

**APPEL D'OFFRES 2012**  
**« AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique »**  
**Résumés résultats et publications**

Chercheur	Sujet de recherche	THEME
<b>BEAUQUIER Bérengère</b>	<a href="#">Soigner, soulager, revisiter le deuil prénatal et accompagner la famille lors de la grossesse suivante. Quelles traces du prénatal dans le lien à l'enfant puîné ?</a>	2
<b>BENCHAIB Mehdi</b>	<a href="#">Le ratio Histone/Protamine spermatique : épigénétique, facteur pronostique et diagnostique en Assistance Médicale à la Procréation</a>	4
<b>CHALAS Céline</b>	<a href="#">Cryopréservation du sperme des adultes blessés médullaires : intérêt et modalités. Etude prospective multicentrique</a>	4
<b>DAVID Véronique</b>	<a href="#">Amélioration du diagnostic de l'holoprosencéphalie : identification de nouveaux gènes par séquençage haut-débit</a>	3
<b>DOS SANTOS Esther</b>	<a href="#">Leptine et interface fœto-maternelle : Implication dans les échecs d'implantation et les fausses couches à répétition</a>	3
<b>DUPONT Joëlle</b>	<a href="#">Adipocytokines et qualité des gamètes</a>	4
<b>DURANTHON véronique</b>	<a href="#">Effet de la culture in vitro sur l'hydroxyméthylation de l'ADN embryonnaire : Comparaison de deux milieux utilisés en AMP</a>	2
<b>FAUQUE Patricia</b>	<a href="#">Contrôle des transposons et reproduction : évaluation des risques en assistance médicale à la procréation chez la souris</a>	2
<b>FREOUR Thierry</b>	<a href="#">Combinaison de l'Embryoscope et du dosage du G-CSF folliculaire comme biomarqueurs pronostiques du potentiel implantatoire</a>	3
<b>JONVEAUX Philippe</b>	<a href="#">Etude de l'impact diagnostique d'une puce ADN conçue pour l'identification de remaniements génomiques associés à la déficience intellectuelle</a>	3
<b>JOUANNIC Jean-Marie</b>	<a href="#">Etude DACCI : Devenir des enfants après diagnostic prénatal d'agénésie isolée du corps calleux</a>	1
<b>LAUGEL Vincent</b>	<a href="#">Validation d'une approche diagnostique de référence pour le syndrome de Cockayne et les phénotypes apparentés</a>	3
<b>LEANDRI Roger</b>	<a href="#">Détection de la présence de bisphénol A dans les milieux de culture d'embryons humains</a>	2
<b>MANDEL Jean-Louis</b>	<a href="#">Séquençage à haut débit et diagnostic de la déficience intellectuelle (retard mental)</a>	3
<b>VINCENT Marie-Claire</b>	<a href="#">Diagnostic Prénatal Non Invasif (DPNI) de la Mucoviscidose par MEMOPCR en temps réel</a>	3

## **THEMES DE RECHERCHE**

- 1) Sciences humaines, économiques et sociales : études dans le domaine de la santé publique / épidémiologie et/ou de l'éthique**
- 2) Sécurité et qualité des pratiques, en matière d'assistance médicale à la procréation, de diagnostic prénatal et préimplantatoire, et de génétique**
- 3) Amélioration des méthodes et techniques en matière d'assistance médicale à la procréation, de diagnostic prénatal et préimplantatoire, et de génétique**
- 4) Qualité des gamètes**

## **Soigner, soulager, revisiter le deuil prénatal et accompagner la famille lors de la grossesse suivante. Quelles traces du prénatal dans le lien à l'enfant puîné**

Bérengère BEAUQUIER (Service de Pédiopsychiatrie, hôpital Necker, Paris)

### **Introduction**

La grossesse suivant un décès prénatal sera empreinte des traces de l'expérience précédente. Les représentations parentales activées auront un impact sur l'attachement à l'enfant puîné.

Hypothèse principale

La grossesse suivant une interruption médicale de grossesse est une grossesse à risque psychique dans la construction du lien avec l'enfant à venir. La réactivation du processus de deuil fait osciller la femme enceinte entre deux polarités : élaboration créative et deuil pathologique figé. L'élaboration du deuil sera un facteur déterminant dans la construction du lien « fœtusbébé »/parents.

### **Objectif principal**

Evaluation des remaniements psychiques lors de la grossesse suivant un deuil périnatal, en fonction de la prise en charge au moment du décès et durant la grossesse actuelle et observation de l'impact de ce travail psychique sur le lien avec l'enfant à naître.

### **Objectifs secondaires**

Evaluation de l'impact de la prise en charge lors du décès périnatal (rencontre ou non avec le bébé décédé, inscription à l'état civil, obsèques, suivi psychologique) alors que la prise en charge médicale de la grossesse suivante entre en résonance avec les représentations parentales. Evaluation de l'attachement à l'enfant puîné en fonction de l'attachement prénatal, lui-même corrélé aux antécédents obstétricaux, au deuil (dépression, anxiété, stress post-traumatique) Evaluation de la dynamique de couple et de la dynamique familiale.

Critère d'évaluation principal

Analyse qualitative à partir d'entretiens semi-structurés de la narrativité des femmes sur leur vécu du deuil, de la grossesse suivante et de l'attachement à l'enfant puîné et leurs représentations.

### **Critères d'évaluation secondaires**

Evaluation :

- du deuil périnatal au moyen de la Perinatal Grief Scale
- de la dépressivité des femmes au moyen de l'Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) adaptée au prénatal.
- de l'anxiété des femmes au moyen de STAI, échelle permettant de distinguer l'anxiété trait de l'anxiété état.
- du risque de survenue d'un syndrome de stress post-traumatique au moyen de l'échelle PPQ.
- de la satisfaction conjugale au moyen de l'échelle DAS.
- des représentations prénatales de l'attachement parental.
- de la perception du tempérament de l'enfant au moyen de l'échelle EITQ.
- des interactions familiales au moyen du Lausanne triadic play.
- de l'attachement aux figures maternelle et paternelle au moyen de la Strange Situation.

**Méthodologie** : Recherche – action.

Etude prospective avec une part rétrospective, observationnelle et qualitative.

Constitution d'un groupe de patientes ayant un antécédent d'IMG à la grossesse précédente et d'un groupe témoin de patientes enceintes de leur deuxième grossesse.

Les évaluations auront lieu à 17, 27 et 35 semaines de grossesse, puis à 3 mois et 18 mois de l'enfant. **Nombre de sujets nécessaires** : 80 patientes.

**Critères d'inclusion** :

Femmes âgées de 18 à 43 ans, parlant français, ayant un antécédent d'IMG pour pathologie fœtale à la grossesse précédente après 14SA ou enceinte de leur deuxième grossesse.

L'IMG aura eu lieu au maximum 2 ans auparavant. Patiente ayant une couverture sociale.

Consentement signé.

**Critères de non inclusion** : Pathologie psychiatrique avérée.

**Déroulement de l'étude** : inclusion de 2 patientes par mois dans chaque site.

**Durée totale de l'étude** : 44 mois

**Période d'inclusion** : 20 mois

**Durée de participation pour un patient** : 24 mois –

**Risque** : aucun

Agence de la biomédecine

**Lieu de la recherche** : service de maternité de Necker et de Trousseau.

**Retombées scientifiques et en terme de santé publique** :

Modèle d'élaboration du deuil périnatal. Meilleure connaissance des représentations des familles permettant un meilleur ajustement des soins en vue d'une protocolisation du suivi d'une grossesse suivant un décès périnatal. Prévention de la dépression du post-partum et de ses conséquences sur le bébé.

**Point de vue éthique** : Bénéfices attendues pour les patientes de par la recherche-action. Un suivi psychologique complémentaire est possible si besoin (à la demande de la patiente ou de l'équipe soignante)

# Soigner, Soulager et Revisiter le deuil prénatal et Accompagner la famille lors de la grossesse suivante. Quelles traces du prénatal dans le lien à l'enfant puiné ?

## Attachement prénatal, anxiété, deuil et dépression dans la grossesse suivant une Interruption Médicale de Grossesse.

Beauquier-Miccotta Bérengère (1), Shulz Jessica (2), De Wally Diane (3), Melot Marie-Emmanuelle (4), Soubieux Marie-José (5), Salomon Laurent J. (3), Golse Bernard (1), Yves Ville (3), Missonnier Sylvain (2).

### Introduction

Un deuil prénatal va engendrer pour les parents un remariement profond et durable aussi bien au niveau psychologique, physique que social, et cela à long terme.

La grossesse suivante peut-être attendue comme une expérience réparatrice et en même temps engendre une crainte de répétition. D'un côté des symptômes anxieux et dépressifs et post traumatiques peuvent être présents (Armstrong 2002; Gong 2013, Hugues 2002) et de l'autre un attachement prénatal plus bas a aussi pu être décrit (Armstrong 1998).

La loi française autorise les Interruptions Médicales de Grossesse (IMG) quelque soit le terme de la grossesse, si le fœtus est atteint d'une affection d'une particulière gravité, incurable au moment du diagnostic. En France, environ 7000 IMG sont pratiquées chaque année, après évaluation et accord d'un CPDPN (Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal).

Peu d'étude ée ont menée avant la note sur les grossesses suivant une interruption médicale de grossesse pour pathologie foetale.

### Objectifs

Cette recherche vise à évaluer la dynamique psychique de la femme enceinte durant la grossesse suivant une interruption médicale de grossesse. La résurgence du deuil, son évolution, et son influence sur le lien au fœtus seront étudiés.

Résultats attendus

- Montrer l'existence d'un deuil actif et son évolution au cours de la grossesse et du post partum.
- Décrire l'évolution de l'attachement prénatal et sa corrélation au deuil
- Montrer la prévalence d'anxiété, de symptômes dépressif et de stress post traumatique, et leur évaluation au fil de la grossesse et du post partum.

### Resultats

25 femmes ont acceptées de participer à la recherche sur 48 présentant les critères d'inclusions.

- **L'attachement prénatal :**

Les scores au PAI sont significativement inférieurs aux scores des témoins à T1.

L'attachement prénatal cesse de croître en fin de grossesse.

- **STAI :**

L'anxiété Etat est élevée tout au long de la grossesse pour 60% des femmes

- **PCL-S :**

Un stress post traumatique est encore présent pour 25% des femmes à T1, disparaît ensuite.

- **EPDS :** la symptomatologie dépressive est présente chez 30% des femmes à T1.

- **PGS :**

Les symptômes du deuil sont présents au début de la grossesse, corrélés aux symptômes dépressifs.

### Conclusion

Le vécu de la grossesse suivant une interruption médicale pour pathologie foetale est marqué par une souffrance psychique exprimée par des symptômes dépressifs et post traumatiques en début de grossesse. Toute la grossesse reste marquée par une anxiété élevée. L'attachement prénatal, premier jalon du lien à l'enfant à venir connaît aussi une dynamique modifiée, il est plus bas début de grossesse et cesse de croître en fin de grossesse, malgré des échographies rassurantes sur la santé du bébé à naître.

Ainsi, si les symptômes aigus du deuil ne semblent marqués qu'en début de grossesse, l'investissement du bébé à venir est tout de même modifié par ce vécu précédent.

Les professionnels de santé se doivent donc :

- D'avertir précocement les femmes qu'une grossesse après une IMG peut être une étape complexe et qu'un suivi psychologique peut leur être proposé.
- D'être vigilant à soutenir les femmes jusqu'au terme de la grossesse suivante alors même que les données médicales sont rassurantes.

- 1) Service de Pédiopsychiatrie, Hôpital Universitaire Necker Enfants Malades, Paris, France
- 2) Laboratoire PCPE Institut de Psychologie, Paris Descartes.
- 3) Service de Pédiopsychiatrie, Hôpital Universitaire de Strasbourg.
- 4) Centre Périnatal du Boulevard Bruene, Hôpital St Anne.
- 5) Maternité et diagnostic antenatal, Hôpital Universitaire Necker Enfants Malades Paris, France.

