

**Projets de recherche financés dans le cadre de l'appel d'offres 2013
« AMP, diagnostic préimplantatoire et diagnostic génétique »
Résumés résultats et publications**

Chercheur	Sujet de recherche	Subvention allouée
BUJAN Louis	<u>Motivations et aspects psychologiques du don de gamètes : étude prospective multicentrique nationale</u>	30 000 €
DE MONTGOLFIER Sandrine	<u>Information de la parentèle en génétique : enjeux et mise en œuvre de cas de maladie génétique à caractère familial</u>	30 000 €
KOSHNOOD Babak	<u>Assistance médicale à la procréation et risque de cardiopathies congénitales : études en population</u>	30 000 €
LACROIX Odile	<u>Apport du dosage du CD146 soluble dans le milieu de culture embryonnaire en fécondation in vitro</u>	30 000 €
LE MARECHAL Cédric	<u>Diagnostic des maladies rares autosomiques récessives : apport du séquençage haut débit (NGS) pour le conseil génétique des cas sporadiques</u>	30 000 €
METZLER-GUILLEMAIN Catherine	<u>Lamina nucléaire et spermiogenèse : vers de nouveaux marqueurs de qualité des spermatozoïdes humains</u>	30 000 €
NECTOUX Juliette	<u>Mise en place du diagnostic prénatal non invasif des maladies monogéniques rares et sévères</u>	30 000 €
RIVES Nathalie	<u>Modification de la spermiogenèse après maturation in vitro du tissu testiculaire frais ou décongelé de souris prépubère</u>	30 000 €
RIVIERE Jean-Baptiste	<u>Détection prénatale non invasive d'aneuploïdies sur plasma maternel par séquençage haut débit ciblé</u>	30 000 €
WHALEN Sandra	<u>Nature et fréquence des étiologies associées aux pieds bots varus équin d'apparence isolée diagnostiqués en période prénatale</u>	30 000 €
ATTIE-BITACH Tania	<u>Explorations moléculaires des anomalies du corps calleux par séquençage haut débit</u>	25 000 €
STEFFANN Julie	<u>Amélioration des procédures de diagnostic prénatal des maladies génétiques résultant de mutations de l'ADN mitochondrial</u>	25 000 €
HALET Guillaume	<u>Rôles de la PI3-kinase beta dans la qualité ovocytaire et la viabilité des embryons pré-implantatoires</u>	20 000 €
COSSEE Mireille	<u>Etude pilote de mise en place du diagnostic des myopathies et dystrophies musculaires par séquençage haut débit</u>	18 000 €
MULLER Françoise	<u>Impact du dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs sériques maternels du 1er trimestre sur le diagnostic prénatal du spina bifida</u>	12 000 €

Thèmes de recherche :

- 1. Sciences humaines, économiques et sociales, santé publique, épidémiologie et/ou 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**
- 5. Préservation de la fertilité**

Motivations et aspects psychologiques du don de gamètes : étude prospective multicentrique nationale (Louis BUJAN)

Au cours de la révision de la loi de bioéthique, les principes de recrutements des donneurs de gamètes ont été modifiés par les nouveaux textes. En effet, la loi de juillet 2011, malgré le fait qu'elle préserve l'anonymat du don et la gratuité, apporte une innovation. Le donneur ou la donneuse de gamètes ne sont plus dans l'obligation d'avoir procréé. De plus, cette loi prévoit la possibilité pour les donneurs(es) n'ayant pas procréé de conserver des ovocytes ou des spermatozoïdes à leurs bénéficiaires. Ce changement va probablement être à l'origine d'une nouvelle population de donneurs et donneuses. Ces différents points suscitent de nombreux questionnements, dans les équipes médicales notamment sur la motivation, les caractéristiques psychologiques et sociodémographiques des donneurs et donneuses.

En France, peu d'études ont abordé les questions des motivations des donneurs(es) de gamètes et leur profil psychologique. Au niveau international plusieurs études se sont intéressées avant tout aux aspects psychosociaux et aux possibles motivations mais dans des contextes différents du contexte français.

Notre étude vient dans ce contexte particulier de changement du texte de loi.

L'objectif du projet est d'étudier les caractéristiques de personnalité et les motivations des donneurs et donneuses dans les différentes modalités de recrutement et ainsi de répondre aux questionnements liés à l'approche du don, ses représentations ainsi que les motivations et le profil des donneurs et donneuses.

La méthodologie utilisée est mixte avec une approche quantitative et qualitative : pour la première, une approche psychosociale sur un large effectif (400 donneurs et 400 donneuses) avec deux groupes : donneurs de gamètes sans enfants, et donneurs qui ont déjà procréé. Deux questionnaires seront utilisés lors de cette enquête : sur la motivation et les traits de personnalité des donneurs (ses). La seconde approche est qualitative par une étude de cas clinique. C'est une approche psychodynamique, qui prend en considération le donneur et la donneuse, avec toute leur subjectivité, leur histoire personnelle et familiale et leurs représentations. 60 sujets, 30 donneurs versus 30 donneuses, seront reçus pour des entretiens cliniques.

La recherche sera réalisée grâce à la collaboration entre les équipes de la Fédération des CECOS et les laboratoires de recherche, en médecine de la reproduction, en psychopathologie ainsi que le laboratoire de développement et processus de socialisation. Elle sera ouverte à toutes les autres équipes qui travaillent dans le champ du don de gamètes en dehors des CECOS.

Les résultats attendus permettront de mieux comprendre les motivations des donneurs et de montrer les liens de ces derniers avec le statut du donneur (se) (ayant procréé ou pas) et les relations avec cette possibilité d'autoconservation. Une meilleure connaissance de ces différents points sera fortement utile tant dans les campagnes d'information que dans la pratique clinique.

Information de la parentèle en génétique : enjeux et mise en œuvre de cas de maladie génétique à caractère familial (Sandrine DE MONTGOLFIER)

La loi de bioéthique de 2004 révisée en 2011 prévoit lors de tout examen des caractéristiques génétiques d'une personne, une information et une procédure de transmission de cette information à la parentèle du patient, si une anomalie génétique grave, pour laquelle il existe des mesures de prévention ou de soins, était diagnostiquée. L'objectif de ce projet est d'étudier la mise en œuvre de cette information de la parentèle aux regards des évolutions de la loi de 2011 et des attentes des différents acteurs concernant les maladies génétiques familiales. L'information à la parentèle d'un résultat d'un test génétique est une question ancienne qui a souvent conduit à des débats autour de l'importance de cette transmission dans les cas où des vies humaines pourraient être sauvées, mais aussi de la légitimité d'une telle transmission dans les autres cas, du conflit qui l'oppose au respect du secret médical, de la responsabilité pouvant reposer sur les personnes impliquées dans cette procédures d'information. Cette recherche consistera à étudier les conditions de réalisation de la transmission d'une information génétique obtenue pour un patient, sujet index, aux membres de la famille : information donnée par le généticien, support documentaire, vocabulaire employé et justification, modalité de la transmission par les patients, par les professionnels, implication possibles des associations de patients Nous nous proposons d'analyser cette question éthique sous les trois angles disciplinaires suivant :

- L'analyse juridique : qui permettra d'explorer 1/la question de la responsabilité mettant en perspective les choix juridiques réalisés en France avec les positions prises à l'étranger et en particulier en Amérique du Nord ; 2/les conditions d'applicabilité de la loi actuelle, Ces travaux seront menés dans le contexte actuel d'adoption du décret d'application de la loi de bioéthique sur les tests génétiques.

