandations du fabricant.
- 2 ovocytes intacts sont attribués à chaque don sur 3 dons ce qui correspond à 6 ovocytes intacts au total par receveuse.



Vitrification ovocytaire



SmartBox<sup>TM</sup> (Vitrolife)



Ovocyte humain vitrifié

### Résultats

| Don d'ovocyte (DO) asynchrone avec vitrification ovocytaire     | 100%  |
|---|-------|
| Ovocytes vitrifiés dans le cadre du don d'ovocytes :            | 779   |
| Taux de survie des ovocytes réchauffés                          | 78%   |
| Taux de fécondation des ovocytes ayant survécu au réchauffement | 72.5% |
| Taux de clivage des ovocytes fécondés                           | 98%   |
| Taux de grossesse clinique en DO                                | 22.8% |
| a. par transfert d'embryon frais                                |       |
| b. par transfert d'embryon issu d'ovocyte vitrifié/réchauffé.   | 22%   |

### Conclusions

Grâce à la vitrification, une véritable banque d'ovocytes a pu être constituée, sur le même principe que la banque de sperme.

Nous pouvons proposer aujourd'hui une prise en charge optimale à nos patientes, en conservant les mêmes taux de grossesse avec des ovocytes vitrifiés qu'avec des ovocytes frais.

La vitrification ovocytaire permet ainsi une meilleure gestion de la liste d'attente, les délais étant particulièrement longs en France.

## Distribution de la consanguinité dans les communautés libanaises

Jean-Louis SERRE (Université de Versailles)

### 1- Contexte

Il peut être utile pour le conseil génétique et de l'AMP par fécondation *in vitro*, de disposer d'une mesure de la consanguinité afin de mieux évaluer des risques pathologiques et c'est une question récemment abordée par le groupe de travail « accueil de l'embryon » au sein de l'Agence de la Biomédecine.

Les mariages entre apparentés conduisent à la consanguinité de leurs descendants caractérisée par l'homozygotie par descendance (HBD : homozygote by descent) de nombreux segments du génome et à l'identité par descendance (IBD : identity by descent) du génotype pour de nombreux gènes.

Les tailles des zones HBD et la proportion du génome sous cet état augmentent avec la relation de parenté des conjoints, et la consanguinité augmente la fréquence des maladies récessives du fait de l'augmentation de la probabilité IBD aux locus des gènes impliqués dans ces maladies. L'estimation de la consanguinité « proche » résultant d'unions volontaires entre apparentés et de la consanguinité éloignée relevant de l'isolement populationnel et d'unions involontaires entre apparentés relève autant d'une finalité scientifique fondamentale (anthropologie, génétique des populations) que d'une finalité médicale et appliquée (santé publique, conseil génétique, AMP, évaluation des risques de pathologies récessives, cartographie des gènes impliqués dans celles-ci).

Les méthodes classiques d'évaluation de la consanguinité par l'analyse généalogique ou l'estimation des écarts à la panmixie pour des fréquences génotypiques de polymorphismes sont aujourd'hui relayées par des méthodes génomiques applicables à des centaines de milliers de polymorphismes de type SNP (single nucléotide polymorphism) dont les plus proches sont en déséquilibre de liaison et peuvent définir des blocs spécifiques d'un isolat. **2- Objectifs**

Le premier objectif est d'étudier la distribution HBD dans les génomes individuels de la population libanaise et de comparer les résultats obtenus en fonction de l'appartenance communautaire qui a une réalité politique, historique et humaine dans ce pays, les communautés Maronite, Grecque orthodoxe, Sunnite et Chiite, éventuellement une cinquième, Druze.

Le second objectif, méthodologique vis-à-vis de l'approche classique de la mesure généalogique de la consanguinité proche, est de valider cette méthode d'estimation de la consanguinité globale via la distribution et la taille des zones génomiques HBD afin d'en faire un outil de génétique des populations applicable aux études de populations et en médecine (conseil génétique ou AMP). **3- Résultats attendus** La réalisation des deux objectifs définis au paragraphe précédent.

### 4-Méthodologie

Le matériel est stocké dans la DNAtèque de l'unité de génétique médicale (UGM) de l'université Saint Joseph (USJ) de Beyrouth, partenaire de ce projet (échantillons d'ADN recueillis avec consentement pour la recherche).