### La grossesse suivant une IMG

Les interruptions médicales de grossesse (IMG) induisent un processus spécifique de deuil du fait que les parents prennent part à la décision d'interruption. Certains auteurs ne font pas de distinction entre les différents types de deuil prénatal (Chojenta 2014), et du fait de cadres législatifs différents selon les pays, ces deuils suivants une IMG sont moins décrits dans littérature internationale. Néanmoins, les couples qui décident d'une interruption de grossesse après avoir appris que le fœtus était porteur d'une pathologie grave doivent faire face, non seulement à la perte, mais aussi aux sentiments de culpabilité ou de honte qui les traversent, sentiments liés tant à la prise de décision qu'à la pathologie elle-même (Robinson 2014, Shulz 2016). Très peu d'études se sont pour l'instant intéressées à la grossesse suivant une IMG. L'une d'entre elle souligne que le deuil prénatal peut durer deux ans et que la grossesse suivante est caractérisée par des peurs, des inquiétudes et une grande incertitude (Wollenschein 2007). Une autre met en évidence que les interactions mères-enfant peuvent être altérées (Alexander 2016). A ce jour, aucune étude ne s'était encore spécifiquement centrée sur l'évolution de l'attachement prénatal, première étape de la construction du lien mère-enfant (Lumley 1972, Brandon 2009), au cours d'une grossesse suivant une IMG. Le premier objectif de cette étude est d'évaluer l'évolution de l'attachement prénatal tout au long d'une grossesse suivant une IMG, et ses corrélations avec l'anxiété, la dépression et le processus de deuil chez la femme enceinte.

### Méthodologie

**Critères d'inclusions**

Femmes enceintes d'une grossesse qui suit une IMG survenue après 15 SG (Semaine de Grossesse). Pas de complications maternelles ou foetales durant la grossesse actuelle.

**Déroulement de l'étude**

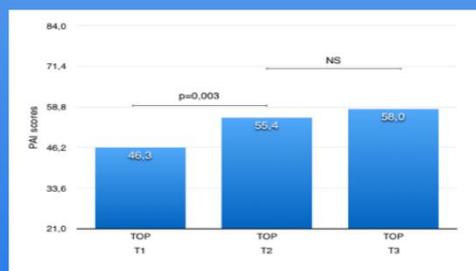
Les femmes sont rencontrés à 3 temps de la grossesse T1=20 SG T2= 27 GS; et T3= 37 SG.

**Considérations éthiques**

Notre protocole a été approuvé par un CPP.

**Outils**

Un entretien spécifique a été proposé aux femmes à chaque temps de l'évaluation, reprenant le vécu de la grossesse précédente et de la grossesse actuelle. Des auto-questionnaires ont été proposés à chaque évaluation : EPDS (Edinburg post natal depression), STAI (State Trait Anxiety Inventory), PAI (Prenatal Attachment Inventory), PGS (Prenatal Grief Scale).



## **Le ratio Histone/Protamine spermatique : épigénétique, facteur pronostique et diagnostique en Assistance Médicale à la Procréation**

Mehdi BENCHAIIB (U846 "Stem cell and brain research institute", CHU Lyon)

### **1-Contexte**

Actuellement 2,5% des enfants sont conçus par l'Assistance Médicale à la Procréation (AMP). Dans au moins 50% des cas d'infertilité, une cause masculine est en jeu. L'évaluation de la fertilité masculine reste essentiellement basée sur le spermogramme, et sur la fragmentation de l'ADN spermatique. Ces explorations ne permettent pas d'élucider tous les cas d'infertilité masculine. La fonction nucléaire a été abordée par notre équipe sous l'angle épigénétique, en étudiant la méthylation de l'ADN. Celle-ci n'en constitue pas le seul support. Cependant, les éléments à quantifier pour explorer les différentes modifications épigénétiques sont trop nombreux pour être mis en œuvre dans le cadre de l'AMP. L'idéal serait de disposer d'un marqueur pronostic global de la qualité spermatique nucléaire qui puisse être utilisé systématiquement en AMP.

### **2-Objectifs**

Le but de notre projet est de développer un nouveau facteur pronostic de la qualité spermatique, en vue d'améliorer la prise en charge des hommes, et le taux de réussite en AMP. Un certain nombre de travaux suggèrent que le ratio Histone/Protamine est un candidat pertinent. Nous avons initié le développement d'un test d'analyse de ce ratio, chez les patients entamant une procédure d'AMP. Le taux Histone/Protamine apportera des informations complémentaires au taux de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI) utilisé dans notre centre. Cette étude se déroulera en plusieurs étapes qui correspondent à nos principaux objectifs :

- 1. La définition d'un protocole d'extraction de l'ADN spermatique et de quantification du ratio Histone/Protamine parfaitement reproductible.**
- 2. La définition de valeurs de références à partir d'une population d'hommes fertiles (donneurs de sperme).**
- 3. La quantification de l'impact du ratio Histone/Protamine sur l'obtention d'embryons, la qualité de ces embryons, leur évolutivité et l'obtention de grossesse.**
- 4. La validation de la pertinence du test sur un échantillon large (295 couples).**

### **3-Résultats attendus**

- La mise en place d'une procédure de prescription de cet examen (examen de première ou de deuxième intention) pour améliorer la prise en charge des patients. - La quantification de l'apport du ratio Histone/Protamine par rapport au DFI et la construction d'un facteur synthétique à partir de ces deux facteurs. La création d'un facteur synthétique intégrant ces mesures permettra de cumuler le pouvoir pronostic de ceux-ci et entraînera une augmentation significative de la sensibilité et de la spécificité.

### **4-Méthodologie**

Les couples seront recrutés au cours d'une consultation par un des médecins impliqués dans l'étude. Le recrutement du groupe des hommes donneur de sperme (population de référence à fertilité prouvée) sera constitué lors d'un entretien au CECOS, afin d'établir des valeurs de référence pour le ratio Histone/Protamine en relation avec la fertilité. La chromatine spermatique sera séparée en deux fractions : une fraction HDNA correspondant à l'ADN fixé aux histones et une fraction PDNA correspondant à l'ADN fixé aux protamines. La quantification sera réalisée en densitométrie optique. Le ratio Histone/Protamine correspond un ratio global, et n'est pas obtenu à partir d'un type particulier d'histone ou de protamine. Le ratio sera calculé à partir de ces mesures en tenant compte des facteurs de dilution (volumes de reprise chaque fraction). L'analyse statistique réalisée mettra en œuvre les tests nécessaires (monovariés et multivariés) afin de rechercher l'existence d'une liaison entre le ratio Histone/Protamine et l'obtention de grossesse en tenant compte des principaux facteurs de confusions.

### **Publication :**

Fournier C, Labrune E, Lornage J, Soignon G, Giscard d'Estaing S, Guérin J-F, et al. The impact of histones linked to sperm chromatin on embryo development and ART outcome. *Andrology*. mai 2018;6(3):436-45.

## Le ratio Histone/Protamine spermatique : épigénétique, facteur pronostique et diagnostique en Assistance Médicale à la Procréation.

FOURNIER C<sup>2</sup>, SOIGNON G<sup>1,2,3</sup>, GISCARD D'ESTAING S<sup>2,3</sup>, LORNAME J<sup>2,3</sup>, BENCHAIIB M<sup>1,2,3</sup>.

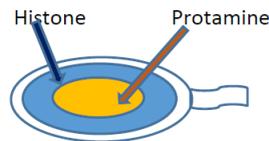
<sup>1</sup>. Université Claude Bernard, Faculté de Médecine Lyon Est, Lyon, France.

<sup>2</sup>. Inserm U846, 18 avenue Doyen Lépine 69675 Bron cedex, France.

<sup>3</sup>. Hospice Civil de Lyon, HFME, Biologie de la Reproduction, 59 Boulevard Pinel 69500 Bron, France.

Email: [mehdi.benchaib@chu-lyon.fr](mailto:mehdi.benchaib@chu-lyon.fr)

**Introduction :** Actuellement 2% des enfants sont conçus par l'Aide Médicale à la Procréation (AMP). Parmi les causes d'infertilité, dans environ 50% des cas, une cause d'origine masculine est incriminée. Dans le but d'orienter le patient vers la technique d'AMP la mieux adaptée, de nombreux examens sont réalisés. Cependant ces derniers n'examinent pas toutes les facettes des spermatozoïdes et il est nécessaire de mettre en place d'autres tests permettant d'apprécier leur pouvoir fécondant. Le taux d'histone restant au sein du noyau spermatique serait un indicateur de la maturité nucléaire spermatique (Figure 1). Le but de ce travail est de valider l'intérêt de la mesure du ratio d'Histone résiduel dans le cadre de l'AMP.

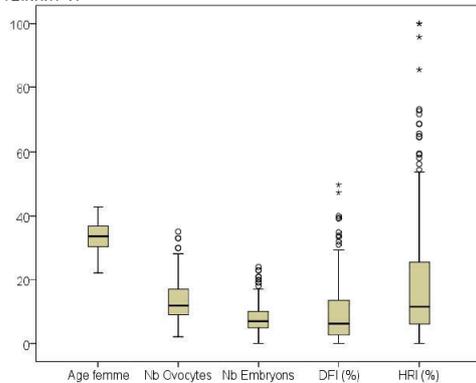


$$\text{HRI} = \frac{\text{Histone}}{\text{Histone} + \text{Protamine}}$$

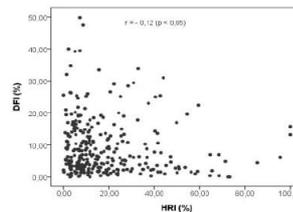
**Figure 1:** Localisation des histones et des protamines dans la tête d'un spermatozoïde.

**Matériels & méthodes :** Une étude prospective a été réalisée à l'HFME (Bron, France). 291 tentatives de Fécondation *in vitro* (FIV-c ou ICSI) réalisées entre le mois d'Octobre 2013 et le mois de Juillet 2015 ont été incluses. Les paramètres d'exclusions ont été : l'utilisation d'un sperme cryoconservé, un nombre total de spermatozoïdes inférieur à 40 millions. L'Index du Ratio Histone (HRI), a été calculé à partir du protocole décrit par Wikes (2003). La fragmentation de l'ADN (DFI) a été quantifiée par la technique TUNEL.

**Résultats :** 42 FIV-c et 249 ICSI ont été réalisées. L'âge moyen des femmes était de 33,7 ans, 3850 ovocytes ont été ponctionnés, ce qui a permis l'obtention de 2199 embryons : 307 embryons en FIV-c et 1892 embryons en ICSI. Un total de 511 embryons ont été transférés et 334 ont été congelés. Le taux de HRI moyen était de 18,9% et le DFI moyen de 9,9% (Figure 2).

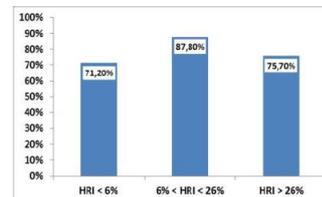


**Figure 2:** Diagramme de Tuckey des principales variables.



Il existe une corrélation négative significative entre le HRI et le DFI ( $r = -0,12, p < 0,05$ ) (Figure 3).

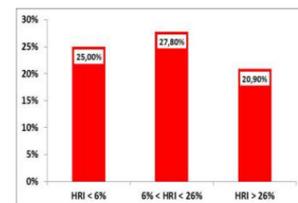
**Figure 3:** Diagramme de dispersion entre le HRI et le DFI.



Il existe une liaison significative entre le HRI et l'obtention de blastocyste ( $p < 0,01$ ) (Figure 4)

**Figure 4:** Taux d'obtention de blastocystes en fonction du HRI.

Le taux de grossesse est optimum lorsque le HRI est compris entre 6% et 26% (taux de grossesse = 27,8%). Il est plus bas lorsque le HRI est inférieur à 6% ou supérieur à 26% (Figure 5).



**Conclusion :** Le HRI est un reflet de la protamination spermatique. Le HRI moyen retrouvé dans cette étude est dans l'intervalle des valeurs décrites dans la littérature. Ce résultat confirme la validité des résultats obtenus avec le protocole de mesure que nous utilisons. Le HRI semble être un facteur de maturité nucléaire spermatique pertinent. Ce facteur est faiblement corrélé avec le DFI, il apporte donc une information complémentaire. Le HRI semble donc un facteur spermatique ayant un rôle dans le développement embryonnaire et dans l'obtention de grossesse. Toutefois, il est nécessaire d'augmenter l'effectif des cycles afin d'augmenter la puissance de l'analyse statistique. Un nouveau facteur pour apprécier la qualité du noyau spermatique est donc à notre disposition. Dans un second temps il sera nécessaire de mettre en évidence les pathologies à l'origine des altérations du HRI et de trouver des traitements adaptés, ceci permettra d'améliorer le taux de réussite en AMP.