- L'étude de la posture déclarative de l'ensemble des acteurs de l'information de la parentèle (professionnels, institutionnels et associatifs) afin de mieux cerner la position des généticiens sur cette question éthique. Nous souhaitons à l'aide d'une étude empirique par questionnaire leur donner la parole et leur permettre d'exprimer leurs questions, de témoigner de leur pratique antérieure ou non à la loi et de les inviter à expliciter leur perception des enjeux éthiques de cette pratique.

- Le vécu des acteurs sur le terrain par une analyse de type ethnographique explorant la perception des patients, de leur famille et des professionnels du service, et les questions éthiques associées en fonction des pathologies et de leur incidence familiale : l'enquête aura lieu dans deux services de génétiques autour de trois maladies génétiques différentes.

- Unité des maladies génétiques du globule rouge (UMGGR)- médecine interne. Hôpital Henri Mondor (Créteil). Service dirigé par les **Pr Frédéric Galactéros**. Nous avons défini avec l'équipe de travailler sur les maladies génétiques suivantes : l'hémochromatose et la drépanocytose.

- Département de Biologie des tumeurs - Service Génétique. Institut *Curie*. Chef de département. **Pr Dominique Stoppa Lyonnet**. Nous avons défini avec l'équipe de travailler sur les cancers du sein et de l'ovaire d'origine génétique : mutation BRCA1 et BRCA2

La finalité de ce projet serait en fonction des résultats de construire et d'élaborer avec des généticiens cliniciens les modalités de l'information de la parentèle : critères, support, ressources

Publications :

1. D' Audiffret Van Haecke D, de Montgolfier S. Genetic Test Results and Disclosure to Family Members: Qualitative Interviews of Healthcare Professionals' Perceptions of Ethical and Professional Issues in France. *J Genet Couns.* juin 2016;25(3):483-94.

2. Haecke D d'Audiffret V, Montgolfier S de. Genetic diseases and information to relatives: practical and ethical issues for professionals after introduction of a legal framework in France. *European Journal of Human Genetics.* juin 2018;26(6):786-95.

Assistance médicale à la procréation et risque de cardiopathies congénitales : études en population (Babak KOSHNOOD)

Objectifs: 1) Evaluer le rôle des grossesses multiples dans l'association entre AMP et risque de cardiopathies congénitales spécifiques; 2) Etudier l'impact de la conception par AMP sur le diagnostic prénatal et le recours à l'interruption médicale de grossesse chez les fœtus porteurs de cardiopathies congénitales ; 3) Etudier l'impact de la conception par AMP sur le devenir périnatal et néonatal précoce chez les fœtus porteurs de cardiopathies congénitales

Méthodes : Deux sources de données seront utilisées : 1) le Registre des Malformations Congénitales de Paris et 2) l'étude EPICARD (Etude sur le devenir des enfants porteurs de cardiopathies congénitales). Pour le premier objectif, une méthodologie cas-témoins et des modèles contrefactuels seront utilisés pour distinguer l'effet direct de l'AMP sur le risque de cardiopathie et l'effet indirect de l'AMP médié par la multiplicité. Pour les deuxième et troisième objectifs, une méthodologie de « cohorte » (exposés à l'AMP vs. non-exposés à l'AMP) sera utilisée. Les analyses porteront sur l'ensemble des cas de cardiopathies ainsi que des catégories (cas sans anomalies chromosomiques, sous-catégories homogènes de cardiopathies définies selon une classification anatomo-clinique récemment établie par notre équipe (Houyel et al, 2011). Les analyses statistiques feront appel à des modèles de régression binomiale pour évaluer l'effet de l'AMP sur le diagnostic prénatal, le recours à l'IMG et le devenir périnatal et néonatal précoce (prématurité, retard de croissance, mort in utero, mortalité néonatale). La variable prédictive principale, l'AMP, sera étudiée en quatre catégories : aucune, inducteurs seuls, FIV, et ICSI. Les variables considérées comme facteurs de confusion potentiels ou d'interaction incluent les caractéristiques maternelles (âge, origine géographique, profession, parité), l'âge paternel et l'année d'enregistrement des cas.

Résultats attendus : Ces études peuvent permettre d'apporter des informations nouvelles concernant d'une part le risque de cardiopathies congénitales spécifiques chez les enfants conçus par AMP et d'autre part la prise en charge prénatale (diagnostic, interruption de grossesse) et le devenir périnatal et néonatal précoce des fœtus conçus par AMP et porteurs de cardiopathies.

Publications :

1. Tararbit K, Lelong N, Houyel L, Bonnet D, Goffinet F, Khoshnood B. Assessing the role of multiple pregnancies in the association between tetralogy of Fallot and assisted reproductive techniques: a path-analysis approach. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 20 févr 2014;9(1):1.
2. Tararbit K, Lelong N, Thieulin A-C, Houyel L, Bonnet D, Goffinet F, et al. The risk for four specific congenital heart defects associated with assisted reproductive techniques: a population-based evaluation. *Hum Reprod*. 2 janv 2013;28(2):367-74.
3. Tararbit K, Lelong N, Jouannic J-M, Goffinet F, Khoshnood B. Is the probability of prenatal diagnosis or termination of pregnancy different for fetuses with congenital anomalies conceived following assisted reproductive techniques? A population-based evaluation of fetuses with congenital heart defects. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1 juin 2015;122(7):924-31.

Apport du dosage du CD146 soluble dans le milieu de culture embryonnaire en fécondation in vitro (Odile LACROIX)

Deux acteurs principaux jouent un rôle majeur dans l'implantation embryonnaire, l'embryon et l'endomètre. La connaissance du versant embryonnaire a largement bénéficié de l'essor des techniques de fécondation in vitro (FIV) et des critères de sélection morphologique de plus en plus précis ont pu être établis. Les taux de grossesses en FIV restent cependant comparables à ceux d'un cycle spontané, avec deux embryons transférés en moyenne et un risque de grossesses multiples de ce fait élevé. Du côté maternel, un endomètre réceptif est le pré-requis indispensable. Les facteurs angiogéniques régulant la croissance et le remodelage vasculaire pendant la grossesse sont d'un intérêt majeur, mais restent encore mal connus. La connaissance des mécanismes de l'implantation et l'identification des marqueurs d'implantation permettant la sélection d'un seul embryon à transférer sans diminuer les chances de grossesses, sont une priorité dans la recherche actuelle. Initialement décrite comme un facteur angiogénique, CD146 soluble représente un candidat potentiel. Récemment elle a été découverte comme un facteur régulant l'invasion trophoblastique. De plus, l'injection répétée de CD146s diminue la fertilité dans un modèle de rate gestante ($62.7\% \pm 12.5$ dans le groupe non traité versus $38.7\% \pm 6.9$, dans le groupe traité, $p= 0.03$) ainsi que le nombre d'embryons par portée.

L'objectif principal de ce projet est de corréliser les taux de CD146s dosé dans les milieux de culture embryonnaire à la survenue ou non d'une grossesse après transfert embryonnaire en FIV, afin de déterminer si le CD146s peut constituer en FIV un biomarqueur non invasif de l'implantation embryonnaire (marqueur de mauvaise implantation en cas d'excès).

