

**Projets de recherche financés dans le cadre de l'appel d'offres 2014  
« AMP, diagnostic préimplantatoire et diagnostic génétique »  
Résumés résultats et publications**

Chercheur	Sujet de recherche	Subvention allouée
<b>BANREZES Bernadette</b>	<a href="#">Mesure de l'impact métabolique des milieux de culture utilisés pour la fécondation in vitro</a>	<b>39 803 €</b>
<b>BIETH Eric</b>	<a href="#">Recherche de nouveaux déterminants génétiques de l'infertilité masculine par absence bilatérale congénitale des canaux déférents</a>	<b>25 000 €</b>
<b>CALLIER Patrick</b>	<a href="#">Diagnostic des réarrangements chromosomiques et des mutations par séquençage haut-débit</a>	<b>15 000 €</b>
<b>COSTA Jean-Marc</b>	<a href="#">Evaluation de la performance du dépistage prénatal non invasif des trisomies 13, 18 et 21 au cours des grossesses obtenues après assistance médicale à la procréation</a>	<b>25 000 €</b>
<b>DELALANDE Christelle</b>	<a href="#">Estrogènes, xénoestrogènes et qualité des spermatozoïdes humains</a>	<b>20 000 €</b>
<b>DELLUC Aurélien</b>	<a href="#">AMPERT : Assistance Médicale à la Procréation et Risque Thrombotique</a>	<b>20 340 €</b>
<b>DRUNAT Séverine</b>	<a href="#">Diagnostic prénatal non invasif de la drépanocytose par séquençage nouvelle génération (NGS)</a>	<b>39 857 €</b>
<b>FOUCHET Pierre</b>	<a href="#">Etude des mécanismes régulant in vitro la balance entre unipotente et pluripotente des cellules souches germinales mâles</a>	<b>25 000 €</b>
<b>HENNEBICQ Sylviane</b>	<a href="#">Vers une AMP plus physiologique par l'utilisation des phospholipases A2 acrosomiales</a>	<b>20 000 €</b>
<b>HOFFMANN Pascale</b>	<a href="#">Apport du dosage de la prokinéticine 1 (PROK1) dans le liquide folliculaire et les cellules folliculaires en fécondation in vitro</a>	<b>30 000 €</b>
<b>MANDEL Jean-Louis</b>	<a href="#">Evaluation d'une stratégie de diagnostic génétique des troubles du spectre autistiques avec ou sans déficience intellectuelle</a>	<b>20 000 €</b>
<b>MELKI Judith</b>	<a href="#">Approches pangénomiques et séquençage de l'exome entier dans les maladies orphelines neuropédiatriques dans l'errance diagnostique</a>	<b>30 000 €</b>
<b>MORCEL Karine</b>	<a href="#">Etude protéomique de l'endomètre chez les receveuses sous traitement hormonal substitutif dans le cadre du don d'ovocytes</a>	<b>15 000 €</b>
<b>MULLER Jean</b>	<a href="#">Validation du diagnostic moléculaire par séquençage haut débit ciblé des rétinopathies pigmentaires</a>	<b>20 000 €</b>
<b>ROORYCK THAMBO Caroline</b>	<a href="#">Dépistage prénatal non invasif d'aneuploïdies fœtales dans le plasma maternel par séquençage haut débit par la technologie des semi-conducteurs</a>	<b>15 000 €</b>
<b>VIVILLE Stéphane</b>	<a href="#">Génétique de l'infertilité masculine : gènes impliqués dans l'azoospermie non obstructive</a>	<b>20 000 €</b>
<b>ZORDAN Cécile</b>	<a href="#">Evaluation de la lettre d'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques</a>	<b>20 000 €</b>

**Thèmes de recherche :**

1. Sciences humaines, juridiques, économiques et sociales : études dans le domaine de la santé publique / épidémiologie et de l'éthique, notamment dans les domaines du don de gamètes et des nouvelles techniques d'analyse du génome
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

## Mesure de l'impact métabolique des milieux de culture utilisés pour la fécondation in vitro (Bernadette BANZERES)

La fécondation chez les mammifères est un processus très sensible aux perturbations du métabolisme. De faibles variations de la composition en substrats du milieu de culture au cours des premiers stades de la fécondation *in vitro* peuvent modifier l'activité métabolique des embryons et orienter le développement embryonnaire. Les approches pour **mesurer ces différences d'activité et identifier les paramètres** régulateurs provenant des milieux de culture sont confrontées à plusieurs difficultés. Nous ne connaissons pas l'ampleur des variations d'activité métabolique provoquées par les milieux de culture dont les formules, mises au point pour l'AMP, demeurent secrètes. Il n'existe aucune méthode permettant de relier l'activité fonctionnelle des oeufs à leur potentiel de développement. Il est connu que les effets à long terme sont très variables et pourraient avoir des conséquences sur la santé à l'âge adulte.

### Objectif

Pour évaluer l'effet des milieux de culture destinés à l'AMP sur le développement, nous proposons de conjuguer l'analyse des signaux calciques et des coenzymes NAD et FAD avec les profils d'expression des microARN et autres ARN non codants durant les premiers instants de la fécondation. Le couplage entre les premiers signaux calciques et le début de la régulation épigénétique du développement devrait permettre d'établir des corrélations fonctionnelles entre le **régime** des signaux  $Ca^{2+}$ , l'**activité mitochondriale** (phosphorylation oxydative, expression des microARN) et le **développement** à terme. Ce projet vise à compléter l'unique contrôle qualité des milieux destinés à l'AMP dénommé MEA (Mouse Embryo Assay) qui consiste à vérifier qu'au moins 80% des embryons de souris cultivés durant 72-96 h dans ces milieux atteignent le stade blastocyste.

### Méthodologie

L'aspect novateur du projet repose sur la mise en relation, chez la souris, de la **variabilité de la signalisation calcique** spontanée de la fécondation avec les différences d'expression des microARN présents dans la mitochondrie. Ce couplage fonctionnel  **$Ca^{2+}$ - Mitochondrie** pourrait contribuer à la régulation épigénétique du développement dès les premiers instants de la fécondation. Nous utilisons les oscillations  $Ca^{2+}$  à la fois comme un **marqueur** de l'activité métabolique et comme **signal** déterminant l'activité mitochondriale et le potentiel de développement des oeufs.