## **Cryopréservation du sperme des adultes blessés médullaires : intérêt et modalités. Etude prospective multicentrique**

Céline CHALAS (histo-embryologie de la reproduction, hôpital Cochin, Paris)

Les hommes traumatisés du rachis, para ou tétraplégiques, présentent le plus souvent une infertilité due, entre autre, à une altération de la qualité du sperme en particulier de la mobilité et de la vitalité. Plusieurs mécanismes sont proposés: diminution de la fréquence des éjaculations, infections urinaires et séminales récidivantes, existence d'un syndrome inflammatoire (SI) et d'un stress oxydatif (SO). Or il n'existe pas en France d'étude du sperme de ces hommes qui permettrait d'identifier des facteurs aggravants de sa qualité et des moyens de les prévenir.

**Objectif** : Etudier l'évolution des paramètres du sperme pendant 2 ans en tenant compte du mode mictionnel, des infections uro-génitales, du SI et du SO. L'évaluation de ces événements et de leurs répercussions permettra **d'identifier un ou des facteurs de risque de dégradation du sperme et de définir une stratégie de prise en charge à long terme** pour éviter le recours à l'AMP lourde soit en cryopréservant le sperme et/ou en prévenant les facteurs de risque. **Critère d'évaluation principal** : Etude de l'évolution du pourcentage de spermatozoïdes vivants (vitalité) sur 4 éjaculats pendant deux ans.

**Résultats attendus**: En l'absence de l'étude, la plupart de ces jeunes hommes ont recours à une AMP lourde (allant jusqu'à la biopsie testiculaire). La conservation de sperme se fait donc à la demande du patient soit parce que celui-ci exprime la crainte d'une dégradation du sperme soit lors d'un recours programmé à la fécondation in vitro où la congélation préalable de sperme est de règle afin d'éviter d'éventuels échecs de recueils le jour de la tentative. Par ailleurs, Il n'y a pas de politique de sauvegarde de la fertilité de ces hommes puisqu'ils ne sont vus qu'une fois en Biologie de la Reproduction lors du rendez-vous pour le prélèvement de sperme.

Le bénéfice attendu de l'étude est de pouvoir répondre à la question de la cryoconservation du sperme dans cette population et dans quel contexte : pour tous ou pour un sous-groupe où des facteurs de risques de dégradations du sperme auront pu être identifiés. La variation de la vitalité dans le temps sera le critère de jugement. Par ailleurs une meilleure connaissance des mécanismes de dégradation en cause pourrait permettre de définir des stratégies afin de limiter voir de supprimer ces facteurs de risque afin de favoriser la fertilité naturelle de ces patients.

**Méthodologie** : Analyse du sperme de 100 patients blessés médullaires recrutés sur 6 centres en France et sur 4 éjaculats pendant 2 ans. L'éjaculation sera obtenue spontanément ou par stimulation vibratoire pénienne. Seuls les hommes ayant une éjaculation antérograde stricte seront inclus dans l'étude.

Les examens du spermogramme, du syndrome inflammatoire, de la bactériologie et de la biochimie séminale seront réalisés par chacun des centres. Les examens concernant l'étude du stress oxydatif, mesure de la fragmentation de l'ADN, des dérivés oxydés des bases puriques (8OHdG) et des protéines carbonylées dans le sperme seront centralisés sur Cochin.

## **Amélioration du diagnostic de l'holoprosencéphalie : identification de nouveaux gènes par séquençage haut-débit**

Véronique DAVID (UMR 6290 CNRS, Institut de Génétique et Développement de Rennes)

L'holoprosencéphalie (HPE) résulte d'un défaut de clivage de la ligne médiane cérébrale et représente la plus fréquente des anomalies du développement du cerveau (1/10000 naissances, 1/250 conceptions). Elle est caractérisée par une expressivité phénotypique variable au niveau de la face et du cerveau et son étiologie est à la fois environnementale et génétique. Son mode de transmission d'abord considéré comme dominant, est maintenant établi comme multigénique. Le CHU de Rennes est le centre de référence national pour cette pathologie. Plus de 1000 échantillons de patients issus de l'ensemble du territoire français et de différents pays européens ont été regroupés au sein de notre CRB, et les données cliniques collectées dans une base de données (HPE isolée ou syndromique avec anomalies associées). Des mutations et des délétions hétérozygotes des gènes majeurs (*SHH*, *ZIC2*, *SIX3* et *TGIF*) et mineurs (*PATCHED-1*, *GLI2*, *DISP1*, *FOXH1*, *NODAL*, *TDGF1*, *CDON*, *GAS1*) n'ont été retrouvées que dans 30% des cas d'origine génétique. Une analyse par CGH array a mis en évidence un fort taux de réarrangements chez les sujets HPE (17%). Le but de notre équipe est donc l'identification de nouveaux gènes candidats, puisque dans plus de 50% des cas les bases moléculaires de l'HPE restent inconnues. Les mutations identifiées peuvent être héritées ou de novo. Les mutations *SHH* ou *SIX3* sont héritées dans 70% des cas de parents asymptomatiques ou avec phénotype mineur suggérant un deuxième événement chez le probant. A l'inverse, les mutations de *ZIC2* sont le plus souvent de novo et associées à des phénotypes plus sévères. L'étude proposée consiste donc 1) à sélectionner des trios constitués d'un enfant avec HPE sévère et de ses parents 2) à les soumettre à une stratégie de séquençage exomique afin d'identifier chez le probant un variant dans un nouveau gène responsable du phénotype sévère chez l'enfant atteint.

**L'objectif** est de réaliser le séquençage exomique de 10 trios enfant-parents, dans lequel le probant est atteint d'une forme sévère d'HPE et exempt de toute mutation d'un gène HPE connu, afin d'identifier de nouveaux gènes candidats. Ce projet doit permettre d'améliorer le diagnostic de cette pathologie grave.

**Méthodes** : séquençage haut débit de l'ADN de 10 cas sporadiques atteints d'HPE et des parents. Une stratégie de capture d'exons portant sur les gènes codants, les ARN non traduits et les microARN de la totalité du génome sera d'abord mise en œuvre avant d'effectuer le séquençage massif de ces exomes sur la plateforme Biogenouest de Rennes.

**Résultats attendus**: Identification de mutations dans de nouveaux gènes responsables de l'holoprosencéphalie ; amélioration du diagnostic et du conseil génétique et du diagnostic prénatal de cette pathologie ; contribution à une meilleure connaissance de la physiopathologie de cette maladie complexe du développement cérébral.

### **Publications :**

1. Mouden C, Dubourg C, Carré W, Rose S, Quelin C, Akloul L, et al. Complex mode of inheritance in holoprosencephaly revealed by whole exome sequencing. *Clin Genet*. 1 juin 2016;89(6):659-68.
2. Mouden C, de Tayrac M, Dubourg C, Rose S, Carré W, Hamdi-Rozé H, et al. Homozygous STIL Mutation Causes Holoprosencephaly and Microcephaly in Two Siblings. Paisan-Ruiz C, éditeur. *PLOS ONE*. 6 févr 2015;10(2):e0117418.

## **Leptine et interface fœto-maternelle : Implication dans les échecs d'implantation et les fausses couches à répétition**

Esther DOS SANTOS (UPRES-EA 2493, Pathologie cellulaire et génétique, Université de Versailles St Quentin en Yvelines)

La fréquence des hypofertilités ne cesse d'augmenter, conduisant à l'accroissement des demandes d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP). L'implantation embryonnaire reste l'étape limitante majeure en AMP. Pendant la fenêtre implantatoire, un dialogue paracrine complexe s'établit entre la mère et l'embryon. Parmi ces signaux figure la leptine, cytokine qui semble jouer un rôle important à la fois dans le développement du placenta et dans la réceptivité endométriale. Les souris KO pour la leptine sont effectivement stériles et leur infertilité est corrigée par l'injection de leptine. Par ailleurs, nous avons très récemment montré au laboratoire que l'expression de la leptine est fortement diminuée dans les endomètres de femmes en échec d'implantation comparée à celle des femmes fertiles (Dos Santos *et al.*, 2012). Cependant, à ce jour, les mécanismes moléculaires impliqués restent inconnus.

Dans ce contexte, nous souhaitons préciser le rôle de la leptine à l'interface fœto-maternelle et déterminer son implication dans certaines pathologies de la grossesse (échecs répétés d'implantation, fausses couches à répétition). Notre approche génétique (étude de certains polymorphismes) complétée par des techniques de biologie cellulaire (Elisa, immuno-histochimie) et de biologie moléculaire a pour but de répondre à des questions fondamentales de physiologie et pourrait permettre de déterminer si la leptine est un nouveau marqueur prédictif de l'implantation embryonnaire. Dans ce cas, nous pourrions proposer de nouvelles stratégies cliniques afin d'améliorer la prise en charge des couples en AMP (amélioration du taux de grossesse par transfert, diminution du coût et de l'anxiété des couples).

### **Publication :**

Serazin V, Duval F, Wainer R, Ravel C, Vialard F, Molina-Gomes D, et al. Are leptin and adiponectin involved in recurrent pregnancy loss? *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 1 juin 2018;44(6):1015-22.

## **Adipocytokines et qualité des gamètes**

Joëlle DUPONT (Unité Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 85 INRA/CNRS/Université de Tours)

L'infertilité représente un réel problème mondial de santé et plus particulièrement dans les pays développés. En France, 1 couple sur 6 est infertile et 1 couple sur 10 a recours à des traitements inducteurs de l'ovulation ou des techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP). Le surpoids et l'obésité constituent un facteur non négligeable de baisse de la fertilité naturelle et de diminution de l'efficacité des traitements de l'infertilité. Chez la femme il est associé à des défauts de maturation et de fécondation de l'ovocyte. La qualité de l'ovocyte est dépendante entre autre des facteurs locaux produits par les cellules somatiques (cellules du cumulus et cellules de la granulosa) du follicule. Les mécanismes par lesquels le surpoids ou l'obésité affectent la qualité des gamètes femelles restent largement méconnus. Le tissu adipeux est maintenant reconnu comme un véritable tissu endocrine capable de sécréter des hormones appelées adipocytokines telles que l'adiponectine, la résistine, la visfatine, l'omentine et la chemerine. Nos travaux ainsi que ceux de nos collaborateurs ont montré que certaines de ces hormones sont capables d'affecter les fonctions métaboliques mais aussi les fonctions reproductrices dans différentes espèces. Par exemple, nos travaux préliminaires montrent que chez la femme, la chemerine et son récepteur sont exprimés par les cellules de la granulosa humaine, le cumulus et l'ovocyte suggérant que les adipocytokines pourraient affecter la qualité ovocytaire.

Les objectifs de notre projet sont : 1.-établir le profil expressionnel des adipocytokines et leur récepteur si connu (protéine et/ou ARNm, localisation par immunohistochimie à l'aide de coupe histologique d'ovaires humains commerciale et/ou RT-PCR) au niveau des cellules ovariennes fraîches (cellules de la granulosa et du cumulus humains) collectées après consentement de couples en protocoles de FIV/ICSI) 2.-d'étudier les effets *in vitro* des adipocytokines sur la viabilité, la prolifération et la stéroïdogenèse des cellules primaires de la granulosa et du cumulus. 3.d'analyser les relations entre la concentration des adipocytokines (sérique, et intrafolliculaire); le statut des cellules ovariennes ponctionnées et analysées *in vitro* (stéroïdogenèse, pourcentage d'atrésie...) avec le taux de réussite de la FIV (nombre d'ovocytes matures, et réussite de l'implantation) chez des patientes obèses/ non obèse/ patientes obèse avec syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) et patientes non obèse avec SOPK.

### **Publications :**

1. Cloix L, Reverchon M, Cornuau M, Froment P, Ramé C, Costa C, et al. Expression and Regulation of INTELECTIN1 in Human Granulosa-Lutein Cells: Role in IGF-1-Induced Steroidogenesis Through NAMPT. *Biol Reprod.* 8 janv 2014;91(2):50.
2. Reverchon M, Cornuau M, Cloix L, Ramé C, Guerif F, Royère D, et al. Visfatin is expressed in human granulosa cells: regulation by metformin through AMPK/SIRT1 pathways and its role in steroidogenesis. *Mol Hum Reprod.* 5 janv 2013;19(5):313-26.
3. Reverchon M, Cornuau M, Ramé C, Guerif F, Royère D, Dupont J. Resistin decreases insulin-like growth factor I-induced steroid production and insulin-like growth factor I receptor signaling in human granulosa cells. *Fertility and Sterility.* juill 2013;100(1):247-255.e3.