Les objectifs secondaires sont :

- d'analyser si ce biomarqueur est fonctionnel en étudiant l'activité de CD146s dans les milieux de culture embryonnaire récupérés après le transfert d'embryons, à l'aide de tests fonctionnels réalisés sur des trophoblastes en culture
- d'étudier le mécanisme de l'effet inhibiteur du CD146s sur la migration/invasion des trophoblastes extravilloux en identifiant le ou les partenaires d'interaction du CD146s

Résultats attendus :

- Montrer l'existence d'une corrélation entre l'absence de survenue de grossesse et les taux de CD146s prélevés dans les milieux de culture provenant des plots où les embryons transférés ont été cultivés
- Montrer l'existence d'une diminution de l'invasion et de l'angiogenèse placentaire dans les cultures de trophoblaste traitées avec les milieux de culture embryonnaire dans les cas où il y a eu échec d'implantation
- Identifier le ou les partenaires d'interaction de CD146s dans la régulation de l'invasion trophoblastique parmi ceux décrits dans la littérature (VEGR2, galectine 1)

Méthodologie :

- Etude prospective avec établissement de 2 groupes rétrospectivement en fonction de la survenue ou non d'une grossesse (effectif statistiquement évalué à 164 cas/groupe).
- Dosage de CD146s dans les milieux de culture des embryons transférés à l'issue de la tentative de fécondation in vitro
- Analyse de l'activité du marqueur provenant de ces milieux à l'aide de tests fonctionnels sur les cellules trophoblastiques permettant de mesurer les capacités invasives, migratoires et angiogéniques de ces cellules
- Détermination des partenaires d'interaction de CD146s sur la capacité migratoire des trophoblastes in vitro.

Brevet :

Bardin N, Blot-Chabaud M, BOUVIER S, LACROIX O, DIGNAT-GEORGE F, GRIS J-CR. Utilisation de cd146 soluble en tant que biomarqueur pour sélectionner un embryon fertilisé in vitro pour implantation dans un mammifère. WO2016170021A1, 2016

Publication :

Bouvier S, Paulmyer-Lacroix O, Molinari N, Bertaud A, Paci M, Leroyer A, et al. Soluble CD146, an innovative and non-invasive biomarker of embryo selection for in vitro fertilization. PLOS ONE. 14 mars 2017;12(3):e0173724.

Diagnostic des maladies rares autosomiques récessives : apport du séquençage haut débit (NGS) pour le conseil génétique des cas sporadiques (Cédric LE MARECHAL)

Suspectée depuis longtemps, l'implication de la génétique dans les anomalies du développement ne cesse de se confirmer grâce aux nouvelles technologies d'analyses génomiques de type pangénomique (CGH-array, séquençage d'exome) qui sont entrées, ou commencent à être utilisées, comme tests diagnostiques de routine. Le dépistage des malformations par échographie fœtale est le principal motif de délivrance d'attestations d'interruption de grossesse pour motif médical (3145 en 2010 en France). Les analyses cytogénétiques prescrites dans cette situation identifient une anomalie dans 8 à 35 % des cas et des travaux récents confirment que la CGH-array a la capacité de détecter 6% d'anomalies supplémentaires. Le conseil génétique proposé lors du bilan étiologique post-natal des troubles des acquisitions ou du développement a pour objectif d'évaluer le risque de récurrence chez les couples demandeurs d'un recours au diagnostic anténatal. Dans ce contexte, le dépistage d'anomalies chromosomiques par CGH-array identifie une anomalie dans 15% des cas.

En l'état actuel des connaissances, la détection d'un remaniement chez le cas index, l'étude de la transmission intra-familiale du remaniement est au centre de l'interprétation du résultat en considérant qu'une anomalie chromosomique transmise par un parent de phénotype normal est un argument pour rassurer ces familles quant au rôle pathologique de l'anomalie identifiée. Toutefois, nous émettrons l'hypothèse que certaines situations diagnostiques seraient des maladies rares autosomiques récessives composites (réarrangement et mutation ponctuelle en Trans) dont le risque de récurrence serait alors de 25% à chaque grossesse. L'arrivée du séquençage haut débit aussi appelé NGS (Next Generation Sequencing) rend désormais possible l'identification des gènes de maladies dans des situations jusqu'alors inenvisageables.

Dans ce travail, nous proposons d'intégrer l'identification de mutations ponctuelles par séquençage massivement parallèle (NGS) en complément des analyses cytogénétiques utilisées en diagnostic de routine (caryotype standard ou CGH-array). L'objectif principal de ce travail pilote est de tenter d'identifier un deuxième allèle muté en Trans d'un remaniement, synonyme de pathologie autosomique récessive, en focalisant l'analyse dans les séquences remaniées ; un reséquençage systématique sera réalisé par NGS ciblé sur tous les exons et les séquences manquantes des gènes annotés dans ces loci. Les objectifs secondaires seront : 1) de montrer la faisabilité du NGS en routine diagnostique, 2) préciser les arbres décisionnels 3) appréhender l'interprétation et le rendu des résultats 4) contribuer à la connaissance des maladies rares.

Dans cette étude rétrospective nous avons sélectionné 15 cas qui représentent le groupe de patients avec un fort potentiel pour l'identification d'un deuxième allèle muté. Tous représentent un phénotype pathologique assez sévère et sont porteurs de variants du nombre de copies (CNV) récurrents considéré comme pathologique car contenant un ou plusieurs gènes rapportés dans la littérature comme associés à un phénotype particulier ou d'une translocation ou inversion. Le prolongement de ce travail, selon les résultats et contraintes techniques, sera d'appliquer la stratégie diagnostique (combinaison cytogénétique et NGS) que nous proposons de mettre en œuvre dans ce projet en prospectif et dans des situations d'urgence diagnostique (femmes enceintes).

Lamina nucléaire et spermiogenèse : vers de nouveaux marqueurs de qualité des spermatozoïdes humains (Catherine METZLER-GUILLEMAIN)

La lamina nucléaire (LN) est constituée d'un réseau de protéines interposé entre la chromatine et la membrane nucléaire interne, à laquelle il est étroitement associé. La LN se compose essentiellement de lamines. La littérature montre que la LN joue un rôle très important dans le remodelage intense du noyau et de la chromatine qui se produit pendant la spermiogenèse, lorsque les spermatides rondes se transforment en spermatozoïdes. D'après les études réalisées dans d'autres types de cellules on sait que les lamines interagissent avec différentes protéines pour lier la LN au cytosquelette (protéines à domaine SUN, Nesprines) et à la chromatine (protéines à domaine LEM). En revanche, très peu de données sont disponibles concernant la LN ou ses protéines d'interaction au cours de la spermiogenèse humaine.