A l'aide d'un programme de calcul que nous avons développé, nous pouvons décomposer chaque signal  $Ca^{2+}$  en deux phases principales, la phase de libération et la phase de recapture du  $Ca^{2+}$ . L'analyse de variance de ces phases permet de quantifier les différences d'activité calcique liées à la formule des milieux. **Résultats attendus**

Nous utiliserons deux milieux de référence chez la souris, M16 et KSOM, comme milieux étalons pour évaluer deux milieux commerciaux destinés à l'AMP: **Cook** et **Vitrolife**. Les résultats préliminaires montrent que la dynamique des signaux calciques peut être utilisée pour discriminer l'impact sur le métabolisme énergétique des milieux de culture. Nous nous attendons à obtenir des profils des microARN différents en fonction des milieux de culture du fait d'une stimulation mitochondriale calcique différente. Ce travail permettra de répondre à la question des effets à long terme liés à l'utilisation de milieux de culture et proposera une méthode de mesure quantitative de l'impact sur le fonctionnement génomique mitochondrial et le métabolisme énergétique pour la conception et l'amélioration des milieux de culture.

## Recherche de nouveaux déterminants génétiques de l'infertilité masculine par absence bilatérale congénitale des canaux déférents (Eric BIETH)

**Objectif :** Identifier de nouveaux gènes impliqués dans l'absence bilatérale congénitale des canaux déférents (ABCD) non liée au gène CFTR grâce à une analyse comparative des séquences d'exome de patients atteints.

**Matériel et méthodes :** 20 sujets issus d'une importante cohorte déjà constituée de patients infertiles suivis dans les CHU de Toulouse et de Lille, seront soigneusement sélectionnés sur la base d'une part de critères phénotypiques définissant strictement l'absence bilatérale de canaux déférents (azoospermie, critères cliniques, spermio-logiques, hormonologiques, échographiques, chirurgicaux,..) et d'autre part sur la base d'une étude exhaustive du gène CFTR montrant l'absence de mutation causale. L'inclusion des patients dans cette étude est donc faite de manière retrospective sur la base d'explorations déjà réalisées et qui seront éventuellement complétées. La présence ou non d'une agénésie rénale sera le seul critère permettant de définir deux sous-groupes. La stratégie d'analyse comparative d'exomes individuels sur une cohorte de patients non apparentés phénotypiquement homogènes a été retenue du fait de l'inaccessibilité des données familiales permettant des analyses de liaison (absence de grande famille analysable) ou des études par trio. Les résultats finaux (après application des filtres) du séquençage des exomes par la technologie NGS seront comparés soit en prenant en compte soit l'ensemble des patients inclus, soit pour chaque sous-groupes (présence ou absence d'anomalies rénales). Les gènes candidats seront ensuite séquencés par la technique de Sanger afin de confirmer les variations nucléotidiques. Selon les résultats obtenus une validation des gènes candidats par séquençage Sanger pourra être envisagée grâce à une nouvelle cohorte plus importante de patients sélectionnés atteints d'une ABCD.

**Résultats attendus :** de nombreuses évidences cumulées depuis près de 20 ans dans la littérature scientifique montrent que les mutations du gène CFTR ne sont pas les seuls déterminants génétiques de l'ABCD et que pour 15 à 20% des patients concernés l'ABCD reste inexplicée. Le fait que cette anomalie de développement de structures dérivant du canal de Wolff soit parfois associée à des troubles de développement de l'appareil urinaire telle que l'agénésie rénale suggère qu'au moins un autre gène est directement impliqué dans la survenue de certaines ABCD. L'identification de mutations causales d'ABCD non liées au gène CFTR pourra ainsi déboucher sur de nouvelles pistes étiopathogéniques et donc à une meilleure compréhension de ces anomalies du développement de l'appareil urogénital masculin qui sont une cause fréquente d'infertilité. La possibilité de disposer d'un diagnostic génétique des ABCD non liées au gène CFTR permettrait une meilleure prise en charge de ces patients infertiles notamment grâce à un conseil génétique adapté

### Publication :

1. Patat O, Pagin A, Siegfried A, Mitchell V, Chassaing N, Faguer S, et al. Truncating Mutations in the Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2 Gene ADGRG2 Cause an X-Linked Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens. The American Journal of Human Genetics. août 2016;99(2):437-42.

## Diagnostic des réarrangements chromosomiques et des mutations par séquençage haut-débit (Patrick CALLIER)

Dans le génome humain, les micro-remaniements chromosomiques se présentent, entre autre, sous forme de moyennes ou grandes délétions et/ou duplications, appelées CNV (copy-number variant). L'ensemble de ces variations contribue en partie aux différences phénotypiques normales de la population générale mais peut être aussi à l'origine de maladies génétiques. Jusqu'à présent, ces CNV sont mis en évidence par les techniques de CGH-array et/ou de SNP-array. Avec l'apparition de nouvelles technologies comme le séquençage haut-débit (Next Generation Sequencing ou NGS), qui a permis l'identification de nouveaux gènes impliqués dans des maladies monogéniques, de nouveaux champs d'application sont apparus. Cette technologie permet depuis peu, à l'aide de nouveaux algorithmes, la détection de CNV pour l'instant uniquement testés sur des plateformes de séquençage haut-débit de type HiSeq. Cette technique demande à être optimisée et standardisée sur un appareil NGS de type MiSeq, maintenant mis à disposition dans tous les laboratoires de génétique moléculaire de France grâce au plan maladies rares 2, les plateformes de séquençage haut débit de type HiSeq restant rares.

L'objectif de ce travail est

- 1) De démontrer la possibilité d'identifier des réarrangements chromosomiques ou CNV exoniques détectés par la CGH-array, en utilisant la technique de séquençage d'exome avec algorithmes spécifiques sur MiSeq, à partir d'un échantillon de patients porteurs de CNVs connus non pathogènes
- 2) De démontrer la supériorité de cette technologie en identifiant des remaniements exoniques de petite taille non détectés par CGH-array, mais aussi dans le même temps de mettre en évidence des mutations ponctuelles exoniques

Pour cela, nous proposons de réaliser un séquençage d'exome sur Miseq à partir de 23 patients porteurs d'une déficience intellectuelle syndromique. En faisant l'hypothèse que cette technique permettra dans au moins 95% des cas avec une précision de  $\pm 15\%$  de mettre en évidence la présence d'un ou plusieurs CNVs, 23 patients seront nécessaires à cette étude. Les données générées seront analysées à l'aide de logiciel permettant la détection couplée des CNV et des SNV.

En parallèle les données d'exomes de 23 patients pour lesquelles une analyse d'exome à déjà été réalisé sur Hiseq par notre équipe de recherche seront analysées.