# Appel d'offres

## Expression et rôle de l'omentine dans les cellules de la granulosa humaine

Lucie CLOIX <sup>a</sup>, Maxime REVERCHON <sup>b</sup>, Marion CORNUAU <sup>c</sup>, Christelle RAME <sup>b</sup>, Fabrice GUERIF <sup>c</sup>, Dominique ROYÈRE <sup>c</sup>, Joëlle DUPONT <sup>b</sup>



<sup>a</sup> CHRU de Tours Unité d'Endocrinologie Nutrition Diabète, 37044 Tours, France et Université François Rabelais,

<sup>b</sup> UMR 7247INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, 37380 Nouzilly, France

<sup>c</sup> Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CHRU de Tours, Tours, France



### Objectifs

L'omentine est une adipocytokine dont le rôle dans la fonction de reproduction n'est pas connue chez les mammifères.

Nous avons recherché la présence, analysé la régulation de l'expression et étudié le rôle de l'omentine dans les cellules de la granulosa (CG) humaine et dans une lignée cellulaire dérivée de cellules de la granulosa humaine (KGN).

### Méthodologie

**Cellules CG humaines:** obtenues chez des patientes en cours de procréation médicalement assistée suivies dans le service de Médecine de la Reproduction au CHU de Tours.

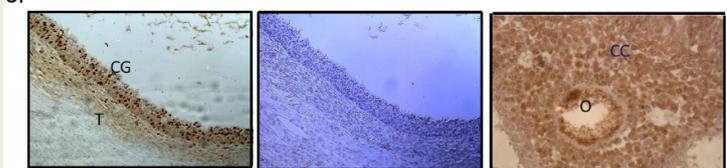
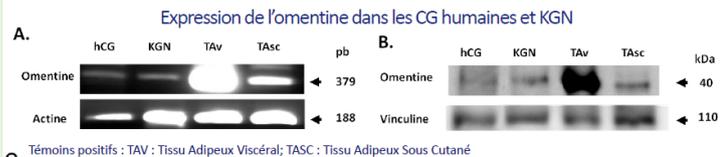
**Cellules KGN:** provenant de l'équipe japonaise des Drs Nomura et Nawata.

**L'ARN messager (ARNm) et la protéine de l'omentine:** détectés par RT-PCR, western-blot et immunohistochimie.

**Sécrétions de progestérone:** mesurées dans le milieu de culture par radio-immunoassay.

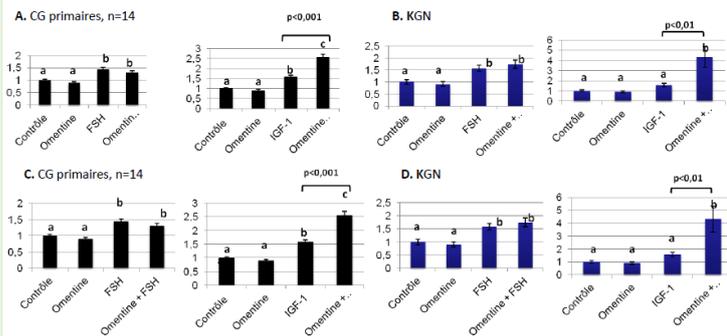
**Statistiques:** tests ANOVA factoriel, complétés par des tests de Fisher lorsque le test ANOVA était significatif.

### Résultats



L'ARN messager (A) et la protéine (B) de l'omentine sont exprimés dans les hCG et les KGN. Par immunohistochimie (C), l'omentine est localisée dans les CG, dans les cellules du cumulus (CC) et de la thèque (T) ainsi que dans les ovocytes (O) de follicules ovariens humains.

Effets de l'omentine sur les sécrétions, basales et induites par l'IGF1 ou la FSH, de progestérone (Pg) par les hCG et les KGN



Les données sont exprimées en concentration de Pg ou d'E2 (ng/ml)/concentration protéine/puits. Pour chaque culture, chaque traitement (omentine en présence ou absence d'IGF1 (10<sup>-8</sup> M), ou FSH (10<sup>-8</sup> M)) a été réalisé en quadruplet. Les lettres indiquent des différences significatives (p<0,05)

### Conclusion

Pour la première fois, nous avons montré que l'omentine est présente au niveau messager et protéique dans les CG, les cellules du cumulus, de la thèque ainsi que dans les ovocyte de follicules ovariens humains.

De plus, l'omentine agit à des concentrations physiologiques in vitro sur ces cellules en modulant leur stéroïdogénèse.



## Caractérisation et rôle de l'omentine dans les cellules de la granulosa humaine

Lucie Cloix-Doisnel<sup>1</sup>, Maxime Reverchon<sup>1</sup>, Christelle Rame<sup>1</sup>, Marion Cornuau<sup>2</sup>, Dominique Royère<sup>2</sup>, Fabrice Guérif<sup>2</sup> and Joëlle Dupont<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Unité "Physiologie de la Reproduction et des Comportements", INRA UMRI85, 37380 Nouzilly, France  
<sup>2</sup>Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CHRU de Tours, F-37044 Tours, France



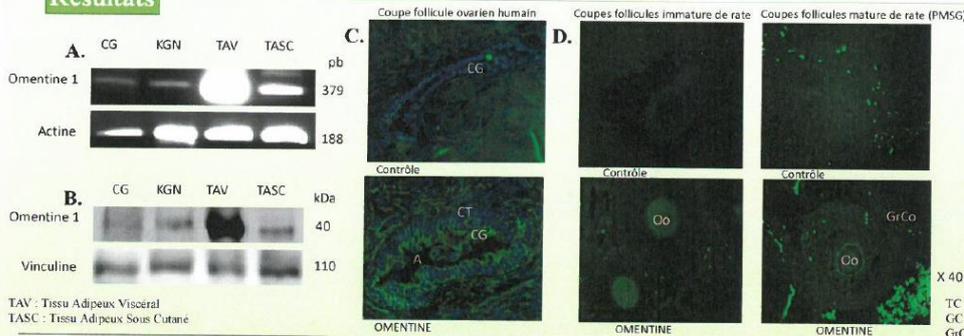
### Introduction

L'omentine est une nouvelle adipocytokine récemment identifiée, elle a été initialement décrite sous le nom d'intelectine dans les cellules de paneth de l'intestin grêle (Tsuji S et al., 2001). Puis en 2003, Yang et al ont constaté une forte expression de cette protéine dans le tissu adipeux viscéral, il existe deux isoformes de l'omentine (1 et 2) partageant 87 % d'acide aminé en commun. Sa séquence protéique présente 60 % d'identité avec une lectine déjà existante, localisée dans l'ovocyte de Xénope et impliquée dans le blocage de la polyspermie (Komiyama et al., 1998). Le messager de l'omentine 1 est fortement exprimé dans le tissu adipeux viscéral d'origine omentale chez le singe et l'humain et est retrouvé de manière plus faible dans le tissu adipeux sous cutané mais aussi dans le placenta et l'ovaire chez le singe l'humain et le mouton (Schäffler A et al., 2005, et French AT et al., 2009). Aucun récepteur de l'omentine n'a encore été décrit à ce jour, pourtant elle est impliquée dans la défense immunitaire, l'insulino-résistance et a un rôle anti-inflammatoire (Tan BK et al., 2010). Cependant, aucune fonction de l'omentine dans la fonction de reproduction n'est connue à ce jour chez les mammifères. Dans notre étude, nous avons caractérisé l'expression génétique et protéique de l'omentine dans des cellules du follicule ovarien fraîchement isolées ainsi que dans une lignée cellulaire dérivée de cellule de la granulosa humaine (hCG). Puis, nous avons analysé la régulation de l'expression de l'omentine en réponse à deux insulino-sensibilisateurs, la metformine et la rosiglitazone. Enfin, nous avons étudié l'effet de l'omentine recombinante humaine sur la stéroïdogénèse et la prolifération des CG humaines.

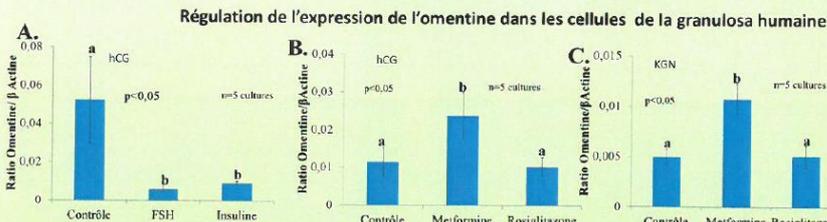
### Matériels et méthodes

Les cellules de la granulosa humaine ont été obtenues en collaboration avec le service de Médecine de la Reproduction du CHU de Tours. Ces cellules sont issues de ponctions folliculaires effectuées chez des patientes au cours d'un protocole de fécondation in vitro. Les cellules sont purifiées et cultivées in vitro pendant 24h avant d'être sévées et stimulées. Les patientes ont donné leur accord écrit et n'ont perçu aucune compensation financière pour leur participation à l'étude. Les cellules KGN proviennent des Drs Nomura et Nawata, Kyushu Université, Japon (Nishi et al., 2001). L'ARNm et la protéine de l'omentine ont été détectés par RT-PCR, western-blot et immunohistochimie. L'expression de l'omentine a été déterminée dans les CG humaines par QPCR en temps réel après 48h de stimulation avec FSH ( $10^{-6}$ M) ou insuline ( $10^{-8}$ M) ou metformine ( $10^{-3}$ M) ou rosiglitazone ( $10^{-6}$ M). Par dosage RIA, les sécrétions de progestérone et d'oestradiol ont été mesurées dans le milieu de culture après 48h de stimulation. Enfin, nous avons analysé par immunoblot l'effet de l'omentine recombinante humaine sur l'activation de voies de signalisation. Des test ANOVA factoriel ont été utilisés, complétés par des tests de Fisher lorsque le test ANOVA était significatif. Le seuil de significativité a été fixé à 5%.

### Résultats

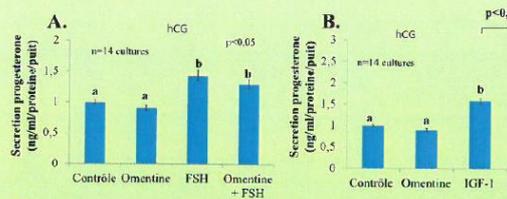


Par RT-PCR et western blot l'omentine est retrouvée au niveau messager et protéique dans les cellules CG et KGN (A, B). Par immunohistofluorescence, elle est localisée dans les CG humaines (C) et dans l'ovocyte de rate (D). Après maturation en réponse à la PMSG l'omentine se concentre à la périphérie de l'ovocyte ce qui pourrait correspondre aux granules X 40 corticaux (D).



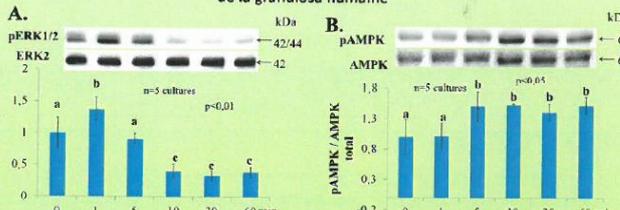
L'expression de l'ARNm de l'omentine a été analysée par QPCR en temps réel, nous observons que la FSH et l'insuline ( $10^{-8}$ M) après 48h de stimulation diminuent l'expression de l'omentine dans les CG (A). A l'inverse, la metformine ( $10^{-3}$ M) augmente significativement son expression à la fois dans les CG (B) et dans les cellules KGN (C) alors que la rosiglitazone ne présente pas d'effets significatifs. Les gènes RPL19,  $\beta$  actine et cyclophiline A ont été utilisés comme gènes de référence et avec ces 3 gènes nous obtenons des résultats similaires.