L'analyse génomique a déjà commencé sur puces « Affymetrix cytogenetics 2.7 M arrays » et nécessite un complément de financement justifiant la demande de subvention à l'agence de la biomédecine.

Elle associe des partenaires spécialistes du domaine sur le plan théorique ou pratique.

Publication :

Jalkh N, Sahbatou M, Chouery E, Megarbane A, Leutenegger A-L, Serre J-L. Genome-wide inbreeding estimation within Lebanese communities using SNP arrays. *European Journal of Human Genetics* [Internet]. 26 nov 2014 [cité 19 juin 2015]; Disponible sur: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ejhg.2014.246>

Poster

# Appel d'Offres

## « AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique »

### Mesure de la consanguinité dans les communautés de la population libanaise

Jalkh N<sup>1,2</sup>, Sahbatou M<sup>3</sup>, Chouery E<sup>1</sup>, Megarbane A<sup>1</sup>, Leutenegger AL<sup>4,5</sup>, Serre JL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unité de Génétique Médicale et Laboratoire associé INSERM à l'Unité UMR\_S910, Faculté de Médecine, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Liban; <sup>2</sup> EA 2493 « pathologie cellulaire & génétique, de la conception à la naissance », Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, France; <sup>3</sup> Fondation Jean Dausset-CEPH, 27 rue Juliette Dodu, 75010 Paris, France; <sup>4</sup> Inserm, U946, 27 rue Juliette Dodu, 75010 Paris, France; <sup>5</sup> Université Paris Diderot, Institut Universitaire d'Hématologie, UMR-S946, 27 rue Juliette Dodu, 75010 Paris, France

#### La consanguinité

**Définitions**

- Consanguinité de l'individu I (Fi) probabilité que les deux exemplaires d'un gène soient copies identiques par descendance, d'un exemplaire de A, ancêtre commun de K et L.
- Parenté des parents (F<sub>ij</sub>) définie comme égale à la consanguinité d'un descendant commun (néé ou vécue).

**Mesure génétologique (formule de Malécot)**

$$F_i = f_{ii} = (F_{ij})^{i+1}$$

**Conséquences génétiques et épidémiologique**

- A l'échelle individuelle : la consanguinité augmente le taux d'homozygotie.
- A l'échelle de la population : la consanguinité se traduit par un excès de la consanguinité avec une incidence accrue des génotypes homozygotes, particulièrement pour les maladies autosomiques récessives.

#### Consanguinité immédiate et consanguinité diffuse

La formule simplifiée de Malécot peut prendre en compte tous les ancêtres communs, leur consanguinité et leur parenté.

$$F_i = f_{ii} = (F_{ij})^{i+1} + (F_{ij})^{i+1} f_{ij} + (F_{ij})^{i+1} f_{ij}$$

En réalité, l'information génétologique se limite aux ancêtres communs proches et ignore les ancêtres lointains, leur consanguinité et leur parenté, seule la consanguinité immédiate est facilement accessible.

$$F_i = f_{ii} = (F_{ij})^{i+1} + (F_{ij})^{i+1} f_{ij}$$

Cette consanguinité « masquée » (F<sub>ij</sub>, f<sub>ij</sub>) se diffuse peut être importante dans les populations de petite taille du fait de la dérive génétique et/ou dans les populations pratiquant les unions entre apparentés de façon récurrente.

#### Consanguinité (coefficients les plus fréquents)

à droite : deux ancêtres communs (germaines, oncle-nièce, cousins germains, cousins légitimes, seconds cousins etc...)