Ces patients auront bénéficié au préalable d'une CGH-array sur la plateforme de CGH-array de DIJON (180K Agilent avec une résolution de 22kb), qui aura été interprétée comme normale car sans variant pathogène pouvant expliquer le phénotype du patient, mais pour laquelle des variants polymorphes auront été détectés (environ une quinzaine de CNV >20kb connus dans la DGV), permettant de s'assurer que les nouveaux algorithmes ne passent pas à côté de variants connus. Les données de Séquençage haut-débit seront analysées dans le département de Génétique de Dijon qui possède déjà une expertise dans ce domaine et maîtrise cette nouvelle technologie. L'acquisition d'un MiSeq a été possible grâce au PNMR2. L'analyse bio-informatique sera réalisée avec l'algorithme CoNIFER permettant une quantification du nombre de copies et une détection des CNVs rares <20 Kb (Krumm et al., 2012), et une recherche de mutations ponctuelles sera réalisée en parallèle avec l'algorithme GATK, à partir de la plateforme de bio-informatique du CHU de Dijon et de l'université de Bourgogne mise en place en 2012.

En conclusion, cette étude préliminaire, grâce à une analyse bio-informatique adaptée, permettra en une seule phase la détection de mutations et de réarrangements chromosomiques (ou CNV) chez des patients présentant une déficience intellectuelle syndromique. Cette technique permettra d'optimiser et standardiser cette méthode pour l'étude des CNVs sur un appareil NGS mis à disposition dans tous les laboratoires de génétique moléculaire de France grâce au PNMR2, dans l'intérêt de tous les laboratoires de génétique humaine de France.

### Publication :

Quartier A, Poquet H, Gilbert-Dussardier B, Rossi M, Casteleyn A-S, Portes V des, et al. Intragenic FMR1 disease-causing variants: a significant mutational mechanism leading to Fragile-X syndrome. European Journal of Human Genetics. avr 2017;25(4):423-31.

## Evaluation de la performance du dépistage prénatal non invasif des trisomies 13, 18 et 21 au cours des grossesses obtenues après assistance médicale à la procréation (Jean-Marc COSTA)

### Objectif :

L'objectif primaire de l'étude est donc de déterminer les performances d'un dépistage de la trisomie 21 fœtale par analyse de l'ADN circulant par séquençage massif en parallèle, comparativement à la procédure habituelle de dépistage, dépistage combiné au premier trimestre ou dépistage échographique selon les cas de figure (grossesse singleton ou multiple) afin d'évaluer le mode de dépistage le plus efficace dans cette population et de définir la place éventuelle de cette approche innovante dans le dépistage de la trisomie 21.

### Résultats attendus :

On devrait noter avec le test génétique non invasif de la trisomie 21 fœtale en comparaison avec une prise en charge habituelle de ces patientes :

- Un nombre accru de patientes pour lequel un dépistage sanguin pourrait être proposée : efficacité du test non invasif chez les patientes avec grossesse gémellaire et taux de non rendu qui n'induirait pas un nombre de gestes invasifs élevé (taux attendu inférieur à 1%)
- Un nombre de patiente classé dans un groupe à risque significativement inférieur à celui généré par le dépistage combiné du premier trimestre

### Méthodologie :

L'étude est conduite de manière prospective ; elle est observationnelle multicentrique afin de refléter et d'intégrer au mieux les contraintes liées à la prise en charge des patientes et aux transferts des échantillons vers un laboratoire spécialisé de « routine diagnostique ». La collection et l'analyse de l'ensemble des résultats des tests (analyse de l'ADN circulant et caryotype fœtal), ainsi que l'ensemble des données démographiques des patientes, seront réalisées par le centre coordinateur clinique de l'étude. L'interprétation des résultats de l'analyse de l'ADN circulant sera réalisée par conséquent en aveugle sans

connaissance a priori du résultat du caryotype fœtal. Tous les échantillons sanguins maternels (2 fois 10ml de sang total) seront collectés au décours de la prise en charge habituelle des patientes et avant tout geste invasif afin de ne pas induire un biais d'augmentation « artéfactuelle » du taux d'ADN fœtal circulant qui pourrait être induit par un geste invasif (amniocentèse ou biopsie de villosités chorales)

Les femmes enceintes seront recrutées au cours des consultations habituelles dans les différents centres, pour la quasi-totalité Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal associés à des Centre Clinico-biologiques de Médecine de la Reproduction, participants à cette étude pour évaluation du risque d'anomalie chromosomique. Celles qui se verront proposer et accepteront un dépistage combiné au 1<sup>er</sup> trimestre suivi ou non d'un diagnostic prénatal invasif soit par amniocentèse, soit par biopsie de villosités chorales en raison d'un risque particulier seront éligibles pour cette étude.

L'ensemble du réseau prend en charge environ 15.000 grossesses et 2300 consultations prénatales annuels ; le potentiel d'inclusion pour les patientes est estimé à 500 au moins pour 3 mois.

## Estrogènes, xénoestrogènes et qualité des spermatozoïdes humains (Christelle DELALANDE)

Les taux de fertilité chez l'homme déclinent partout dans le monde. Aujourd'hui, environ 15% des couples sont confrontés à une infertilité dont la cause est masculine dans la moitié des cas. Très souvent, les causes de l'infertilité chez l'homme ne sont pas connues. Elles peuvent être génétiques et/ou environnementales impliquant des gènes de susceptibilité qu'il est nécessaire d'identifier.

Les estrogènes semblent avoir un rôle dans la fonction de reproduction, comme le montrent les expériences d'inactivation des gènes codant pour les récepteurs aux estrogènes chez la souris et l'étude de quelques cas de mutation du gène de l'aromatase (enzyme responsable de la synthèse des estrogènes à partir des androgènes) chez l'homme. En dehors de leur implication dans la spermatogenèse, ils pourraient aussi avoir un rôle dans la maturation et l'acquisition de la capacité de fécondance des spermatozoïdes. L'objectif de notre projet est d'étudier le rôle des estrogènes ainsi que leurs mécanismes d'action sur certaines caractéristiques des spermatozoïdes : la mobilité, la capacitation et l'intégrité des noyaux. Certains facteurs environnementaux se comportant comme des perturbateurs endocriniens, nous étudierons parallèlement l'impact du bisphénol A (BPA) qui est considéré comme un xénoestrogène, sur ces mêmes caractéristiques. Après avoir recherché les différentes formes de récepteurs aux estrogènes (ESR1, ESR2 and GPER), étudié leur localisation précise sur les spermatozoïdes et leur présence en fonction de la qualité des différents échantillons, nous analyserons les effets des estrogènes sur la mobilité des spermatozoïdes par analyse automatisée de leur mouvement et sur la capacitation induite *in vitro*. Les récepteurs et les voies de signalisation impliqués seront recherchés en utilisant des agonistes/antagonistes spécifiques des différents récepteurs ainsi que des inhibiteurs ou anticorps dirigés contre différentes protéines kinases (PI3K/akt et PKA).