### Effet de l'omentine recombinante humaine sur la stéroïdogénèse dans les cellules de la granulosa humaine



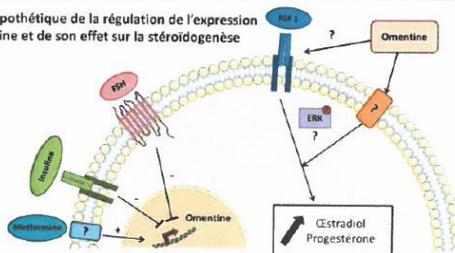
L'omentine augmente la sécrétion de progestérone induite par IGF-1 ( $10^{-8}$ M) de 66% dans les CG primaires (B). Elle ne modifie pas la sécrétion basale ou induite par FSH ( $10^{-6}$ M) (A). Des résultats similaires ont été obtenus sur la production d'oestradiol (résultats non montrés).

### L'omentine active les voies de signalisation MAPK-ERK1/2 et AMPK dans les cellules de la granulosa humaine



L'omentine active rapidement (1min) la phosphorylation de la voie MAPK-ERK1/2, cette phosphorylation diminue nettement à 5 min avant d'être inférieure à l'état basal à 10 min (A). Nous observons également que l'omentine induit une augmentation de l'activation de la voie AMPK à 5 min qui se maintient jusqu'à 60 min (B).

### Schéma hypothétique de la régulation de l'expression de l'omentine et de son effet sur la stéroïdogénèse



### conclusions

Pour la première fois, nous avons montré que l'omentine est présente au niveau messager et protéique à la fois dans les CG humaines et dans l'ovocyte de rate. Chez cette dernière l'omentine au cours de la maturation ovocytaire semble migrer de la même manière que les granules corticaux suggérant une implication de cette adipocytokine dans le blocage de la polyspermie. De plus, l'expression de l'ARNm de l'omentine dans les CG humaines est diminuée par la FSH et l'insuline alors qu'elle est augmentée par la metformine. Enfin, l'omentine est biologiquement active dans les CG puisqu'elle stimule la production de stéroïdes induite par IGF-1. Des études complémentaires sont nécessaires pour explorer par quels mécanismes omentine et IGF-1 agissent en synergie.

## **Effet de la culture *in vitro* sur l'hydroxyméthylation de l'ADN embryonnaire : Comparaison de deux milieux utilisés en AMP**

Véronique DURANTHON (Biologie du Développement et Reproduction, INRA, Jouy-en-Josas)

**Objectifs** : Nous proposons dans cette étude de nous intéresser à l'effet de deux conditions de culture (milieu séquentiel ou milieu unique) couramment utilisées en AMP en France, sur l'évolution d'une nouvelle marque épigénétique, l'hydroxyméthylation de l'ADN. En effet, la mise en place des marques épigénétiques peut être affectée par l'environnement. Or ces marques jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes, laquelle est cruciale pour les étapes de différenciation cellulaires, nécessaires à un développement correct. De plus, des altérations des marques épigénétiques, entraînant la dérégulation de gènes clés, peuvent conduire à des pathologies graves chez l'adulte. L'hydroxyméthylation de l'ADN, redécouverte depuis peu, est d'un intérêt tout particulier de par son rôle dans le maintien de la pluripotence. Notre étude portera sur l'embryon de lapin, qui apparaît comme un modèle bien plus pertinent que la souris pour l'étude de l'embryon humain.

**Résultats attendus** : Dans un premier temps, nous comparerons la cinétique d'évolution de l'hydroxyméthylation de l'ADN dans l'embryon préimplantatoire de lapin issu de fécondation *in vivo* soit après un développement *in vivo*, soit après culture en milieu séquentiel (G1+, G2+) ou en milieu unique (Global). Nous nous intéresserons ensuite à l'expression et à la localisation subcellulaire des enzymes responsables de la méthylation et de l'hydroxyméthylation de l'ADN (DNMT : DNA méthyltransférases et protéines TET : Ten Eleven Translocation respectivement) dans l'embryon préimplantatoire. Enfin, nous analyserons l'effet à long terme des deux conditions de culture *in vitro* sur la répartition de l'hydroxyméthylation dans les tissus fœtaux et sa quantification chez le lapereau nouveau-né, plus particulièrement au niveau du cerveau, tissu somatique présentant un fort niveau d'hydroxyméthylation.

**Méthodologie** : Les embryons de lapin fécondés *in vivo* seront cultivés jusqu'aux stades d'intérêt dans des milieux (G1+/G2+ et Global total) utilisés en AMP. Les cinétiques de l'hydroxyméthylation seront obtenues pour les différentes conditions de développement par immunomarquage et quantification du signal fluorescent, ce qui permettra de les comparer. L'expression des enzymes sera analysée au niveau des transcrits par qRT-PCR et au niveau des protéines par Western blot. Leur localisation subcellulaire sera déterminée par immunofluorescence. Aux stades plus tardifs, des coupes de fœtus seront réalisées et nous analyserons la distribution de l'hydroxyméthylation dans les tissus fœtaux par immunomarquages. Enfin, l'hydroxyméthylation dans les cerveaux de lapereaux nouveau-nés sera quantifiée par ELISA.

### **Publication :**

Salvaing J, Peynot N, Bedhane MN, Veniel S, Pellier E, Boulesteix C, et al. Assessment of 'one-step' versus 'sequential' embryo culture conditions through embryonic genome methylation and hydroxymethylation changes. Hum Reprod. 21 nov 2016;31(11):2471-83.

# Appel d'offres

## Effet de la culture *in vitro* sur la méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN embryonnaire :

### Comparaison de deux milieux utilisés en AMP





**Salvaing J., Peynot N., Maulny L., Bedhane M.N., Veniel S., Daniel N., Ruffini S., Adenot P., Beaujean N., Duranthon V.**  
 INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy-en-Josas, France; ENVA, Maisons Alfort, France

### Objectifs

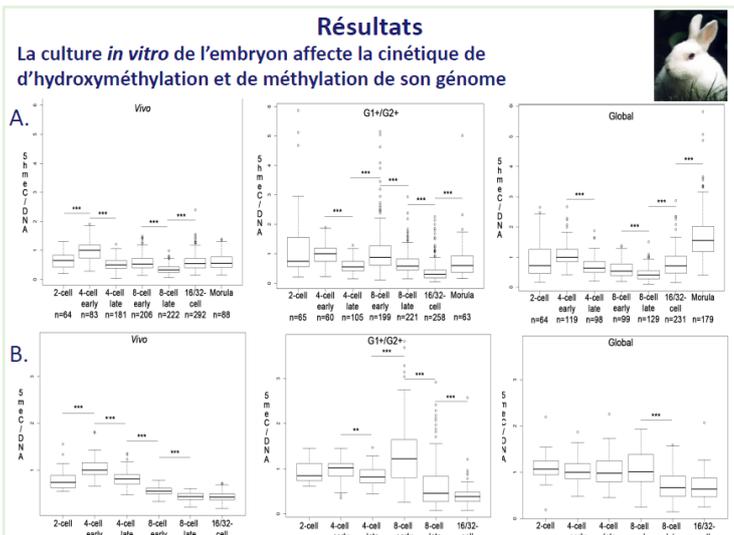
Nous nous sommes intéressés dans cette étude à l'effet de deux conditions de culture (milieu séquentiel G1+/G2+ ou milieu unique Global) couramment utilisées en AMP en France, sur l'évolution de deux marques épigénétiques: la méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN au cours du développement préimplantatoire. En effet, la mise en place des marques épigénétiques peut être affectée par l'environnement. Or ces marques jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes, laquelle est cruciale pour les étapes de différenciation cellulaire, nécessaires à un développement correct. De plus, des altérations des marques épigénétiques, entraînant la dérégulation de gènes clés, peuvent conduire à des pathologies graves chez l'adulte. Notre étude a porté sur l'embryon de lapin, qui apparaît comme un modèle bien plus pertinent que la souris comme modèle de l'embryon humain.

### Méthodologie

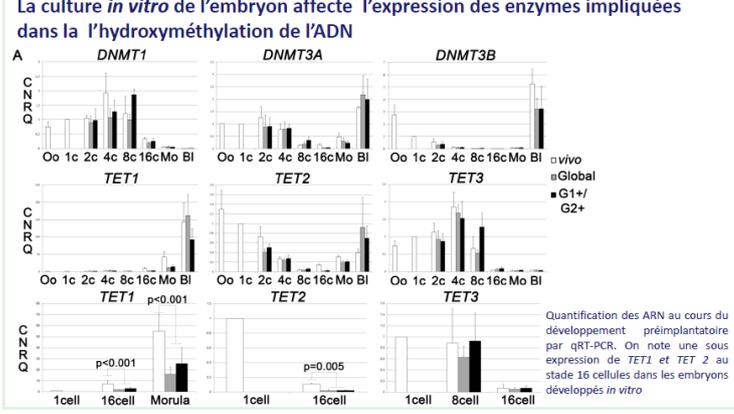
A partir d'embryons de lapin fécondés *in vivo* et collectés à différents stades après développement *in vivo* ou culture *in vitro*, nous avons pu établir les cinétiques de méthylation et d'hydroxyméthylation dans les différentes conditions de développement par immunomarquage et quantification du signal fluorescent. Nous avons également analysé l'expression des transcrits des différentes enzymes responsables de la méthylation et de l'hydroxyméthylation de l'ADN par qRT-PCR.

### Résultats

La comparaison des cinétiques de méthylation et d'hydroxyméthylation de l'ADN nous a permis de mettre en évidence des différences entre les embryons collectés *in vivo* et ceux cultivés *in vitro* mais également entre les deux conditions de culture *in vitro*. L'analyse par qRT-PCR de l'expression des gènes *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *TET1*, *TET2* et *TET3* montre une sous expression de *TET1* et *TET2* au moment de la mise en route majeure du génome embryonnaire dans les embryons développés *in vitro*. Les résultats obtenus dans ce projet ont été publiés dans Hum Reprod. 2016 Nov;31(11):2471-2483.



Quantification du signal fluorescent après immunomarquage à l'aide d'anticorps anti 5hmC (A, hydroxyméthylation) et anti 5meC (B, méthylation). L'ADN est marqué par l'ethidium homodimère 2 (EthD2). Les rapports SmeC/ADN et 5hmC/ADN sont présentés sous forme de boxplots et les différences significatives entre deux stades consécutifs sont indiquées (\*\* p-value <0,01; \*\*\* p-value <0,001). Les nombres de noyaux analysés sont indiqués pour chaque stade.



### Perspectives

Au cours des clivages, les cinétiques de méthylation et d'hydroxyméthylation du génome embryonnaire sont affectées par la culture *in vitro* de l'embryon. Aucune des deux stratégies de culture utilisées ne se rapproche pour ces critères d'un développement embryonnaire *in vivo*. Nous étudions maintenant l'impact de ces conditions de culture sur le développement foetal et sur la méthylation de l'ADN dans différents tissus foetaux. Projet en cours financé par l'ABM.

## **Contrôle des transposons et reproduction : évaluation des risques en assistance médicale à la procréation chez la souris**

Patricia FAUQUE (Laboratoire de biologie de la reproduction, CHU Dijon)

### **Objectifs :**

De nombreuses études ont été menées afin d'évaluer l'impact des techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) sur la santé des enfants ainsi conçus. La notion de risque épigénétique a été évoquée, en raison du lien entre AMP et pathologies associées à des anomalies de l'empreinte parentale (syndromes de Beckwith-Wiedemann-BWS et de SilverRussell-SRS). La reprogrammation épigénétique qui caractérise la période périconceptionnelle (gamétogénèse, fécondation et développement embryonnaire précoce) serait ainsi vulnérable aux manipulations mises en œuvre lors d'AMP. Cette reprogrammation est normalement essentielle pour la régulation de gènes développementaux clefs, et les transitions entre pluripotence et différenciation de lignage. Elle est aussi fondamentale pour le contrôle des séquences répétées et en particuliers des éléments transposables (Transposable Elements-TE). Les TE sont des séquences mobiles endogènes qui représentent plus de la moitié du génome chez la souris et l'homme, et qui peuvent altérer l'organisation et l'expression des gènes. Malgré leur présence en milliers de copies et leurs effets délétères potentiels, les études concernant leur rôle en reproduction sont quasi-inexistantes. Nous proposons que les TE pourraient représenter des senseurs et des acteurs de dérégulations épigénétiques liées à l'AMP. L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets du protocole d'AMP le plus courant, la fécondation *in vitro* (FIV), sur le contrôle des TE chez l'embryon préimplantatoire, en utilisant le modèle murin.