à gauche : un seul ancêtre commun connu (familles recomposées) ou non connu (exclusion de paternité, remariage)

#### Consanguinité (conséquences épidémiologiques)

Maladie autosomique récessive avec q > 10<sup>-4</sup>  
 >>> Fréquence des porteurs sans : 2q > 2.10<sup>-4</sup>

Couple panmixte probabilité que I soit atteint : 2q x 2q x f = q<sup>2</sup> = 10<sup>-4</sup>

Couple apparenté probabilité que I soit atteint :  
 - Hors effet de la consanguinité : q<sup>2</sup> = 10<sup>-4</sup>  
 - Par consanguinité 2q x f x f = Fq  
 - si f = 1/16 >>> Fq = 6.25.10<sup>-4</sup> soit 625 fois plus

Dans la population, l'incidence de la maladie est égale à q<sup>2</sup> + Fq  
 où F est la moyenne des f individuels

**F peut être fortement sous évalué si la consanguinité diffuse est importante et ignorée**

#### L'analyse génomique de la consanguinité au Liban - Méthodologie

**Objectifs**

- Réaliser une estimation moins sous évaluée de la consanguinité par l'évaluation de la consanguinité « masquée » ou diffuse par la mesure de l'homozygotie génomique
- Caractériser la distribution génomique de l'homozygotie chez les individus issus de couples apparentés ou non
- Évaluer les variations entre communautés et tester leur proximité phylogénétique

**Méthode**

L'analyse génomique par puce ADN d'un génome individuel permet d'identifier des zones LOH (loss of heterozygosity) sur un nombre significatif de SNP contigus

- La distribution de la taille des LOH permet de différencier les individus issus de couples apparentés ou non
- Le rapport de la somme des longueurs des LOH à la longueur totale du génome permet d'estimer la part homozygote (GH = genomic homozygosity) de chaque génome individuel scanné
- La fraction GH, corrigée de la valeur basale trouvée égale à 1% dans des populations panmixtes de référence (HapMap), mesure la fraction HBD (homozygosity by descent) de génome
- cette fraction HBD est une mesure directe de la consanguinité diffuse chez les individus non consanguins, elle s'ajoute à la consanguinité immédiate chez les individus consanguins

#### L'analyse génomique de la consanguinité au Liban - Mise en œuvre

**Matériels analysés**

- un échantillon de 165 individus sans parenté
- étréteillé selon deux critères :
  - leur appartenance communautaire (chrétiens, maronites, orthodoxes, sunnites)
  - leur statut génétique (enfant de parents cousins germains ou non apparentés, avec trois générations de croisement)

**Puces utilisées**

- Affymetrix Genome Wide Human SNP Array 6.0 (60 échantillons), portée de 1.8M sondes (500 KSNP et 500 000 sondes non polymorphes par SNP)
- Affymetrix CytoScan 2.3M Whole-Genome Microarray (75 échantillons) portée de 405 000 SNPs et de 2.7 millions de séquences non polymorphes par SNP

#### L'analyse génomique de la consanguinité au Liban - Résultats

| Longueur des LOH                    | Nombre moyen de LOH par individu | 0-1 Mb (%) | 1.001-2 Mb (%) | 2.001-3 Mb (%) | 3.001-10 Mb (%) | >10.001 Mb (%) |
|-------------------------------------|----------------------------------|------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| Individus non consanguins           | 70                               | 10.3       | 74.1           | 7.4            | 5.1             | 3.1            |
| Individus issus de cousins germains | 74                               | 8.4        | 61.4           | 8.9            | 14.3            | 7.0            |

**Distribution de la taille des fragments LOH chez individus consanguins ou non**

- Augmentation de fréquence des LOH de grande taille (supérieure à 3Mb) chez les enfants de cousins germains versus les individus répertoriés non consanguins (cercle rouge) correspond à l'effet de la consanguinité immédiate
- La persistance de fragments LOH de grande taille chez des individus a priori non consanguins (cercle vert) est la manifestation de la consanguinité diffuse (ces fragments de taille supérieure à 3 Mb sont inexistant ou très rares dans les populations panmixtes)

#### L'analyse génomique de la consanguinité au Liban

Validation par application de l'algorithme Festim à un sous échantillon de 90 individus

L'algorithme Festim permet, à partir des fréquences des SNP de déterminer le seul d'homozygotie attendu sous la panmixie et d'estimer la valeur de l'écart résultant de la consanguinité

Festim identifie tous les individus répertoriés comme consanguins sauf un plus des individus issus de parents non apparentés dont le niveau de consanguinité diffuse est élevé (cercles violets)

Comm1 : Chrétiens, Comm2 : Maronites, Comm3 : Grecs-Orthodoxes, Comm4 : Sunnites, Comm5 : NA, Comm6 : CG

164 individus issus de parents non apparentés et CG : individus non de parents cousins germains. La ligne pointillée représente le seul écart attendu sous la panmixie.