Les résultats obtenus permettront des avancées sur la connaissance des rôles des estrogènes et sur l'impact du BPA dans la qualité des gamètes chez l'homme. Ces données permettraient de prévenir les risques encourus lors du contact des patients avec de telles substances. L'identification des cibles et des mécanismes d'action du BPA permettrait une meilleure prise en compte des effets délétères de ces xénoestrogènes et pourrait apporter des arguments pour restreindre le matériel utilisé en spermologie, diagnostic et en AMP à des contenants dépourvus de BPA.

# Oestrogènes, xenoestrogènes et qualité des spermatozoïdes

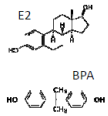
Vanessa Brouard<sup>a,b</sup>, Anne-Charlotte Moïsson<sup>a,b</sup>, Emeline Bovet-Courtois<sup>c</sup>, Ethel Szerman-Poisson<sup>c</sup>, Isabelle Guénon<sup>a,b</sup>, Hélène Bouraima-Lelong<sup>a,b</sup>, **Christelle Delalande<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup>EA2608, Laboratoire Oestrogènes, Reproduction, Cancer; Université de Caen Normandie, CS 14032, Caen; <sup>b</sup>USC INRA, CS 14032, Caen; <sup>c</sup>CECOS, CHU, Caen

## Introduction

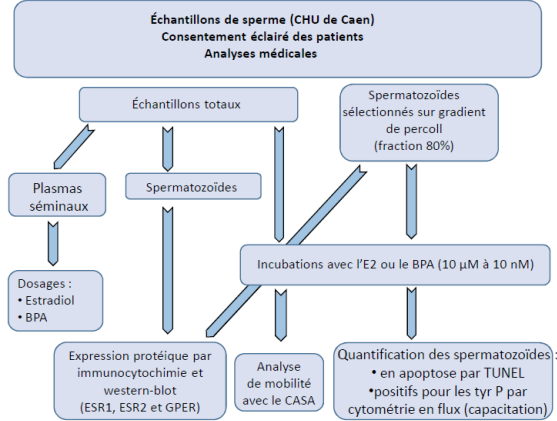
- Les taux de fertilité chez l'homme déclinent partout dans le monde (Skakkebaek et al, 2006). Aujourd'hui, environ 15% des couples sont confrontés à une infertilité dont la cause est masculine dans la moitié des cas (Vialard et al, 2009) mais les causes ne sont pas toujours connues.
- Plusieurs études ont montré une diminution du nombre de spermatozoïdes et une augmentation des troubles de l'appareil reproducteur (cryptorchidie, hypospadias, cancer testiculaire) pouvant être attribués aux effets délétères de facteurs environnementaux appelés perturbateurs endocriniens (Pour revue Cravédi et al, 2007). Parmi eux, sont retrouvés des molécules à activité oestrogénique telles que le bisphénol A (BPA) qui est un produit industriel utilisé comme monomère dans la synthèse de matières plastiques et de résines époxy.
- A l'issue de la spermatogenèse, le spermatozoïde est immobile et c'est au cours du transit épидидymaire puis dans les voies génitales féminines qu'il va subir toutes les maturations nécessaires à l'acquisition de son pouvoir fécondant. Les oestrogènes étant de bons candidats pour réguler ces événements, le BPA pourrait alors affecter la qualité du sperme chez l'homme en interagissant sur les voies de signalisation oestrogénique.

## Objectifs



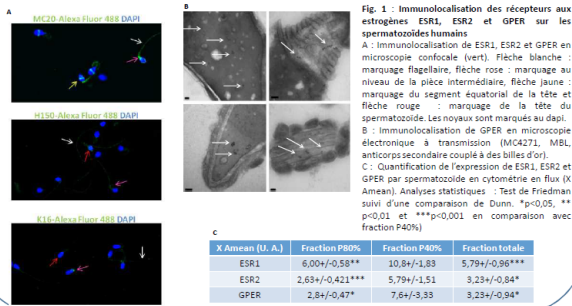
- Etudier le rôle des oestrogènes sur des caractéristiques du spermatozoïde telles que :
- La mobilité
  - La capacitation (un des événements de maturation subis par les spermatozoïdes)
  - L'intégrité du noyau (apoptose)
- Évaluer l'impact de xenoestrogènes tel que le BPA sur ces caractéristiques

## Matériel et Méthodes



## Résultats

### Les spermatozoïdes humains expriment les trois récepteurs aux oestrogènes (ESR1, ESR2 et GPER) et leur expression varie en fonction de la qualité



### L'E2 et non le BPA, a un effet positif sur la mobilité des spermatozoïdes

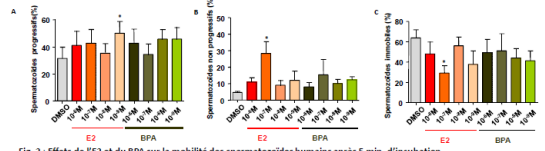


Fig. 2 : Effets de l'E2 et du BPA sur la mobilité des spermatozoïdes humains après 5 min. d'incubation. Pourcentages de spermatozoïdes (N) : progressifs (a-b); (B) : non progressifs (c) et (C) : immobiles (d). Analyses statistiques : ANOVA suivie d'un test de Tukey, n = 3, \*, p < 0,05.

### L'E2 et le BPA ne modifient pas le taux de l'apoptose des spermatozoïdes

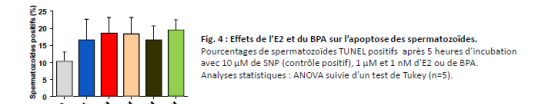


Fig. 4 : Effets de l'E2 et du BPA sur l'apoptose des spermatozoïdes. Pourcentages de spermatozoïdes TUNEL positifs après 5 heures d'incubation avec 10 µM de DMSO (contrôle positif), 1 µM et 1 nM d'E2 ou de BPA. Analyses statistiques : ANOVA suivie d'un test de Tukey (n=5).