### **Résultats attendus :**

Ce projet de recherche permettra une meilleure connaissance des risques mis en jeu en contexte d'AMP et ainsi une amélioration des protocoles utilisés. Des anomalies de contrôle des TE pourraient participer au phénotype des enfants atteints de BWS et SRS, ou avoir des conséquences plus tardives chez les individus conçus par AMP, comme la survenue de cancers ou de problèmes d'infertilité. A l'inverse, cette étude pourrait démontrer l'absence d'effet de la FIV sur le contrôle des TE, constituant alors un argument majeur pour une pratique sans risque de l'AMP. En définitive, cette étude pose le principe d'un critère d'évaluation nouveau et puissant de la qualité et de l'intégrité des embryons préimplantatoires issus d'AMP, afin de s'assurer que ces méthodes sont appliquées de manière efficace et sûre en reproduction humaine **Méthodologie :**

Nous proposons d'évaluer les effets des techniques liées aux protocoles d'AMP sur le contrôle des éléments transposables dans l'embryon préimplantatoire murin. La mise en œuvre de ce projet comprend 1) la mise en place d'un protocole d'AMP humain de type FIV appliqué à la souris, et l'analyse de l'impact des manipulations inhérentes à AMP sur 2) l'expression des TE, au niveau ARN par RT-qPCR et protéique par immunofluorescence, 3) la mobilisation des TE, par l'utilisation d'un modèle murin transgénique porteur d'une cassette de rétrotransposition et 4) la production de petits ARNs régulateurs dérivés des TE, par Small RNASeq.

Notre approche est originale et innovante, conceptuellement et techniquement, grâce notamment à des méthodes et outils d'analyse pour la première fois utilisés en reproduction assistée.

## **Combinaison de l'Embryoscope et du dosage du G-CSF folliculaire comme biomarqueurs pronostiques du potentiel implantatoire**

Thierry FREOUR (Médecine et Biologie de la reproduction – CHU de Nantes)

Malgré le contexte de recours croissant à l'Assistance Médicale à la Procréation et la progression des matériels et techniques, les résultats restent relativement décevants, avec des taux d'implantation souvent limités mais des taux de grossesse multiples élevés. Ainsi, une amélioration des conditions de choix de l'embryon à transférer au laboratoire de FIV pourrait constituer une aide précieuse pour l'amélioration globale des résultats.

L'évaluation de la qualité embryonnaire reste largement basée sur l'étude ponctuelle de la morphologie. Cependant, l'intérêt de cette méthode est limité par son aspect ponctuel reflétant très imparfaitement le processus complexe et dynamique du développement embryonnaire précoce, et par l'obligation de sortir les embryons de l'incubateur pour les observer sous le microscope.

Récemment, des méthodes non invasives d'évaluation de la qualité embryonnaire ont été développées. Parmi celles-ci, le suivi en continu du développement embryonnaire (time lapse) et le dosage du G-CSF dans le liquide folliculaire semblent prometteuses et pourraient permettre d'améliorer les connaissances sur la qualité ovocytaire et/ou embryonnaire, aboutissant ainsi à un choix plus pertinent de l'embryon à transférer.

L'objectif de cette étude observationnelle est d'évaluer l'intérêt prédictif respectif du time lapse et du dosage du G-CSF, ainsi que l'intérêt de leur association pour la prédiction de l'implantation embryonnaire. L'inclusion prospective de 100 couples pris en charge en FIV ICSI avec suivi individuel du follicule à l'ovocyte puis à l'embryon avec transfert d'embryon unique après culture dans l'Embryoscope permettra d'évaluer la capacité respective de chaque technique (et de leur association) à aider le biologiste dans le choix de l'embryon ayant la meilleure compétence implantatoire.

## **Etude de l'impact diagnostique d'une puce ADN conçue pour l'identification de remaniements génomiques associés à la déficience intellectuelle**

Philippe JONVEAUX (Laboratoire de génétique, CHU de Nancy)

Dans la pratique clinique, la déficience intellectuelle (DI) représente un motif des plus fréquents de demande de conseil génétique, et face à la très grande hétérogénéité génétique et allélique des DI, la question soulevée réside dans la stratégie optimale à proposer pour aboutir à un diagnostic étiologique. A ce jour, les techniques d'analyse globale du génome telle la CGH-array occupe une place privilégiée dans l'approche diagnostique. Notre projet de recherche s'inscrit dans une optique d'amélioration des techniques de diagnostic génétique de la DI. Nous envisageons l'évaluation d'une puce, correspondant à un microréseau de sondes de très haute résolution, ciblée sur les gènes de DI.

Notre raisonnement se base sur deux observations :

- à côté des déséquilibres exoniques, des anomalies siégeant dans les introns ou dans les régions intergéniques situées en amont et aval d'un gène peuvent contribuer à la dérégulation de son expression, via des anomalies de l'épissage, des altérations de séquences régulatrices situées à distance tels des enhanceurs ou silencers.

- le fait de cibler l'analyse sur des gènes connus pour être associés à la survenue d'une DI renforce l'implication d'un tel microremaniement à l'origine de la DI chez les individus étudiés

Actuellement, les puces utilisées à titre diagnostique reposent sur un microréseau d'oligonucléotides d'une résolution moyenne de 180K (type Agilent) avec une couverture très inégale et parfois incomplète des gènes de la DI. L'aspect novateur de **la puce DIS (Déficience Intellectuelle Spécifique)** porte sur sa conception couvrant à très haute résolution (1M), les exons, les introns et les régions en amont et aval les gènes de DI. **La population étudiée** portera sur une cohorte de 50 individus atteints d'une DI modérée à sévère non syndromique, sans anomalie génomique identifiée au préalable à l'aide d'une analyse sur microréseau 180K. Les objectifs se déclineront en :

- **objectif primaire, principal de type diagnostique** : apprécier la fréquence de microremaniement des gènes de DI, en tenant compte dans l'interprétation des résultats des analyses parentales s'agissant du caractère de novo de l'anomalie pour les DI dominantes, ou hérité dans les formes récessives.

- **objectif secondaire** : contribuer à identifier via cette puce DIS haute résolution de nouveaux mécanismes de dérégulation des gènes de la DI, avec notamment dans un second temps (hors projet) à titre plus cognitif des éventuels enhanceurs et ou silencers.

## **Etude DACCI : Devenir des enfants après diagnostic prénatal d'agénésie isolée du corps calleux**

Jean-Marie JOUANNIC (UF Diagnostic Prénatal et Echographie, Pôle de Périnatalité, Hôpital Trousseau)

### **Population concernée**

L'agénésie du corps calleux représente la malformation cérébrale la plus fréquente. Cette anomalie peut être associée à un retard mental et à des anomalies du développement. L'incidence et la sévérité de ces troubles est actuellement inconnue.

Cette malformation est accessible au diagnostic prénatal par échographie. Dans environ la moitié des cas cette anomalie est apparemment isolée en prénatal. Dans cette situation, l'absence de données prospectives sur la santé de l'enfant à venir rend impossible un conseil prénatal loyal et éclairé aux couples. Ainsi, les pratiques médicales des Centres Pluri-Disciplinaires de Diagnostic Prénatal (CPDP) devant ce diagnostic prénatal (taux d'interruption médicale de la grossesse, IMG) sont très disparates avec des taux d'IMG variant de 20 à 80% en fonction des centres.

### **Objectifs et critères d'évaluation principaux**

L'objectif principal est d'étudier le devenir d'enfants nés vivants après diagnostic prénatal d'agénésie calleuse isolée avec une évaluation neuro-psychologique à l'âge de 3 ans. Les points principaux de l'étude concerneront la fréquence de survenue et le type d'anomalies diagnostiquées après la naissance et une comparaison du devenir neuro-développemental de ces enfants à l'âge de 3 ans avec une population d'enfants témoins.

### **Objectifs et critères d'évaluation secondaires**

Un recueil complet des issues de grossesse suivant le diagnostic prénatal d'agénésie calleuse sera organisé afin (1) d'évaluer les données concernant les circonstances de diagnostic prénatal de cette anomalie ainsi que sa prise en charge en cours de grossesse, (2) d'évaluer la pertinence de l'imagerie prénatale par IRM sur le caractère isolé ou non de l'agénésie grâce à un protocole de relecture standardisée des examens pré- et postnataux (3) d'étudier les motifs de réalisation d'une IMG dans cette circonstance. Ces nouvelles connaissances devraient permettre de d'homogénéiser l'information délivrée aux parents avant une décision éventuelle d'IMG, de redéfinir les modalités de prise en charge prénatale de cette anomalie. Elles permettront également un travail de réflexion des professionnels impliqués dans le diagnostic prénatal de cette anomalie.

### **Critères d'inclusion**

Les critères d'inclusion sont représentés par un diagnostic prénatal confirmé par un examen échographique de référence : d'une agénésie complète du corps calleux ou d'une agénésie partielle avec absence d'une partie du corps calleux, la partie restante étant d'aspect normal ou d'un corps calleux d'aspect anormal (fin, épais ou irrégulier). Le diagnostic d'agénésie calleuse isolée en prénatal sera défini par : échographie de référence et IRM cérébrale ne mettant pas en évidence d'autres anomalies, caryotype fœtal normal et absence d'antécédent familial de retard mental ou d'épilepsie.

### **Méthode**

Le devenir de 60 enfants avec agénésie calleuse isolée diagnostiquée en prénatal sera comparé à un groupe de 120 enfants témoin avec une évaluation neuro-pédiatrique à l'âge de 3 ans évaluant les capacités intellectuelles et les fonctions motrices (Echelle WPPSI-III), la coordination interhémisphérique (Echelle Vineland) et le comportement (test d'Achenbach).

### **Résultats attendus**

L'absence de donnée contrôlée sur le devenir postnatal des cas avec agénésie calleuse isolée en prénatal conduit à une information aux parents et un taux d'IMG très variable d'un centre à l'autre et pouvant atteindre jusqu'à 80% des cas.

Nous proposons d'améliorer les connaissances médicales sur cette malformation afin de délivrer une information homogène et de permettre un conseil prénatal loyal et éclairé aux couples. Le suivi d'un effectif suffisant d'enfants avec agénésie calleuse isolée permettra d'évaluer l'incidence réelle et la sévérité d'un retard mental, et d'anomalies du développement. Un meilleur repérage des enfants à risque permettrait par ailleurs une prise en charge précoce afin d'assurer un meilleur apprentissage de ces enfants.

### **Centres participants**

20 Centre pluridisciplinaires de Diagnostic Prénatal (Ile de France : 9, Région : 11)

### **Validation d'une approche diagnostique de référence pour le syndrome de Cockayne et les phénotypes apparentés**

Vincent LAUGEL (laboratoire de génétique médicale, Equipe Avenir INSERM, CHRU Strasbourg)  
Strasbourg)

Le syndrome de Cockayne est une maladie autosomique récessive principalement caractérisée par un retard staturopondéral, une atteinte neurologique et sensorielle et une photosensibilité cutanée. La sévérité et l'âge d'apparition des manifestations sont variables. Cette maladie rare (1/550 000 naissances en France) est liée à des mutations des gènes *ERCC6/CSB* ou *ERCC8/CSA* impliqués dans la voie de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER). Les patients atteints présentent un déficit spécifique de la voie de la réparation liée à la transcription (TCR: transcription coupled repair) qui peut être mis en évidence en mesurant la synthèse d'ARN dans les fibroblastes en culture après irradiation aux UV (test RRS Recovery RNA Synthesis).

Il n'existe pas à l'heure actuelle de réelle stratégie diagnostique validée pour le syndrome de Cockayne. Le criblage moléculaire permet le plus souvent un diagnostic fiable et rapide, accompagné d'un conseil génétique précis pour tous les membres de la famille. Il peut cependant être d'interprétation très délicate en présence de variants de pathogénicité inconnue, notamment en prénatal. Le test RRS se heurte quant à lui au manque de fiabilité et de reproductibilité de tout test cellulaire. L'offre diagnostique pour ce syndrome est par ailleurs très réduite avec seulement deux laboratoires européens assurant en routine les analyses moléculaires et/ou cellulaires. Notre objectif est donc de mettre au point, de valider et de promouvoir une stratégie complète regroupant les explorations moléculaires et cellulaires en pré et postnatal. Nous proposons d'utiliser les techniques de séquençage de nouvelle génération pour réaliser efficacement et au meilleur coût le criblage moléculaire des gènes impliqués dans le syndrome de Cockayne (séquençage sur puces à semi-conducteur après amplification multiplexe des régions à analyser). En parallèle, nous proposons de développer un test cellulaire de type RRS utilisant un marquage non radioactif sur différents types de lignées cellulaires. Ces approches moléculaire et cellulaire seront individuellement validées grâce à l'étude comparative d'une cohorte de patients connus (cohorte rétrospective) puis seront appliquées à une cohorte prospective estimée à une cinquantaine de patients par an. En effet, l'important rendement du séquençage nouvelle génération et la rapidité du test cellulaire non radioactif nous permettront d'ouvrir le recrutement non seulement aux patients répondant parfaitement aux critères cliniques du syndrome de Cockayne mais également aux formes cliniques moins typiques.