Le premier objectif de notre projet est de définir la nature de la LN et de ses protéines d'interaction pendant la spermiogenèse humaine. Nous déterminerons d'abord quelles lamines et de leurs protéines d'interaction connues sont présentes dans les spermatides, par analyse en RT-PCR à partir de l'ARN des spermatozoïdes, et par immunocytochimie (IC) sur des spermatides et spermatozoïdes. Dans une deuxième phase, nous utiliserons la technique du double hybride dans la levure pour identifier les autres protéines qui interagissent avec la LN en utilisant une banque de cDNAs fabriquée à partir d'ARNm présents dans les spermatozoïdes humains. Nous étudierons la capacité des protéines d'interaction candidates fusionnées avec la GFP (green fluorescent protein) à localiser au niveau de la LN quand elles sont surexprimées dans des lignées cellulaires humaines. Lors de la troisième phase, nous utiliserons des anticorps (que nous produirons ou d'origine commerciale) sur des cellules germinales testiculaires pour connaître la localisation des protéines identifiées comme interagissant avec la LN au cours de la spermiogenèse. Enfin, ces protéines seront utilisées comme biomarqueurs d'altération de la LN par criblage en IC d'échantillons de sperme venant d'hommes fertiles et infertiles.

Ces résultats permettront d'élaborer un modèle de la LN au cours de la spermiogenèse humaine d'évaluer l'impact des anomalies fonctionnelles de la LN sur la fertilité masculine. De manière plus générale, la meilleure connaissance du remodelage nucléaire au cours de la spermatogenèse nous apportera l'opportunité de découvrir un nouvel éventail de protéines associées à la lamina nucléaire qui pourraient jouer un rôle dans d'autres tissus. Ces perspectives pourraient ouvrir le champ de nouvelles pistes thérapeutiques pour les patients atteints de laminopathies.

Publications :

1. Elkhatib RA, Paci M, Boissier R, Longepied G, Auguste Y, Achard V, et al. LEM-domain proteins are lost during human spermiogenesis but BAF and BAF-L persist. *Reproduction*. 2017;154(4):387-401.
2. Elkhatib R, Longepied G, Paci M, Achard V, Grillo J-M, Levy N, et al. Nuclear envelope remodelling during human spermiogenesis involves somatic B-type lamins and a spermatid-specific B3 lamin isoform. *Mol Hum Reprod*. 3 janv 2015;21(3):225-36.

Mise en place du diagnostic prénatal non invasif des maladies monogéniques rares et sévères (Juliette NECTOUX)

Objectifs

La présence d'ADN fœtal dans le plasma des femmes enceintes a permis le développement du diagnostic prénatal non invasif (DPNi) des aneuploïdies et de certaines maladies monogéniques sévères grâce au recueil d'un échantillon sanguin maternel, s'affranchissant ainsi des risques de perte fœtale entraînés par la biopsie de trophoblaste et l'amniocentèse. Les applications du DPNi encadrées à ce jour par la Haute Autorité de Santé sont limitées à la recherche de séquences normalement absentes du génome maternel (détermination du sexe et du rhésus D fœtal). La détection de mutations portées par l'ADN fœtal libre représente un véritable défi technologique du fait de la coexistence et de la prédominance de séquences d'ADN similaires d'origine maternelle. Le développement de technologies innovantes de biologie moléculaire telles que le séquençage de nouvelle génération (NGS) ou la PCR digitale (PCRd), permet désormais la détection, le séquençage et la quantification simultanée de milliers de séquences. L'utilisation de ces technologies dans la pratique clinique courante nécessite une évaluation précise de la performance diagnostique de ces tests, et de leur faisabilité dans un contexte de laboratoire de diagnostic moléculaire hospitalier.

Résultats attendus

Dans le cadre de la récente création d'une plateforme de NGS et PCRd dans le groupe hospitalier Cochin-Broca-Hôtel Dieu, nous envisageons de développer le DPNi de certaines maladies monogéniques rares et sévères pour lesquelles les laboratoires de génétique des hôpitaux Cochin-Broca-Hôtel Dieu (Paris) et Henri Mondor (Créteil) sont laboratoires de référence, grâce à la mise au point de :

- la détection de mutations absentes du génome maternel, pour les maladies *de novo* (achondroplasie) ou les maladies dominantes lorsqu'elles sont transmises par le père (neurofibromatose de type 1, NF1)
- la détection et/ou le séquençage et la quantification des mutations d'origine maternelle et/ou paternelle pour les maladies liées à l'X (myopathie de Duchenne DMD et hémophilie), récessives (mucoviscidose), ou dominantes lorsqu'elles sont transmises par la mère (NF1).

Nous envisageons la généralisation ultérieure de ces stratégies diagnostiques à l'ensemble des maladies monogéniques sévères, dans l'objectif d'améliorer la prise en charge du diagnostic prénatal en France.

Méthodologie

Il s'agit d'une étude prospective multicentrique non interventionnelle avec collection biologique, à visée diagnostique. Compte tenu de la fréquence de chaque maladie, de leur risque de transmission ($\frac{1}{2}$ à $\frac{1}{4}$ selon les cas), et des possibilités de recrutement de l'ensemble des centres impliqués dans cette étude, nous envisageons de tester environ 5DPNi/an pour l'achondroplasie, 20 DPNi/an pour la mucoviscidose et l'hémophilie, et 30 DPNi/an pour NF1 et DMD, ce qui représente donc approximativement 210 tests sur 2 ans. En fonction de la pathologie, du type de mutation, du parent transmetteur et du sexe du fœtus, la proportion d'ADN fœtal sera évaluée et la mutation pathogène sera détectée et/ou séquencée par PCRd et/ou NGS. Les performances diagnostiques de chaque stratégie seront évaluées en termes de sensibilité et spécificité.

Publications :

1. Gruber A, Pacault M, El Khattabi LA, Vaucouleur N, Orhant L, Bienvenu T, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of paternally inherited disorders from maternal plasma: detection of NF1 and CFTR mutations using droplet digital PCR. Clin Chem Lab Med. 25 avr 2018;56(5):728-38.
2. Nectoux J. Current, Emerging, and Future Applications of Digital PCR in Non-Invasive Prenatal Diagnosis. Mol Diagn Ther. 1 avr 2018;22(2):139-48.
3. Orhant L, Anselem O, Fradin M, Becker PH, Beugnet C, Deburgrave N, et al. Droplet digital PCR combined with minisequencing, a new approach to analyze fetal DNA from maternal blood: application to the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia. Prenat Diagn. 1 mai 2016;36(5):397-406.
4. Orhant L, Rondeau S, Vasson A, Anselem O, Goffinet F, Khattabi LAE, et al. La PCR digitale, une nouvelle approche pour analyser l'ADN fœtal à partir du sang maternel : application à la détermination du génotype RHD fœtal. Annales de Biologie Clinique. 1 mai 2016;74(3):269-77.

Modification de la spermiogenèse après maturation *in vitro* du tissu testiculaire frais ou décongelé de souris prépubère (Nathalie RIVES)

Les cellules germinales souches sont des cibles de thérapies gonadotoxiques, comme la chimiothérapie ou radiothérapie utilisées dans le traitement du cancer. Des stratégies de préservation des cellules germinales doivent être mises en place chez le jeune garçon, la congélation du tissu qui peut être proposée avant l'introduction de traitements à forte toxicité apparaît la stratégie la plus adaptée. L'utilisation du tissu testiculaire prépubère décongelé peut s'envisager selon différentes modalités : (i) par maturation *in vitro*, (ii) par maturation *in vivo* après transplantation de cellules germinales ou greffe de tissu testiculaire. La maturation *in vitro* ou spermatogenèse *in vitro* évite la réintroduction de cellules cancéreuses, risque potentiel après transplantation de cellules germinales ou greffe tissulaire chez le patient guéri. Le développement de modèles animaux de congélation du tissu testiculaire pré pubère et de spermatogenèse *in vitro* est un préalable indispensable en vue d'une application humaine. Ainsi, la culture organotypique en matrice 3D semble être une approche prometteuse permettant la production *in vitro* de spermatides allongées ou de spermatozoïdes. Cependant, l'optimisation de ce système doit être effectuée de façon à en assurer sa reproductibilité avant d'envisager une application humaine. Il apparaît indispensable de vérifier si le processus de spermiogenèse obtenu *in vitro* est comparable à celui observé *in vivo*.