### Les effets de l'E2 et du BPA sur la capacitation dépendent de la concentration

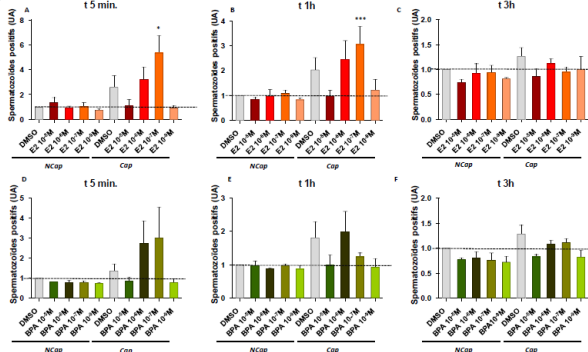


Fig. 3 : Effets de l'E2 et du BPA sur la capacitation des spermatozoïdes. La capacitation a été étudiée par cytométrie en flux des spermatozoïdes positifs pour les tyrosines phosphorylées. A, B, C : représentation des spermatozoïdes positifs en milieu non capacitant (Ncap) ou capacitant (Cap) pour différentes concentrations d'E2 (10 µM, 1 µM, 100 nM, et 1 nM) après 5 min., 1h ou 3h d'incubation. D, E, F : représentation des spermatozoïdes positifs en milieu non capacitant (Ncp) ou capacitant (Cap) pour différentes concentrations de BPA (10 µM, 1 µM, 100 nM, et 1 nM) après 5 min., 1h ou 3h d'incubation. Les valeurs (en unités arbitraires) sont représentées sous forme de moyenne +/- S.E.M par rapport à la condition contrôle (Ncap DMSO = 1). Analyses statistiques : ANOVA suivie d'un test de Tukey (n=5). \* p < 0,05 et \*\*\* p < 0,001 vs Ncap DMSO.

### Du BPA et ses métabolites (BPA-G et BPA-S) sont retrouvés dans les plasmas séminaux humains

Qualité de l'échantillon	BPA (ng/ml)	BPA-G (ng/ml)	BPA-S (ng/ml)
Groupe 1 (n=45)			
Normozoosperme (n=27)	-	-	-
Oligozoosperme (n=13)	-	-	-
Asthénozoosperme (n=1)	-	-	-
Groupe 2 (n=6)			
Oligo-asthénozoosperme (n=4)	-	1,10 à 3,20	-
Normozoosperme (n=2)	-	1,37 à 6,95	-
Oligozoosperme (n=3)	ND	ND	ND
Asthénozoosperme (n=7)	ND	ND	ND
Oligo-asthénozoosperme (n=0)	ND	ND	ND
Groupe 3 (n=40)			
Normozoosperme (n=28)	Q	-	Q (n=1)
Oligozoosperme (n=3)	Q	-	-
Asthénozoosperme (n=7)	Q	-	-
Oligo-asthénozoosperme (n=2)	Q	-	-
Groupe 4 (n=11)			
Normozoosperme (n=5)	1,4 à 35	-	-
Oligozoosperme (n=4)	1,5 à 7,1	-(2), Q(1), 0,3(1)	-
Asthénozoosperme (n=0)	ND	ND	ND
Oligo-asthénozoosperme (n=2)	1,7 à 2	-(1), Q(1)	-

ND : non détecté, - : non déterminé, le nombre d'échantillons est indiqué entre parenthèses, Q : en dessous du seuil de quantification BPA-G : BPA-glucuronide, BPA-S : BPA-sulfate

## Conclusion

- Peu d'effets de l'E2 et du BPA sur les paramètres étudiés : apoptose, mobilité, capacitation
- paramètres peu affectés par les oestrogènes / xenoestrogènes. Effets différents : récepteurs et voies de signalisation du BPA différents de l'E2?
- La concentration en estradiol est plus élevée dans les plasmas séminaux d'échantillons de sperme de patients oligozoospermes, asthénozoospermes et oligo-asthénozoospermes en comparaison aux échantillons normaux et les spermatozoïdes de moins bonne qualité (Percoll 40%) semblent exprimer plus de ESR1 et ESR2.
- Nos travaux décrivent pour la première fois la présence de BPA libre, BPA-G et de BPA-S dans les échantillons de plasmas séminaux sans que l'on puisse le relier à la qualité des échantillons. Origine ? possibilité pour les spermatozoïdes de conjuguer le BPA libre?
- Nos travaux, ne mettant pas en évidence des effets importants du BPA sur les caractéristiques étudiées des spermatozoïdes, ne sont pas en faveur d'une restriction du matériel utilisé en spermologie, diagnostic et en AMP à des contenants dépourvus de BPA.

### Les concentrations en estradiol sont plus élevées dans les plasmas séminaux d'échantillons normaux (asthén, oligo et oligo-asthénozoospermes)

Normozoosperme (n=42) : 553,85+/-43,2 pg/ml  
Asthéno, oligo et oligo-asthénozoosperme (n= 25): 732,88+/-50,65 pg/ml, p=0,01 (Test T non apparié)

## Références

- Cravédi J.P., Zalko D., Savelot J.S., Meunet A., Hégo R., 2007. *Med. Sci. (Paris)*, 23(2):198-204.  
Skakkebaek N.E., Jørgensen N., Main K.M., Rajpert-De Meyts E., Lefertz H., Andersson A.M., Juul A., Carlsen E., Mortensen G.K., Jensen T.K., Toppari J., 2006. *Is human fecundity declining?* *Int. J. Androl.* 29(1):2-11.  
Vialard F., Mandon-Peglin B., Pellestor F., Ziyat A., Albert M., Molina-Gomes D., Selva J., Fellous M., 2009. Genetic analysis of human infertility. *Androl* 19:2-16.



## **AMPERT : Assistance Médicale à la Procréation et Risque Thrombotique (Aurélien DELLUC)**

La fécondation in-vitro (FIV) est largement utilisée dans le cadre de l'aide médicale à la procréation (AMP). En France, en 2008, 52000 FIV ont été pratiquées, aboutissant à 9000 naissances. Des complications thrombotiques ont été rapportées au cours des procédures de FIV. Ces complications thrombotiques touchent à la fois le territoire artériel et le territoire veineux.

La différence importante entre l'incidence des complications thrombotiques notifiées à l'AMPvigilance (15 évènements thrombotiques déclarés, ce qui correspond à une incidence de 0,03 pour cent cycles ovariens) et les incidences rapportées dans la littérature (0,08 à 0,11 pour cent cycles de stimulation) peut être attribuée aux éventuelles différences entre les pratiques françaises par rapport aux études publiées. Un recours plus large à la prévention antithrombotique ou l'utilisation de traitements différents pour la stimulation ovarienne pourraient expliquer la faible incidence de complications thrombotiques notifiées à l'AMPvigilance.

Des recommandations sous l'égide de l'agence de la biomédecine sur la prévention du risque thrombotique lié à la FIV ont été publiées en 2013. Dans son rapport, le groupe de pilotage des recommandations souligne le peu d'informations concernant l'incidence des évènements thrombotiques veineux lors d'AMP et qu'en l'absence d'études spécifiques, l'incidence des complications artérielles est inconnue.