Enfin, nous souhaitons comparer la sensibilité et la spécificité des approches moléculaire et cellulaire dans le cadre du diagnostic prénatal, afin de définir la meilleure stratégie en termes de fiabilité des résultats et de rapidité de rendu. Nous souhaitons que cette offre diagnostique puisse contribuer à une meilleure reconnaissance de ce syndrome très probablement sous diagnostiqué en France, comme en témoigne l'incidence deux fois plus élevée dans d'autres pays européens comme le Royaume-Uni ou les Pays-Bas.

#### **Publication :**

Calmels N, Greff G, Obringer C, Kempf N, Gasnier C, Tarabeux J, et al. Uncommon nucleotide excision repair phenotypes revealed by targeted high-throughput sequencing. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2016;11:26.

Poster :



Cockayne syndrome and DNA repair disorders :



high-throughput sequencing expands the spectrum of neurological phenotypes

Laugel V.<sup>1,2</sup>, Greff G.<sup>3</sup>, Obringer C.<sup>2</sup>, Gener Querol B.<sup>4</sup>, Mazur A.<sup>5</sup>, Sabouraud P.<sup>6</sup>, Calmels N.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Strasbourg University Hospital, FRANCE; <sup>2</sup> Laboratory of Medical Genetics, Strasbourg, FRANCE; <sup>3</sup> Genetic Diagnostic Laboratory, Strasbourg University Hospital, FRANCE; <sup>4</sup> BioCruces Health Research Institute, Genetics Department, Cruces University Hospital, Bizkaia, SPAIN; <sup>5</sup> Medical Faculty, University of Rzeszow, POLAND; <sup>6</sup> Department of Pediatrics, Reims University Hospital, FRANCE

**Objective :** Cockayne syndrome (CS) is an autosomal recessive leukodystrophy and multisystem disorder characterized by mental retardation, microcephaly, severe growth failure, sensorial impairment, peripheral neuropathy and cutaneous photosensitivity. It belongs to the family of DNA repair and transcription disorders together with xeroderma pigmentosum (XP) and trichothiodystrophy. These conditions are specifically associated with various genetic defects in the nucleotide excision repair pathway (NER) and have overlapping clinical phenotypes. Clinical and genetic diagnosis still remains challenging. Our goal was to develop a unique and efficient mutation-screening strategy for Cockayne syndrome and related disorders and to improve our understanding of the clinical spectrum of these disorders.

**Methods :** We have designed a novel targeted high-throughput sequencing approach for the diagnosis of Cockayne syndrome and related DNA repair disorders (multiplex amplification approach on Ion Torrent). Sixteen genes of interest involved in the NER pathway have been included in our design (453 amplicons). This strategy was validated in a well-studied cohort of 11 patients already tested by Sanger sequencing. We have then studied 30 consecutive patients presenting with the cardinal clinical features of Cockayne syndrome or related DNA repair disorders who had been referred to our laboratory for diagnostic analysis.

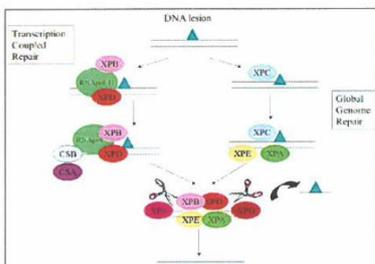


Fig 1. Nucleotide excision repair pathway.

Official gene symbol	Legacy name	# Exons
DDIT3		27
DDIT2	XPE	10
ERCC1		10
ERCC2	XPD	23
ERCC3	XPB	15
ERCC4	XPF	11
ERCC5	XPG	15
ERCC6	CSB	21
ERCC8	CSA	12
GTF2H5	TTDA	3
MPLKIP	TTDN1	2
POLH		11
USP7		31
UMSA	R14A15JD	14
XPA		6
XPC		16

Table 1. Genes included in the targeted high-throughput sequencing approach.

	Cockayne syndrome	COFS syndrome	Trichothiodystrophy	Xeroderma pigmentosum	UV-sensitive syndrome
Growth failure	++	++	+	-	-
Microcephaly	++	++	+/-	+/-	-
Mental retardation	++	++	+/-	+/-	-
Retinal degeneration	+	+/-	-	-	-
Cataracts	+	+	+	-	-
Deafness	+	+/-	+/-	-	-
Photosensitivity	+	+/-	+/-	++	++
Brittle hair	-	-	++	-	-
Cancer	-	-	-	++	-

Table 2. Clinical symptoms of DNA repair (NER) disorders.

**Results :** We have identified the causative mutations in 14 of the 30 patients. Three patients showed biallelic mutations in the ERCC6/CSB gene. 2 patients in the ERCC8/CSA gene : most patients had classical Cockayne phenotype with growth failure, microcephaly, mental retardation, pyramidal and extra-pyramidal signs, neurosensorial impairment but some had very mild and incomplete phenotypes, with inconclusive functional assays on fibroblasts. Six patients with classical XP phenotype had biallelic mutations in the POLH gene. Interestingly, our results also revealed unexpected findings of XPD, XPB and XPG mutations in a case of UV-sensitive syndrome and 2 cases of mixed XP/CS phenotypes (1 patient in the ERCC2/XPD gene, 1 in the ERCC3/XPB, 1 in the ERCC5/XPG). These patients had combined phenotypes with pigmentary changes on the skin and some neurological / sensorial features of Cockayne syndrome.

Patient #	Gender	Mental retardation	Growth failure	Microcephaly	Photo-sensitivity	Neuro-sensorial impairment	Cancer	Mutated gene	Final diagnosis
1	M	+	-	+	++	+	-	ERCC2 (XPD)	XP/CS
2	M	-	-	-	++	-	-	ERCC3 (XPB)	UVSS
3	F	+	+	+	+	-	-	ERCC5 (XPG)	XP/CS
4	F	+	+	+	+	+	-	ERCC6 (CSB)	CS
5	M	+	+	+	+	+	-	ERCC6 (CSB)	CS
6	M	+	+	+	+	+	-	ERCC6 (CSB)	CS
7	M	+	+	+	+	-	-	ERCC6 (CSB)	CS
8	F	+	+	+	+	+	-	ERCC8 (CSA)	CS
9	F	+	+	+	++	+	-	ERCC8 (CSA)	CS
10	M	+	-	-	+	+	-	ERCC8 (CSA)	CS
11	F	-	-	-	+	-	+	POLH	XP
12	F	-	-	-	+	-	+	POLH	XP
13	F	-	-	-	+	-	+	POLH	XP
14	M	-	-	-	+	-	+	POLH	XP

Table 3. Clinical symptoms and genetic defects in the 14 elucidated patients.



Fig. 3. Clinical pictures of patient 3 and patient 10.

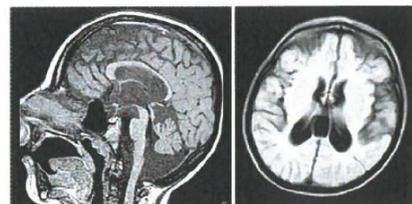


Fig. 4. Brain MRI of patient 3 (sagittal T1 and axial T2-Flair).

**Conclusion and take-home message**

We believe that this novel approach is the appropriate answer to a puzzling diagnostic challenge in patients who combine specific neurological, dermatological and growth features. This approach is able to quickly confirm the molecular diagnosis for classical presentations of Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum and is also able to unravel unexpected phenotypes with combined features or very mild symptoms.

Cutaneous photosensitivity / pigmentary changes and/or Growth failure + neurological symptoms (mental retardation, even mild) → DNA repair disorders

## **Détection de la présence de bisphéno A dans les milieux de culture d'embryons humains**

Roger LEANDRI (Groupe de recherche en fertilité humaine (Equipe d'accueil N° 3694) – Université de Toulouse (UPS))

Parmi les perturbateurs endocriniens, le bisphéno A (BPA) constitue l'un des polluants chimiques environnementaux les plus répandus : on retrouve du BPA dans les urines de plus de 90% des américains. D'autres perturbateurs endocriniens (certains phtalates) ont été retrouvés dans des milieux de culture embryonnaire humaine. La recherche de BPA dans ces milieux n'est pas documentée. Or il a été montré que l'exposition à des doses faibles de BPA lors de la culture embryonnaire chez la souris perturbe le développement embryonnaire et se répercute sur la croissance post natale.

### Objectifs :

Nous nous proposons de doser, pour la première fois, la concentration en bisphéno A dans les principaux milieux de culture commercialisés dans le cadre de l'aide médicale à la procréation.

### Résultats attendus :

Nous avons réalisé des mesures préliminaires sur un petit nombre d'échantillons. Elles montrent que le BPA est présent dans un milieu de culture commercial à des taux avoisinant 1ng/mL. Cette concentration est très comparable à celle retrouvée dans le sang chez l'homme et pour laquelle des effets toxiques reproductifs sont suspectés.

Il est probable que le taux de BPA varie selon les milieux, en lien avec leurs méthodes de fabrication et/ou de conservation. Par ailleurs, il est possible que la supplémentation protéique influe par elle-même sur la présence de BPA. Le projet permettra de différencier les conditions d'exposition au BPA maximales et minimales au sein de pratiques de culture courantes en Assistance Médicale à la Procréation. Ces conditions de culture pourront servir de base à une étude animale cherchant à en comparer les effets sur le développement embryonnaire préimplantatoire, post-implantatoire et post-natal.

### Méthodologie :

On effectuera un dosage de la concentration en BPA basal (dans le conditionnement commercial) de 4 milieux commerciaux différents, puis après des incubations de durée différente à l'étuve à 37°C et selon des méthodes de culture habituelles (micro-gouttes sous huile minérale). Pour chaque condition, 3 expériences seront répétées contenant chacune 2 microgouttes soit 6 dosages de BPA par condition. L'effet de la supplémentation macromoléculaire sur le taux de BPA sera évalué sur un seul milieu en comparant l'effet de concentrations croissantes (0 ; 5 et 10 %) de 3 sources de macromolécules différentes (albumine humaine sérique purifiée, albumine recombinante, sérum synthétique de remplacement).

Les dosages de BPA seront réalisés à l'aveugle par l'équipe de la plateforme AXIOM de l'UMR 1331 Toxalim. Une méthode chromatographique (UPLC) couplée à la spectrométrie de masse (MS/MS) mise au point et utilisée par cette équipe sera utilisée. Cette équipe est rodée à ce type de dosage. Les analyses statistiques feront appel à des tests non paramétriques (Mann-Whitney ; Wilcoxon pour les séries appariées).

### **Publication :**

Gatimel N, Lacroix MZ, Chanthavisouk S, Picard-Hagen N, Gayrard V, Parinaud J, et al. Bisphenol A in culture media and plastic consumables used for ART. Hum Reprod. 7 janv 2016;31(7):1436-44.