L'objectif principal de ce travail est d'optimiser le rendement de la spermiogenèse obtenue *in vitro* par adjonction de rétinol ou d'acide rétinoïque dans un système de culture organotypique en phase solide (matrice d'agarose) de tissu testiculaire frais de souris pré pubères. La spermiogenèse obtenue *in vitro* sera évaluée qualitativement et quantitativement par analyse histologique et par exploration des voies de l'apoptose et de l'autophagie. Les résultats obtenus seront comparés à ceux obtenus dans le cadre d'une spermiogenèse obtenue *in vivo* dans les conditions physiologiques. Pour les temps de culture permettant d'obtenir des spermatides allongées et des spermatozoïdes, le taux d'aneuploïdie de ces cellules haploïdes sera déterminé par hybridation *in situ* en fluorescence.

L'objectif secondaire sera d'utiliser la condition de culture qui augmente significativement le pourcentage de tubes séminifères présentant une spermiogenèse complète, sur des fragments de testicules décongelés issus de souris pré pubères.

Publications :

1. Arkoun B, Dumont L, Milazzo J-P, Rondanino C, Bironneau A, Wils J, et al. Does soaking temperature during controlled slow freezing of pre-pubertal mouse testes influence course of *in vitro* spermatogenesis? *Cell Tissue Res.* 29 déc 2015;364(3):661-74.
2. Dumont L, Arkoun B, Jumeau F, Milazzo J-P, Bironneau A, Liot D, et al. Assessment of the optimal vitrification protocol for pre-pubertal mice testes leading to successful *in vitro* production of flagellated spermatozoa. *Andrology.* 1 mai 2015;3(3):611-25.
3. Dumont L, Oblette A, Rondanino C, Jumeau F, Bironneau A, Liot D, et al. Vitamin A prevents round spermatid nuclear damage and promotes the production of motile sperm during *in vitro* maturation of vitrified pre-pubertal mouse testicular tissue. *Mol Hum Reprod.* déc 2016;22(12):819-32.
4. Oblette A, Rives N, Dumont L, Rives A, Verhaeghe F, Jumeau F, et al. Assessment of sperm nuclear quality after *in vitro* maturation of fresh or frozen/thawed mouse pre-pubertal testes. *Mol Hum Reprod.* 1 oct 2017;23(10):674-84.

Poster



Modifications de la spermiogénèse après maturation *in vitro* du tissu testiculaire frais ou décongelé de souris pré-pubère

Brahim Arkoun, Ludovic Dumont, Jean-Pierre Milazzo, Christine Rondanino, Amandine Bironneau, Nathalie Rives

EA 4308 « Gamétogénèse et Qualité du gamète »

Laboratoire de Biologie de la Reproduction-CECOS

IRIB – Université de Rouen

CHU-Hôpitaux de Rouen

76031 Rouen

Introduction

Une congélation de tissu testiculaire suivie d'une spermatogénèse *in vitro* reste une des stratégies expérimentales pouvant permettre la préservation et la restauration de la fertilité masculine du jeune garçon après traitement du cancer (chimiothérapie ou radiothérapie).

Les travaux de notre équipe chez la souris pré-pubère ont permis de démontrer que le rétinol (RoI) à 10^{-6} M favorise la différenciation des cellules germinales souches en spermatozoïdes à partir du tissu testiculaire frais (Arkoun et al., 2015).

En complément, nous avons évalué l'impact des différentes phases de stabilisation de la température (-7°C, -8°C et -9°C) sur la capacité des spermatogonies souches à se différencier en spermatozoïdes à partir du tissu testiculaire pré-pubère décongelé de souris (Arkoun et al., 2015).

De plus, nous avons également essayé d'identifier un protocole de vitrification (V) [vitrification sur surface 1 (VSS1)] qui pourrait permettre de préserver de manière plus efficace l'intégrité et la fonctionnalité du tissu testiculaire après réchauffement (Dumont et al., 2015). Par ailleurs, une analyse des altérations présentes au sein des spermatozoïdes obtenus au cours de la culture *in vitro* de tissus frais et vitrifiés a été effectuée (Dumont et al., en révision).

Enfin, une étude protéomique ciblée à grande échelle axée sur des voies apoptotiques et autophagique a été mise en place. Cette étude a été effectuée avec des tissus frais, congelés et vitrifiés.

Résultats et conclusion

**Les phases de stabilisation de la température évaluées à -7°C et -9°C ont permis un meilleur maintien de l'intégrité structurale de l'épithélium séminifère par comparaison à la température de -8°C à 30 j de culture. Cependant, il apparaît que la température située à -9°C est la plus proche du témoin « tissu frais » en terme de pourcentage de spermatozoïdes allongés obtenus par tube (Arkoun et al., 2015).

**Le RoI augmente de manière significative le pourcentage de spermatozoïdes ronds mais également allongés à 34 jours de culture par comparaison au milieu de base et l'association FSH/LH (Arkoun et al., 2015).

**Le protocole de vitrification VSS₁ donne des résultats similaires (voire meilleurs) que ceux de la congélation lente contrôlée. Après 30 jours de culture, on note la présence de spermatozoïdes ronds et de spermatozoïdes allongés flagellés (Dumont et al., 2015).

**A 30 jours de culture, une meilleure différenciation des spermatogonies souches et un meilleur taux de prolifération cellulaire ont été observés pour les fragments tissulaires vitrifiés de 0,75 mm³ avec un milieu de culture supplémenté en RoI. De plus, une diminution des altérations nucléaires des spermatozoïdes ronds et des dommages à l'ADN associées à une production plus importante de spermatozoïdes dont la mobilité induite par la pentoxyfilline est comparable à celle observée chez des spermatozoïdes issus de testicules de souris pubères démontre l'effet majeur exercé par le rétinol dans la progression de la première vague de spermatogénèse (Dumont et al., en révision).

**Les analyses protéomiques par Reverse Phase Protein Microarrays (RPPM) confirment l'effet antagoniste exercée par l'adjonction simultanée de RoI associé à la FSH/LH et l'effet bénéfique de l'association RoI/Vitamine E sur le tissu frais et le tissu vitrifié.



RESEARCH ARTICLE

Retinol Improves *In Vitro* Differentiation of Pre-Pubertal Mouse Spermatogonial Stem Cells into Sperm during the First Wave of Spermatogenesis

ANDROLOGY

ISSN: 2047-2926



ORIGINAL ARTICLE

Correspondence: Ludovic Dumont, Laboratoire d'Andrologie, Gynécologie et Biologie de la Reproduction, Centre de Recherche Public de Santé Reproductive, 1, rue de Semur, 76031 Rouen Cedex, France. Email: ludovic.dumont@univ-rouen.fr

Keywords:

IRIB, FSH, spermatogenesis, testis, vitrification

Assessment of the optimal vitrification protocol for pre-pubertal mice testes leading to successful *in vitro* production of flagellated spermatozoa



Does the soaking temperature during controlled slow freezing of pre-pubertal mice testes influence the course of *in vitro* spermatogenesis?