### **Objectif**

L'objectif principal de cette étude est de décrire les pratiques professionnelles concernant la pathologie thrombotique au cours des procédures de FIV (prévention, diagnostic, traitement). L'objectif secondaire est de déterminer prospectivement l'incidence et les facteurs de risque des complications thrombotiques artérielles et veineuses chez les femmes survenant au cours des procédures de FIV.

### **Méthodologie :**

Etude de cohorte en soin courant, prospective, multicentrique (10 centres représentatifs de la géographie et de l'activité française d'aide médicale à la procréation), exhaustive pour chaque centre, avec une période d'inclusion sur 2 ans. Ces centres pratiquent 10000 procédures annuelles de FIV. Le suivi pour chaque patiente est de un an s'il y a une grossesse et de trois mois en l'absence de grossesse. Un prélèvement d'ADN sera réalisé pour chaque patiente incluse afin d'étudier ultérieurement l'influence des mutations des gènes des facteur II et facteur V sur le risque thrombotique des patientes.

### **Résultats attendus :**

Description des pratiques professionnelles françaises concernant la thromboprophylaxie au cours des procédures de FIV afin d'expliquer les différences observées entre les notifications au système d'AMP vigilance et l'incidence des complications thrombotiques décrites dans la littérature.

Cette étude apportera par ailleurs de données épidémiologiques fiables qui pourront conforter et éventuellement apporter des arguments pour compléter ou modifier les recommandations concernant la thromboprophylaxie au cours des procédures de FIV, qui viennent d'être publiées par l'Agence de biomédecine.

## Diagnostic prénatal non invasif de la drépanocytose par séquençage nouvelle génération (NGS) (Séverine DRUNAT)

Le diagnostic prénatal repose actuellement sur des techniques invasives de prélèvement de tissus foetaux qui comportent un risque de perte foetale estimé à 0.5-1%. On trouve physiologiquement dans le sérum maternel de l'ADN fragmenté nu issu du turn-over cellulaire. Pendant la grossesse, il a été montré que 10% environ de cet ADN avait une origine foetale.

Il est présent dès le début de la grossesse, persiste jusqu'au terme, et sa courte demi-vie (moins d'un jour) permet son utilisation pour le diagnostic prénatal non invasif (DPNI) par des stratégies faisant appel au séquençage de nouvelle génération.

Notre objectif est de réaliser une étude de faisabilité du DPNI de la drépanocytose sur l'ADN foetal circulant dans le plasma maternel, en appliquant des méthodologies disponibles dans le laboratoire de diagnostic de routine du département de Génétique de l'Hôpital Robert DEBRE.

Nous recueillerons de façon prospective l'ADN lymphocytaire parental et l'ADN circulant maternel pour des couples chez qui un diagnostic prénatal invasif est proposé par amniocentèse ou choriocentèse lors de la consultation anténatale du CRMR drépanocytose.

Nous comptons obtenir des prélèvements de 10 grossesses de foetus drépanocytaires et 30 de grossesses normales.

Notre stratégie d'analyse repose sur 1- l'étude de la ségrégation des haplotypes SNP définissant le locus morbide et 2- le dosage relatif de la séquence mutée par rapport à la séquence sauvage. L'étude des SNP sera réalisée par séquençage nouvelle génération (NGS) sur un appareil MiSeq (Illumina) à partir de bibliothèques de séquençage réalisées par PCR en gouttelettes selon la technologie développée par RainDance.

Les résultats de l'étude de l'ADN maternel circulant seront comparés aux résultats du DPN invasif. Dans le cadre de cette demande, nous demandons le financement de la validation de 3 approches techniques : (I) technique d'extraction et de quantification de l'ADN foetal circulant, (II) technique d'enrichissement et d'amplification de l'ADN foetal par PCR en gouttelettes (technologie Raindance, disponible au laboratoire depuis 2012) (III) séquençage ciblé de SNP par NGS (séquenceur MiSeq Illumina, financé par la DGOS). Cette étude de faisabilité sera suivie par d'une étude de validation clinique.

## Etude des mécanismes régulant *in vitro* la balance entre unipotence et pluripotence des cellules souches germinales mâles (Pierre FOUCHET)

Chez les patients adultes et les enfants atteints de cancer, un des effets secondaires les plus importants des traitements thérapeutiques du cancer est l'atteinte du stock de Cellules souches germinales (CSGs), entraînant par la suite de graves problèmes d'infertilité. Aucune solution thérapeutique n'est actuellement disponible pour restaurer la fertilité des patients qui ont été traités pour un cancer avant leur puberté, la cryopréservation des spermatozoïdes étant impossible dans leur cas puisque la spermatogenèse n'a pas encore commencé. La conservation de fragments testiculaires avant traitement est désormais une option proposée pour les garçons prépubères atteints de cancer, dans la perspective du développement de techniques de thérapie cellulaire utilisant les CSGs.

Afin de restaurer une spermatogenèse normale, la transplantation testiculaire de CSGs est la stratégie la plus prometteuse, ayant déjà prouvé son efficacité dans différents modèles animaux, et récemment dans un modèle de primate non humain. Cependant, le faible niveau d'efficacité de régénération de la spermatogenèse lié à la transplantation d'un nombre insuffisant de cellules souches constitue un frein au développement de ces techniques. La recherche de conditions de culture permettant l'amplification des CSGs humaines *in vitro* est ainsi un point clé à développer afin d'augmenter le nombre de cellules souches obtenues à partir d'une biopsie et ainsi accroître l'efficacité de régénération cellulaire après transplantation. Cependant, les CSGs présentent une certaine plasticité lorsqu'elles sont mises en culture, c'est à dire une capacité à modifier leur destin cellulaire et notamment à acquérir un potentiel pluripotent. Même si la fréquence de conversion de ces cellules en cellules pluripotentes reste très faible, une future utilisation de ces cellules en clinique nécessite la mise au point de méthode de culture contrôlant finement la potentialité des CSGs *in vitro* et prévenant ces événements de reprogrammation cellulaire. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette

reprogrammation restant très méconnus, nous proposons d'étudier dans les modèles murins et humains, les mécanismes responsables de la reprogrammation spontanée vers la pluripotence des CSGs *in vitro*. Nous pensons qu'une meilleure connaissance des mécanismes, régulant la reprogrammation spontanée des CSG et l'acquisition de nouvelles potentialités par ces cellules, devrait permettre de définir des stratégies d'amplification cellulaire limitant ces risques de reprogrammation.