#### L'analyse génomique de la consanguinité au Liban

Partage des LOH entre communautés

Les observations sont cohérentes avec l'hypothèse d'une origine phylogénétique commune des quatre communautés libanaises étudiées :

- Le profil de distribution de la taille des LOH est semblable, qu'ils soient spécifiques d'une communauté ou partagés entre deux, trois ou quatre communautés
- la taille moyenne des LOH diminue avec le niveau de partage attestant de l'origine commune et de l'effet de la dérive génétique résultant de la séparation religieuse.

#### L'analyse génomique de la consanguinité au Liban

Analyse des données en composantes principales

L'analyse en composante principale confirme l'analyse des LOH partagées entre les quatre communautés étudiées (1 : chrétiens, 2 : maronites, 3 : grecs orthodoxes, 4 : sunnites)

Elle illustre leur origine phylogénétique commune et locale



## **Syndrome d'hyperstimulation ovarienne et activation endothéliale : caractère prédictif du dosage de microparticules endothéliales**

Antoine TORRE (Hôpital Intercommunal de Poissy Saint Germain en Laye)

**Introduction** : Le syndrome d'hyperstimulation ovarienne (HSO) est une complication peu prévisible et purement iatrogène des cycles de stimulation ovarienne, d'autant plus fréquente que la réponse à la stimulation est forte. Sa physiopathologie reste mal connue. Sa forme grave touche 0.2 à 1% des cycles de stimulation ovarienne, découle de troubles de perméabilité vasculaire et d'une tendance à l'hypercoagulabilité, requiert parfois des soins intensifs et peut être mortelle.

Associant classiquement dysfonction endothéliale et hypercoagulabilité, le phénomène d'activation endothéliale pourrait être le dénominateur commun conduisant au syndrome d'hyperstimulation ovarienne, voire en constituer le terrain ou en prédire la gravité, comme cela a déjà été montré dans de nombreuses pathologies (accident vasculaire cérébrale, infarctus, lupus...). L'activation endothéliale n'a pourtant pas été explorée en cas d'HSO.

**Objectifs** : Evaluer le dosage sérique de microparticules endothéliales (marqueur original d'activation endothéliale) comme prédictif de la survenue du syndrome d'hyperstimulation ovarienne. Etudier l'hypercoagulabilité et l'altération de la perméabilité endothéliale associées à la mise en évidence de ce marqueur.

**Méthodologie** : Etude cas-témoins appariée :

- Evaluant rétrospectivement l'évolution de
  - o marqueurs d'activation endothéliale (microparticules endothéliales, E-sélectine)
  - o marqueurs procoagulants (microparticules plaquettaires, érythrocytaire, leucocytaire, facteur Von Willbrand, facteur thrombine anti thrombine, fragment 1+2 de la prothrombine)
  - o marqueur de la disjonction endothéliale (CD 146 soluble)
- tout au long de cycles de stimulation ovarienne, -
  - o en comparant trois groupes de patientes
    - o le groupe « cas » ayant finalement développé un syndrome d'hyperstimulation ovarienne
    - o le groupe « témoins à haut risque » n'ayant pas développé d'HSO malgré une réponse à la stimulation ovarienne équivalente à celle des cas
    - o le groupe « témoins à bas risque » n'ayant développé ni forte réponse à la stimulation ni HSO.

**Résultats attendus** :

- mise en évidence du phénomène d'activation endothéliale comme prédicteur de survenue d'HSO
- meilleure compréhension de la physiopathologie de l'HSO, notamment des relations entre hypercoagulabilité et troubles de la perméabilité vasculaire

**Aspects originaux et perspectives** : Recherche originale du phénomène d'activation endothélial au cours de cycles de stimulation ovarienne, compliqués ou non de syndrome d'hyperstimulation ovarienne.

La meilleure compréhension du mécanisme physiopathologique de l'HSO apportée par cette étude, comme la mise en évidence d'un éventuel caractère prédictif du dosage des microparticules, permettra l'émergence de prise en charge novatrice, préventives ou thérapeutiques, pour une pathologie qui pour l'instant reste imprévisible, redoutée et peu accessibles aux traitements conventionnels.