Détection prénatale non invasive d'aneuploïdies sur plasma maternel par séquençage haut débit ciblé (Jean-Baptiste RIVIERE)

Objectifs : L'objectif de ce projet pilote est la détection prénatale non invasive d'aneuploïdies fœtales (trisomies 13, 18 et 21) par séquençage haut débit ciblé à partir d'ADN plasmatique non cellulaire issu du sang maternel. Notre but est de développer une technologie innovante et peu coûteuse appliquée à la détection prénatale non invasive d'aneuploïdies.

Résultats attendus : Cette étude permettra la mise au point d'une technologie de séquençage haut débit ciblée appliquée à la détection prénatale non invasive de trisomies 13, 18 et 21. Le principal résultat attendu est la mise en évidence des 72 aneuploïdies fœtales à l'étude par le séquençage massif en parallèle d'ADN plasmatique issu du sang maternel. Cette méthode permettra également d'estimer la proportion d'ADN fœtal non cellulaire circulant dans le plasma maternel par le génotypage des polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) localisés dans les régions ciblées.

Méthodologie : Nous proposons d'analyser de manière rétrospective l'ADN plasmatique non cellulaire issu de 96 grossesses à risque élevé d'aneuploïdie fœtale, incluant 24 fœtus euploïdes, 48 trisomies 21, 18 trisomies 18 et 6 trisomies 13 dont la ploïdie aura été préalablement identifiée par diagnostic cytogénétique. La capture des régions ciblées sera basée sur 900 sondes moléculaires inversées (300 pour chacun des chromosomes 13, 18 et 21). Chacune de ces sondes permettra de capturer et d'amplifier des fragments de 60 paires de bases contenant un SNP dont l'allèle mineur présente une fréquence élevée. Plus d'un million de séquences de qualité seront générées par échantillon (375 000 par chromosome) à l'aide d'un MiSeq (Illumina). La présence d'une aneuploïdie sera évaluée grâce à un dosage chromosomique relatif des chromosomes d'intérêt basé sur la profondeur de séquençage. L'estimation de la proportion d'ADN fœtal non cellulaire dans le plasma maternel s'appuiera sur la quantification allélique des SNPs informatifs séquencés lors de la même expérience. Les équipes impliquées possèdent toutes les connaissances requises pour mener ce projet.

Originalité et impact : Nous proposons une méthode de séquençage ciblé basée sur des technologies de pointe et appliquée à un domaine à fort potentiel clinique. Les applications potentielles de cette technique innovante et peu coûteuse en diagnostic prénatal non invasif sont multiples, allant de la détection d'aneuploïdies au génotypage de mutations ponctuelles. Cette étude pourra servir de projet pilote pour le développement d'outils en diagnostic prénatal, et pourra mener à une large étude de validation multicentrique. Les progrès rapides dans le domaine du diagnostic prénatal non invasif indiquent que son utilisation fera à terme partie intégrante de la routine de plusieurs centres de diagnostic prénataux. Il est donc impératif de développer un savoir-faire et des outils innovants autant au niveau national que local, pour une meilleure prise en charge des patientes et de leur famille.

Nature et fréquence des étiologies associées aux pieds bots varus équin d'apparence isolée diagnostiqués en période prénatale (Sandra WHALEN)

Introduction

Les pieds bots varus équin (PBVE) sont une malformation congénitale fréquente. La prévalence est estimée à 1 à 3 pour mille. Le diagnostic est fait le plus souvent en anténatal. Les causes connues de PBVE sont hétérogènes et de sévérité variable : causes génétiques (neuromusculaires et neurologiques, chromosomiques, anomalies de tissu conjonctif ou maladies osseuses, formes isolées monogéniques, syndromes ou associations malformatives), causes acquises ou environnementales, et probables causes multifactorielles. Malgré plusieurs études de cohortes, rétrospectives dans la plupart des cas, il n'existe pas de données claires concernant la nature et fréquence exacte des étiologies associées aux PBVE, particulièrement dans les PBVE en apparence isolés en anténatal. De ce fait, l'information donnée aux parents en prénatal lors de la détection de PBVE chez leur enfant à naître est difficile, et les explorations proposées sont hétérogènes selon les différents CPDPN et l'expérience des équipes.

Objectifs

Les objectifs principaux de cette étude sont de i) évaluer la nature et la fréquence des pathologies associées aux PBVE en apparence isolés en prénatal, ii) proposer une conduite à tenir homogène et adaptée et donner une meilleure information aux parents en prénatal. L'objectif secondaire est d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les PBVE isolés.

A cet effet, nous proposons de réaliser une étude prospective concernant des fœtus chez qui un diagnostic prénatal de PBVE en apparence isolés est porté.

Méthodologie

Cette étude sera prospective, multicentrique et observationnelle, avec un suivi longitudinal d'enfants nés chez qui des PBVE en apparence isolés sont diagnostiqués en anténatal. Les explorations étiologiques en prénatal comprendront un bilan systématique (recherche de certaines maladies neuromusculaires) et un bilan complémentaire pourra être discuté en fonction des habitudes de chaque équipe médicale et du souhait des couples (caryotype fœtal, IRM cérébrale et médullaire). Le suivi postnatal sera effectué jusqu'à l'âge de 2 ans ½, et sera multidisciplinaire (orthopédistes, neuropédiatres, généticiens). Si les PBVE se révèlent finalement être complexes au cours du suivi ultérieur de la grossesse et qu'une interruption médicale de la grossesse est réalisée, les données foetopathologiques seront recueillies.

Résultats attendus

Avec cette étude, nous espérons confirmer que la plupart des PBVE isolés au moment du diagnostic prénatal ont une bonne évolution. Les patients seront divisés en plusieurs sous-groupes : formes isolées sporadiques ou familiales, pathologies neuromusculaires ou neurologiques, anomalies chromosomiques, syndromes ou associations malformatives (associées ou non à un retard de développement). Dans chaque groupe, nous allons évaluer précisément les étiologies, lorsqu'elles sont connues, et leurs fréquences respectives. Nous réaliserons des investigations supplémentaires afin d'identifier de nouveaux gènes lorsque cela est possible (puce SNP, exome) en particulier dans les formes familiales.