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents au maintien de l'unipotence des CSG en culture, trois volets d'études seront abordés dans ce projet: (i) rôle de la voie p53 comme barrière de reprogrammation, (ii) rôle du facteur *nanog* comme voie de reprogrammation dans les CSG, (iii) conséquences de l'activation des protéines TET1/TET2 afin de lever des verrous épigénétiques bloquant la reprogrammation des CSG.

### Publication :

Corbineau S, Lassalle B, Givelet M, Souissi-Sarahoui I, Firllej V, Romeo PH, et al. Spermatogonial stem cells and progenitors are refractory to reprogramming to pluripotency by the transcription factors Oct3/4, c-Myc, Sox2 and Klf4. *Oncotarget*. 28 déc 2016;8(6):10050-63.

## Vers une AMP plus physiologique par l'utilisation des phospholipases A2 acrosomiales (Sylviane HENNEBICQ)

**Contexte** : Aujourd'hui les techniques d'aide médicale à la procréation (AMP) sont largement utilisées et près de 3% des enfants sont conçus grâce à ces techniques en France. Parmi ces techniques, plus de la moitié des fécondations in vitro (FIV) sont assistées d'une micro-injection de spermatozoïde dans l'ovocyte (ICSI), ce spermatozoïde étant choisi uniquement sur des critères de mobilité et de morphologie, partiellement liés à la subjectivité de l'opérateur.

**Objectif(s)** : Notre projet propose de caractériser l'effet des phospholipases sécrétées de groupe A2 sur le taux de réaction acrosomique et les caractéristiques nucléaires et membranaires des spermatozoïdes humains. Ces enzymes naturellement présentes dans l'acrosome ont montré leur efficacité comme agent augmentant le taux de fécondation et le développement embryonnaire chez la souris. Leur évaluation chez le bovin et le babouin est bien avancée et très encourageante (données non encore publiées). Nos travaux font l'objet d'une demande de brevet international. Nous analysons actuellement l'innocuité de la technique sur modèle murin et prévoyons l'extension des études d'innocuité au modèle bovin.

**Résultats attendus** : Nous espérons montrer une augmentation du taux de réaction acrosomique des spermatozoïdes traités par sPLA2 et progresser dans la caractérisation qualitative des spermatozoïdes sensibles et résistants aux phospholipases. Ces données serviraient ensuite de base à l'élaboration d'un projet de test de l'efficacité de ces molécules en AMP.

**Méthodologie** : Nous prévoyons l'étude d'une série de 30 témoins fertiles, 30 patients à sperme normal et autant à paramètres de sperme altérés, échantillons suffisant pour observer des différences significatives vu les moyennes et écarts types des données préliminaires déjà acquises. Les analyses statistiques ont été définies par un biostatisticien au sein de notre équipe. Nous analyserons les caractéristiques de mobilité, vitalité, qualité nucléaire et taux de réaction acrosomique de ces spermatozoïdes soumis ou non à l'action des sPLA2. Nous testerons également des méthodologies de tri de ces spermatozoïdes selon leurs caractéristiques acrosomiales et/ou nucléaires afin d'évaluer le bénéfice-coût de ces nouvelles pistes de préparation des gamètes. Par ailleurs, nous caractériserons les lipides et phospholipides des spermatozoïdes traités par les sPLA2 dans le modèle bovin, modèle d'accès facile et de forte homologie avec l'humain. Nous espérons ainsi pouvoir mieux appréhender les modifications des spermatozoïdes qui seraient utilisés en AMP.

**Retombées potentielles** : Compte tenu de la fréquence actuelle des naissances issues de l'AMP dans la population générale, le potentiel de valorisation de cette nouvelle approche pourrait être tout à fait significatif en termes d'amélioration des résultats et de minimisation des risques.

## Apport du dosage de la prokinéticine 1 (PROK1) dans le liquide folliculaire et les cellules folliculaires en fécondation *in vitro* (Pascale HOFFMANN)

Malgré l'amélioration des techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) depuis 30 ans, le taux de grossesse reste toujours limité, avec environ 25% de grossesses par transfert et ce pour une moyenne de 2 embryons replacés. Actuellement, la sélection de ces embryons repose sur l'établissement de scores morphocinétiques, dont l'utilisation exclusive montre aujourd'hui ses limites. L'évaluation de la qualité embryonnaire par des critères de plus haute valeur prédictive est une priorité en vue d'augmenter les taux de grossesse et d'étendre la politique du transfert d'embryon unique (SET), seul rempart contre la mortalité et morbidité associées aux grossesses gémellaires.

Il est aujourd'hui bien établi que l'amélioration des techniques d'AMP dépend de l'identification de biomarqueurs utilisables en routine, et directement corrélés à la qualité embryonnaire et aux taux de grossesse. Parmi ces facteurs, la prokinéticine 1 (PROK1) et ses récepteurs (PROKRs) constituent de nouvelles cibles qui ont réuni au fil des dix dernières années des caractéristiques biologiques directement associées à la physiologie ovocytaire, la réceptivité endométriale, l'implantation embryonnaire et le développement placentaire physiopathologique. En 2012, les taux sériques de PROK1 chez des patientes en fécondation *in vitro* (FIV) ont été décrits comme corrélés aux taux de grossesse. Ces données préliminaires soulignent le potentiel pronostique de cette cytokine dans le succès de l'implantation et celui de la grossesse.

**L'objectif principal** est de corréler les taux de PROK1 des liquides folliculaires et des plots de fécondation associés à chaque embryon à la survenue ou non d'une grossesse suite à son transfert électif (eSET), afin de déterminer si PROK1 peut être considéré comme un biomarqueur non invasif utile pour le choix de l'embryon à transférer en FIV.

Les **objectifs secondaires** sont:

- ✓ d'étudier la corrélation entre les taux de PROK1 et les taux de grossesse dans les transferts sélectifs (sSET) et non sélectif (nsSET) d'embryons.
- ✓ d'étudier la corrélation entre les taux de PROK1 et la maturité ovocytaire
- ✓ d'étudier la corrélation entre les taux de PROK1 et la compétence ovocytaire

### Résultats attendus :

- Montrer l'existence d'une corrélation entre la survenue de la grossesse et les taux de PROK1 des liquides folliculaires et des plots de fécondation associés aux embryons transférés.
- Montrer l'existence d'une corrélation entre la maturité ovocytaire ou/et la compétence ovocytaire et les taux de PROK1 des liquides folliculaires et des plots de fécondation associés aux ovocytes.

### Méthodologie :

- Etude prospective avec établissement rétrospectif de plusieurs groupes selon les objectifs (pour l'objectif principal, l'effectif a été statistiquement évalué à 15 cas/groupe).
- Dosage de PROK1 dans les liquides folliculaires et plots de fécondation des embryons transférés à l'issue de la tentative de fécondation *in vitro*.