## **Séquençage à haut débit et diagnostic de la déficience intellectuelle (retard mental)**

Jean-Louis MANDEL (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire, Strasbourg)

Plus de 200 gènes sont impliqués dans les formes monogéniques de déficience intellectuelle (DI) / retard mental (RM), et environ une centaine d'entre eux sont situés sur le chromosome X. La moitié des gènes liés à l'X est responsable de formes non ou pauvrement syndromiques, tandis que l'autre moitié est responsable de formes généralement syndromiques, mais responsables aussi dans quelques cas de formes appartenant à la définition non syndromique, en raison de la présence de mutations « douces » et / ou d'une pénétrance incomplète des signes cliniques associés au syndrome. Le diagnostic est assez simple pour les patients avec des formes syndromiques évocatrices telles que le syndrome de Coffin-Lowry (RSK2), les syndromes ATRX et ARX ou bien les patients atteints de maladies métaboliques. En revanche, pour les patients qui ne présentent pas de symptômes clairement évocateurs d'un syndrome en particulier, le diagnostic est limité aux tests de l'X fragile et à une analyse par CGH array. La majorité des cas de DI nonsyndromique restent donc non diagnostiqués. Nous proposons de concevoir une capture d'exon pour le séquençage à haut débit de 220 gènes clairement impliqués dans la DI. Nous allons développer et valider des stratégies de « pooling » de manière à réduire les coûts, et des stratégies d'analyse des variants pour permettre une interprétation rapide des résultats. Ces deux mises au point sont en effet nécessaires pour la mise en place d'une utilisation routinière de la technique en diagnostic génétique. Nous avons entrepris une telle étude de diagnostic par séquençage haut débit sur le cas « simple » du syndrome de Bardet-Biedl pour lequel 16 gènes seulement sont responsables de 80% des cas, et les résultats sont plus qu'encourageants. Nous souhaitons maintenant évaluer cette stratégie pour la DI, maladie beaucoup plus complexe et beaucoup plus fréquente, de manière à mettre en place un dépistage pour les échantillons de patients négatifs pour l'X fragile et les tests de CGH-array qui sont reçus chaque année dans notre laboratoire de diagnostic (hôpital de l'université de Strasbourg) et dans d'autres laboratoires en France. En plus du développement d'un test diagnostic pour l'ensemble de ces cas sporadiques, cette étude permettra de mieux évaluer quelle est la contribution de chaque gène à la DI sporadique, et pourra révéler des corrélations génotype / phénotype cliniquement pertinentes, utiles pour améliorer les soins médicaux et / ou pédagogiques pour les différents patients atteints de DI, suivant leur diagnostic génétique.

### **Publications :**

1. Piton A, Poquet H, Redin C, Masurel A, Lauer J, Muller J, et al. 20 ans après: a second mutation in MAOA identified by targeted high-throughput sequencing in a family with altered behavior and cognition. *Eur J Hum Genet.* juin 2014;22(6):776-83.
2. Piton A, Redin C, Mandel J-L. XLID-causing mutations and associated genes challenged in light of data from large-scale human exome sequencing. *Am J Hum Genet.* 8 août 2013;93(2):368-83.
3. Redin C, Gérard 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. *J Med Genet.* 11 janv 2014;51(11):724-36.

## **Diagnostic Prénatal Non Invasif (DPNI) de la Mucoviscidose par MEMOPCR en temps réel**

Marie-Claire VINCENT (Laboratoire de Génétique Moléculaire de Maladies Rares, CHU Montpellier)

La possibilité récente d'analyser l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel a ouvert une nouvelle ère en matière de diagnostic prénatal (DPN). Le DPN « non invasif » (DPNI) est devenu désormais l'approche de choix pour la détermination du sexe fœtal (maladies génétiques liées au chromosome X) et du génotype RhD. Le DPNI commence à trouver des applications dans le diagnostic de maladies monogéniques pour les mutations de transmission paternelle. Cependant de nombreuses mises au point d'ordre technologique restent encore à faire avant de proposer ces tests en routine, en tenant compte de divers aspects connexes (coût, fiabilité (faux négatif..), complexité des équipements et des analyses bioinformatiques...).

**Nous proposons de développer et de valider analytiquement et cliniquement un test de DPNI de la mucoviscidose à partir de sang maternel par l'analyse de l'ADN fœtal libre circulant (cff-DNA, cell-free fetal DNA) en recherchant la mutation paternelle dans les familles présentant une hétérozygotie composite au niveau du gène *CFTR*.**

Le test reposera sur la méthode MEMO associée à une plateforme de PCR en temps réel, pour la détection de traces d'ADN mutant. Cette technique est utilisée avec succès pour les mutations en mosaïque (moins de 1%) des gènes communs de cancers. Une détection positive de la mutation paternelle sera systématiquement vérifiée par une seconde technique de mini-séquençage.

Préalablement au test spécifique *CFTR*, le profil d'ADN de chaque échantillon sera déterminé à l'aide d'un kit commercial de miniSTR adapté aux analyses délicates. Un profil tri-allélique sur plusieurs marqueurs attestera de la présence d'ADN fœtal dans le spécimen étudié et limitera ainsi les faux négatifs liés à l'absence ou à un taux insuffisant de cff-DNA. L'étape de validation analytique de nos méthodes sera réalisée sur des échantillons témoins d'ADN chimériques créés artificiellement. Elle sera suivie d'une phase de validation clinique par étude rétrospective de sérums maternels de femmes enceintes ayant fait l'objet d'une demande de DPN ou DPI (diagnostic préimplantatoire) de mucoviscidose au laboratoire pendant la période d'étude (2012– 2013), notre structure étant un centre référent pour le DPI, le DPN et le DNN (dépistage néonatal) de la mucoviscidose. Les échantillons seront recueillis en respectant la réglementation en vigueur.

La validation des tests proposés permettra :

- de disposer d'un contrôle de qualité (CQ) externe attestant de la présence d'un ADN minoritaire dans l'échantillon à analyser. Ce CQ sera associable à tout test de DPNI consistant à rechercher une séquence génomique absente du génome maternel
- de disposer d'une méthode ultrasensible pour détecter un ADN mutant à l'état de trace, la maîtrise de cette méthode permettra de développer facilement de nouveaux tests DPNI pour d'autres maladies monogéniques par la recherche de mutations de même nature.

Notre projet, limité à la recherche de l'allèle paternel dans les familles avec hétérozygotie composite *CFTR*, est une première étape dans le développement d'une approche non invasive de DPN de la mucoviscidose.

### **Publications :**

1. Guissart C, Dubucs C, Raynal C, Girardet A, Tran Mau Them F, Debant V, et al. Non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) of cystic fibrosis: an optimized protocol using MEMO fluorescent PCR to detect the p.Phe508del mutation. *Journal of Cystic Fibrosis* [Internet]. déc 2016
2. Guissart C, Debant V, Desgeorges M, Bareil C, Raynal C, Toga C, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of monogenic disorders: an optimized protocol using MEMO qPCR with miniSTR as internal control. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [Internet]. 1 janv 2015 [cité 22 avr 2016];53(2).
3. Guissart C, Tran Mau Them F, Debant V, Viart V, Dubucs C, Pritchard V, et al. A Broad Test Based on Fluorescent-Multiplex PCR for Noninvasive Prenatal Diagnosis of Cystic Fibrosis. *FDT*. 17 août 2018;1-10.

C. Guissart, C. Debucs, V. Debant, F. Trau Mau Them, A. Girardet, C. Raynal, C. Rouzier, A. Boureau-Wirth, E. Haquet, J. Puechberty, P. Khau Van Kien, E. Bieth, D. Dupin Deguine, MP Bréchar, C. Toga, M. Koenig, M. Claudres, MC Vincent

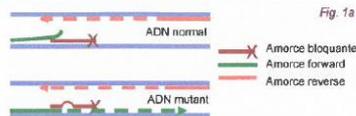
### Contexte

Limiter le risque de perte fœtale lors d'un diagnostic prénatal de la mucoviscidose par recherche de l'allèle muté paternel au niveau du sang maternel dans les couples à risque de mucoviscidose par hétérozygotie composite.

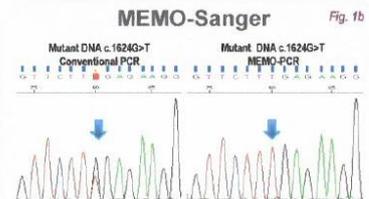
### Matériels et Méthodes

Figure 1 : MEMO-PCR (Lee et al 2011).

1a: schéma du principe d'enrichissement du produit de PCR en allèle muté par blocage de l'amplification de l'allèle normal à l'aide d'une amorce spécifique supplémentaire.



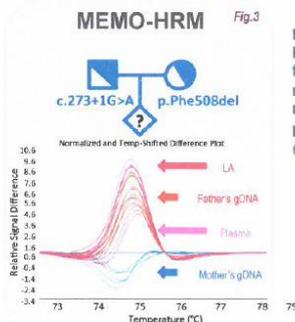
1b: comparaison de séquence d'un produit de PCR conventionnelle avec celle d'un produit de MEMO PCR qui illustre l'enrichissement par une non visualisation de la base normale en MEMO PCR au profit de la base mutée.



### Résultats et discussion

- Utilisation validée sur 43 plasmas, du kit AmpF<sup>STR</sup> MiniFiler PCR Amplification, comme contrôle de qualité de la présence de cfDNA dans l'échantillon analysé (Guissart et al 2015).
- Validation de la MEMO-PCR en association aux outils de biologie moléculaire classique comme test simple, rapide et efficace de DPNNI (Figure 3 et 4)

Figure 3 : MEMO-qPCR-HRM : le plasma a le même profil que l'ADN génomique du père, le fœtus a donc hérité de l'allèle paternel muté 273+1G>A



1<sup>ère</sup> phase : Validation analytique des méthodes à partir de chimères d'ADN témoins créés artificiellement pour mimer l'ADN extrait du plasma maternel

2<sup>ème</sup> phase : Validation clinique par une étude rétrospective de plasmas de femmes enceintes ayant fait l'objet d'une demande de DPN de mucoviscidose [ASNM 2012-AO1183-40, CPP Sud Méditerranée 3 -2013/01/05, UF9039], soit 31 plasmas de femmes enceintes entre la 9<sup>ème</sup> et 36<sup>ème</sup> SA (18 sur signes d'appels échographiques et 13 pour antécédents familiaux).

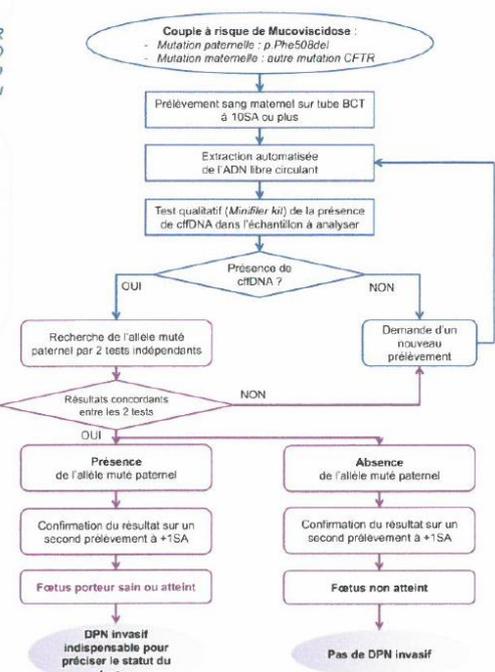
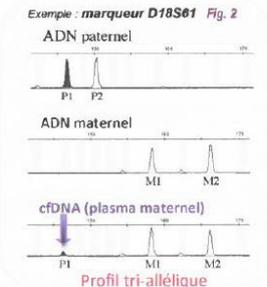
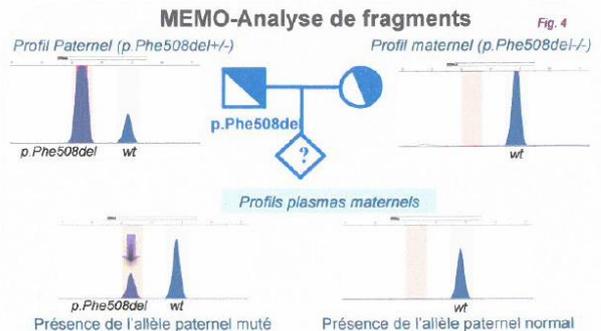


Figure 2 : exemple de contrôle. présence au niveau de l'ADN libre circulant extrait du plasma de la femme enceinte des 2 allèles maternels majoritaires (M1 et M2) et d'un allèle minoritaire (P1) hérité du père. Ce profil tri-allélique confirme la présence de cfDNA dans l'échantillon analysé.



**Mutations validées :**  
 p.Gly542\*  
 p.Ser42Phe  
 p.Gln220\*  
 p.Leu88Ilefs\*22  
 p.Phe508del

Figure 4 : MEMO-PCR-analyse de fragment pour la recherche de l'allèle muté paternel p.Phe508del (wt: allèle sauvage)



### Conclusions et perspectives

- Réduction du nombre de gestes invasifs pour le DPN des familles avec hétérozygotie composite par recherche de l'allèle muté paternel p.Phe508del selon le logigramme ci dessus.
- Maîtrise d'outils diagnostiques pour le développement de tests de DPNNI « à façon » pour d'autres maladies monogéniques.