Explorations moléculaires des anomalies du corps calleux par séquençage haut débit (Tania ATTIE-BITACH)

Objectifs : Le corps calleux (CC) est la principale commissure cérébrale connectant les aires corticales homologues des deux hémisphères. La prévalence de l'agénésie du corps calleux (ACC) est de 1/4,000 naissances, alors qu'elle est présente chez 3-5% des individus avec anomalie neuro-développementale. Les malformations du corps calleux (MCC) sont très hétérogènes avec plus de 300 entités répertoriées. De plus, le devenir neuro-développemental des enfants porteurs de ces anomalies reste incertain et rend difficile un conseil prénatal précis. Nous souhaitons entreprendre une étude **multidisciplinaire, à la fois foetopathologique, clinique, cytogénétique et génétique pour améliorer le diagnostic des MCC.**

Méthodologie : L'**exploration globale du génome par la CGH**, et le **séquençage haut débit** sont des outils puissants qui permettent désormais d'envisager un projet ambitieux et innovant qui pourrait permettre une meilleure compréhension des causes génétiques des MCC. Il est indispensable dans un tel projet s'attaquant à une malformation aussi fréquente, de colliger les données clinico-radio-histologiques précises indispensables à l'interprétation des données massives générées par les techniques nouvelles et d'établir des corrélations génotype/phénotype. Ainsi, notre projet s'adresse à deux cohortes extrêmement bien phénotypées, avec une CGH array normale et sans diagnostic qui donneront des informations complémentaires: des **foetus issus d'IMG ayant eu un examen foetopathologique et neuropathologique**, et une cohorte postnatale d'enfants et d'adultes avec **MCC et retard mental** suivis dans le cadre d'un PHRC. Afin de minimiser le nombre de données difficilement interprétables, nous avons choisi deux approches :

1/ le séquençage cible de **gènes connus** responsables d'anomalies du corps calleux chez l'homme (formes syndromiques, maladies métaboliques) ou chez la souris, et dont la mise en place pourrait être **transférée au diagnostic** pré et postnatal à moyen terme, après validation et optimisation.

2/ Une approche plus fondamentale sur **l'implication du cil primaire** dans les MCC dans la continuité de nos travaux récents ayant sur le syndrome acro-calleux et l'identification du gène *KIF7*.

Résultats attendus : Ainsi, par une approche **globale et multidisciplinaire et à l'aide des** techniques de séquençage haut débit nous espérons accélérer le démantèlement des causes génétiques des ACC. Ces résultats devraient permettre d'ouvrir la voie à des corrélations cliniques pour une meilleure information prénatale et conseil **génétique ciblé**. Cet aspect constitue probablement l'enjeu de la prochaine décennie pour améliorer le diagnostic et l'information prénatale des couples dont le foetus présente une MCC.

Publications :

1. Alby C, Boutaud L, Bessières B, Serre V, Rio M, Cormier-Daire V, et al. Novel de novo ZBTB20 mutations in three cases with Primrose syndrome and constant corpus callosum anomalies. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 1 mai 2018;176(5):1091-8.
2. Alby C, Malan V, Boutaud L, Marangoni MA, Bessières B, Bonniere M, et al. Clinical, genetic and neuropathological findings in a series of 138 fetuses with a corpus callosum malformation. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol*. janv 2016;106(1):36-46.
3. Heide S, Keren B, Billette de Villemeur T, Chantot-Bastaraud S, Depienne C, Nava C, et al. Copy Number Variations Found in Patients with a Corpus Callosum Abnormality and Intellectual Disability. *The Journal of Pediatrics*. 1 juin 2017;185:160-166.e1.
4. Mignot C, Moutard M-L, Rastetter A, Boutaud L, Heide S, Billette T, et al. ARID1B mutations are the major genetic cause of corpus callosum anomalies in patients with intellectual disability. *Brain*. 1 nov 2016;139(11):e64-e64.

Amélioration des procédures de diagnostic prénatal des maladies génétiques résultant de mutations de l'ADN mitochondrial (Julie STEFFANN)

Les maladies génétiques liées à des mutations de l'ADN mitochondrial (ADNmt) sont des affections graves, à hérédité maternelle, et sans traitement efficace. La grande hétérogénéité clinique de ces maladies tient à la coexistence de molécules d'ADNmt normales et mutées en proportion variable dans les différents tissus, cellules, mitochondries d'un individu (hétéroplasmie), avec un « effet seuil » dont le niveau dépend du tissu considéré.

Les couples à risque de transmettre de telles affections sollicitent fréquemment une procédure de diagnostic préimplantatoire (DPI) ou de diagnostic prénatal (DPN) afin de revenir la récurrence d'une telle affection dans leur descendance. La fiabilité de ces procédures demeure actuellement incertaine, dans la mesure où l'impact de mutations de l'ADNmt sur le développement in utero est mal connu. En raison de la complexité de la génétique mitochondriale durant le développement embryo-foetal, seules quelques équipes, dont nous faisons partie, sont impliquées dans cette activité de recherche au plan international.

L'objectif de ce travail est d'améliorer les procédures actuelles du DPN des maladies mitochondriales. Nous tenterons de répondre aux questions suivantes :

1/ Le placenta, tel qu'il est analysé dans le contexte du DPN des mitochondriopathies (prélèvement d'un fragment unique de trophoblaste à 12 SA) est-il un reflet fiable du taux de mutation du fœtus ?

Nous comparerons les taux de mutation de l'ADNmt à partir de prélèvements multiples de placentas entiers porteurs de diverses mutations de l'ADNmt afin de détecter une éventuelle variabilité intra-placentaire de ces taux. Cette étude sera menée sur des placentas recueillis, soit entre 12 et 20 semaines d'aménorrhée (SA) dans le cadre d'une interruption médicale de grossesse (IMG, taux élevé de mutation), soit à terme chez des enfants nés après DPN favorable (taux faible de mutation). En parallèle, nous mesurerons les taux de mutations sur des tissus somatiques de fœtus dont le placenta a été analysé, à savoir amniocytes et divers tissus collectés à partir des produits d'IMG, ou cellules de sang de cordon chez les nouveau-nés. Nous comparerons les valeurs obtenues sur les placentas et les tissus fœtaux.

2/ Y'a-t-il un impact du taux de mutation de l'ADNmt sur la quantité totale d'ADNmt (nombre de copies d'ADNmt) durant le développement fœtal humain ? Nous avons récemment montré chez des embryons préimplantatoires porteurs de mutations de l'ADNmt l'existence occasionnelle d'une augmentation du nombre de copies d'ADNmt, fonction du taux d'hétéroplasmie et de la nature de la mutation. Il s'agit vraisemblablement d'un phénomène compensatoire, en réaction à la dysfonction mitochondriale induite par certaines mutations.

Nous réaliserons des tests de PCR quantitative permettant de quantifier simultanément le taux d'hétéroplasmie et la quantité totale d'ADNmt pour une mutation donnée, sur les échantillons placentaires et fœtaux évoqués précédemment, afin de déterminer s'il existe une corrélation entre ces 2 paramètres. Le nombre de copies d'ADNmt sera comparé à celui présent dans les tissus correspondants de fœtus témoins.

La quantité d'ADNmt mesurée dans le cadre d'un DPN pourrait constituer, en association avec le taux d'hétéroplasmie, un critère prédictif supplémentaire de la survenue et de la gravité d'une maladie mitochondriale en période postnatale. **Ces données sont donc susceptibles d'avoir un impact important sur les procédures de DPN des mitochondriopathies.**

Rôles de la PI3-kinase beta dans la qualité ovocytaire et la viabilité des embryons pré-implantatoires (Guillaume HALET)

Les phosphoinositide 3-kinases de classe I (PI3K) sont une famille de lipide kinases qui synthétisent le second messager lipidique PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate) dans la membrane plasmique des cellules, après stimulation par des facteurs de croissance, cytokines, ou hormones. En activant de nombreux effecteurs, dont la kinase majeure Akt, le PIP3 favorise la prolifération et la survie cellulaire, et régule l'expression des gènes et le métabolisme. Dans les cellules somatiques, la synthèse de PIP3 est un phénomène transitoire, contrebalancé par la désensibilisation des récepteurs membranaires, et l'action de la PIP3-phosphatase PTEN.

Dans nos travaux antérieurs, nous avons montré que, contrairement au schéma classique décrit dans les cellules somatiques, les ovocytes et embryons préimplantatoires de souris présentent une activation constitutive de la PI3K, sans ajout de facteurs de croissance. Cette synthèse constitutive de PIP3, qui rappelle la situation rencontrée dans les cellules cancéreuses, est soutenue pendant toute la durée du développement préimplantatoire, et est nécessaire au développement et à la survie des embryons jusqu'au stade blastocyste.

Nous proposons donc que l'activité PI3K, d'origine maternelle et/ou embryonnaire, joue un rôle majeur dans la viabilité des ovocytes et embryons pré-implantatoires, et que son dysfonctionnement puisse être une cause d'infertilité due à la mauvaise « qualité » des ovocytes et embryons.

Différentes isoformes de PI3K existent, avec différents modes d'activation. Il est également suggéré que certaines fonctions cellulaires sont régulées par les PI3K de façon isoforme-spécifique. Une étude précédente a montré que l'invalidation de l'isoforme PI3Kbeta (souris KO) conduisait à une létalité préimplantatoire chez la souris. Cependant, la stratégie KO induit des modifications compensatrices des autres isoformes de PI3K. Le rôle exact de PI3Kbeta et son mécanisme d'activation dans les embryons précoces, sont des questions qui restent non-résolues. Ce projet de recherche vise

1°) à définir l'importance de PI3Kbeta embryonnaire dans le développement pré-implantatoire à l'aide d'une nouvelle stratégie d'invalidation permettant d'éviter les phénomènes de compensation (souris KI), et

2°) à procéder à l'invalidation de PI3Kbeta spécifiquement dans les ovocytes (souris « floxées ») afin d'étudier la contribution de PI3Kbeta d'origine maternelle. Nous examinerons si ces souris présentent des problèmes de fertilité, et nous rechercherons les anomalies ovocytaires et/ou embryonnaires responsables de ce déficit.

Etude pilote de mise en place du diagnostic des myopathies et dystrophies musculaires par séquençage haut débit (Mireille COSSEE)

Les myopathies et dystrophies musculaires constituent un ensemble de pathologies phénotypiquement et génétiquement hétérogènes. Plus de 70 gènes sont actuellement identifiés. Le diagnostic étiologique, orienté par des critères cliniques et paracliniques, repose sur la mise en évidence de l'anomalie protéique et la caractérisation de la (les) mutation(s) affectant le gène correspondant. Le diagnostic génétique repose sur une recherche de mutation gène par gène, elle peut être longue voire infructueuse, certains gènes n'étant pas analysés en raison de leur grande taille et de la lourdeur du séquençage classique. Dans environ 50% des cas, l'anomalie moléculaire n'est pas identifiée, rendant impossible un conseil génétique fiable dans la famille. L'avènement du séquençage nouvelle génération (Next Generation Sequencing-NGS) va révolutionner les pratiques diagnostiques pour les pathologies génétiquement hétérogènes puisque il va permettre d'analyser en un seul temps un grand nombre de gènes et de réaliser une recherche exhaustive de mutations. L'amélioration du diagnostic sera bénéfique pour le patient, en donnant un nom à sa maladie et en lui permettant l'accès à d'éventuels traitements spécifiques, ainsi qu'à sa famille qui pourra bénéficier d'un conseil génétique fiable et accéder si elle le souhaite à un diagnostic prénatal voire un diagnostic préimplantatoire. Toutefois, les études publiées concernent principalement des projets de recherche, et très peu l'application au diagnostic. Le séquençage du génome complet n'étant pas encore accessible en routine, les stratégies actuelles font appel à une sélection préalable de séquences exoniques, soit exome total (l'ensemble des exons du génome) soit capture ciblée de certains gènes. Nous proposons dans ce projet de réaliser dans un premier temps une étude comparative de fiabilité de différentes technologies sur quatre échantillons d'ADN contrôles (porteurs de mutations et de polymorphismes connus dans le gène *DMD*). Nous comparerons ensuite deux stratégies de capture (exome total *versus* exome ciblé des gènes connus et candidats de myopathies et dystrophies musculaires) par l'analyse de 10 patients décédés en période néonatale d'une pathologie neuromusculaire d'étiologie non déterminée. Une difficulté majeure du NGS réside dans l'interprétation du caractère pathogène des variants identifiés (environ 15 000 SNV-Single Nucleotide Variants- par exome, dont 1500 ne sont pas répertoriés dans les bases de données). Nous testerons différents logiciels d'analyse et stratégies de filtrage des données, afin d'identifier la stratégie la plus efficace pour la détermination de l'anomalie moléculaire en cause chez ces patients. Le but du projet est d'apporter un diagnostic étiologique à ces familles et de leur permettre l'accès à un conseil génétique fiable. Il constituera également une « preuve de principe » pour la mise en place du diagnostic par NGS des pathologies neuromusculaires congénitales dans notre laboratoire.

Impact du dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs sériques maternels du 1er trimestre sur le diagnostic prénatal du spina bifida (Françoise MULLER)

Objectifs. Le diagnostic prénatal du spina bifida repose en France sur deux méthodes complémentaires, le dosage de l'alpha-foetoprotéine (AFP) sérique maternelle réalisé lors du dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs sériques maternels au 2ème trimestre de la grossesse (entre 15 et 18 SA) et l'échographie morphologique fœtale (entre 20 et 25 SA).

L'objectif principal de notre étude est d'évaluer à l'échelon national l'impact sur le dépistage anténatal du spina bifida, de la nouvelle politique de dépistage de la trisomie 21 mise en place en 2010. Cette stratégie repose sur le dosage au 1^{er} trimestre de la grossesse de deux marqueurs sériques maternels PAPP-A et hCG β combinés à la mesure de la clarté nucale et donc n'incluant plus l'AFP.

Méthodologie. Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur des données nationales et sur une période de trois ans, l'année 2009 pendant laquelle l'AFP sérique maternelle était utilisée à la fois pour le dépistage de la trisomie 21 et pour le dépistage du spina bifida et les années 2010 et 2011 pendant lesquelles la stratégie du 1^{er} trimestre a été progressivement mise en place donc avec perte progressive de l'utilisation de l'AFP.

Plusieurs phases successives d'enquête vont être mises en œuvre :

La **première étape** consiste à **répertorier le nombre de cas** d'enfants atteints de spina bifida dépistés en France au cours des trois années, 2009, 2010 et 2011. L'année 2009 servira de référence. La **deuxième étape** consistera à **étudier chaque dossier en détail** sur le plan biochimique (résultats du dosage de l'AFP), échographique et clinique.

Résultats attendus. Nous étudierons à la fois l'impact de la perte de l'AFP sur le nombre de cas dépistés mais également sur l'âge gestationnel au moment du diagnostic de la malformation, sur la décision maternelle concernant la poursuite ou non de la grossesse et sur pronostic postnatal des enfants nés.

Cette analyse permettra de réévaluer la politique du dépistage prénatal du spina bifida et, en cas de diminution significative du nombre de cas dépistés en prénatal, de proposer différentes stratégies biochimique et /ou échographiques.