### Publication :

Alfaidy N, Hoffmann P, Gillois P, Gueniffey A, Lebayle C, Garçin H, et al. PROK1 Level in the Follicular Microenvironment: A New Noninvasive Predictive Biomarker of Embryo Implantation. J Clin Endocrinol Metab. 1 févr 2016;101(2):435-44.

## Evaluation d'une stratégie de diagnostic génétique des troubles du spectre autistiques avec ou sans déficience intellectuelle (Jean-Louis MANDEL)

L'autisme est considéré comme un problème majeur de santé publique par sa fréquence et son impact sur les patients et leurs familles. Le diagnostic de trouble du spectre autistique (TSA) regroupe des troubles très hétérogènes, tant en ce qui concerne les manifestations et comorbidités cliniques associés (avec ou sans déficience intellectuelle, DI, par exemple) que les mécanismes génétiques impliqués. Contrairement à la DI modérée ou sévère, où l'on connaissait l'importance des causes monogéniques et des anomalies chromosomiques, les TSA ont longtemps été considérées comme majoritairement multifactoriels/multigéniques, impliquant des facteurs de risque fréquents dans la population. Cela a conduit à mener de nombreuses études de liaison et d'association sur génome entier, dont les résultats ont été décevants, avec des loci identifiés mais peu répliqués. Avec l'avènement des analyses en CGH array et du séquençage de gènes candidats à partir 2005, puis des exomes en 2012, le rôle de variants rares *de novo* (SNVs ou CNVs) comme événements causaux chez certains patients a été validé. Ceci a des implications diagnostiques majeures. L'identification d'un événement causal est important pour la famille car cela fournit une première explication aux problèmes de l'enfant, diminue la culpabilité, et permet le conseil génétique. Cela peut permettre une meilleure prise en charge du patient, en anticipant le développement de possibles comorbidités, ou, dans des cas encore trop rares, de suggérer des options thérapeutiques spécifiques. Toutefois, les études de grandes cohortes par séquençage d'exomes ou par CGH n'ont pas différencié entre TSA avec ou sans DI, et pour les exomes, sont axées majoritairement sur la détection de variants *de novo*. Le séquençage d'exome qui nécessite l'analyse en trio parent-enfant, est encore trop coûteux pour être utilisé en test de routine, et environ 20 % des régions ne sont pas suffisamment couvertes. Nous avons récemment montré que le séquençage ciblé des régions codantes de 220 gènes impliqués dans la DI permet d'établir un diagnostic étiologique fiable dans 24-28 % de patients avec DI. Nous voulons maintenant tester la fréquence des mutations causales qui peuvent être trouvés chez des patients avec TSA, et si le rendement diagnostique est ou non inférieur chez les individus présentant un autisme « haut-niveau » sans atteinte des fonctions cognitives comparé à ceux qui présentent un autisme associé à la DI. Nous utiliserons une version améliorée avec plus de 300 gènes du panel utilisé avec succès pour le diagnostic de la DI. Les variants potentiellement pathogènes seront testés par séquençage Sanger (ou qPCR pour les CNVs exoniques) chez les parents, frères et sœurs atteints ou non-atteints. En accord avec le consentement éclairé signé, un diagnostic individuel pourra être rendu. Ces travaux devraient permettre de déterminer l'efficacité et le coût de cette approche ciblée pour le diagnostic des TSA avec et sans DI.

## Approches pangénomiques et séquençage de l'exome entier dans les maladies orphelines (Judith MELKI)

Les approches pangénomiques (cartographie génétique et détection des microremaniements) et le séquençage de l'exome entier ont bouleversé notre capacité à identifier de nouveaux gènes de maladies monogéniques ces dernières années. Le séquençage haut débit de gènes ciblés correspondant à des phénotypes précis (retard mental, ataxie, myopathies) se met progressivement en place dans le cadre d'une activité de diagnostic.

Néanmoins, chez de nombreux patients atteints de maladies orphelines à phénotype singulier qui ne rentre pas dans le cadre des affections sus-citées, ces nouvelles technologies ne sont pas proposées. Dans le cadre d'une activité de recherche pilote entre l'équipe de recherche en génomique (UMR986), l'unité de génétique médicale (responsable Pr J Melki) et le service de neuropédiatrie de l'hôpital Bicêtre (chef de service : Pr P Aubourg), nous avons testé ces approches (cartographie génétique par microarray seule ou combinée au séquençage de l'exome entier) chez 8 familles multiplex ou consanguines affectées par des maladies neuropédiatriques non diagnostiquées. Les mutations en cause ont été identifiées chez 6 familles, validées au titre du diagnostic et rendues aux familles. Pour l'une des familles, des mutations du gène SLC52A3 ont été mises en évidence et ont permis l'administration de riboflavine ce qui a permis de reverser progressivement le phénotype musculaire y compris respiratoire. Une approche similaire a été menée en parallèle par l'unité de génétique médicale (responsable J Melki) au Centre Hospitalier Sud Francilien et a permis le diagnostic génétique de 6 familles sur les 11 analysées. Chez 2 des 11 familles, deux nouveaux gènes très candidats ont été identifiés. Ces résultats démontrent que cette approche permet dans 65% des cas d'établir un diagnostic, proposer un conseil génétique et dans certains cas un traitement.

Le projet a pour but la mise en place d'une plateforme de génomique clinique sur le CHU de Bicêtre pour le diagnostic génétique des affections orphelines neuropédiatriques dans l'errance diagnostique dans les formes multiplex ou consanguines. Cette plateforme bénéficiera du recrutement exceptionnel de patients, d'un phénotypage précis dans le service de neuropédiatrie. Après discussion des dossiers pour l'inclusion des familles dans le protocole (après recueillement des consentements), la cartographie génétique des loci morbides par microarray, le séquençage de l'exome entier (si nécessaire) puis l'analyse bioinformatique des données et la validation des variants par séquençage Sanger ou PCR-temps réel seront effectuées.

Cette étude permettra d'estimer sur une cohorte plus large (total: 40 familles) le pourcentage de succès dans l'identification du gène en cause, l'évaluation comparée des coûts d'une stratégie génétique ciblée (gène par gène) ou non ciblée telle que nous la proposons.

## Etude protéomique de l'endomètre chez les receveuses sous traitement hormonal substitutif dans le cadre du don d'ovocytes (Karine MORCEL)

L'implantation embryonnaire est un processus dynamique observable durant une période limitée appelée fenêtre d'implantation, impliquant à la fois la qualité de l'endomètre et celle de l'embryon. Alors que les techniques de FIV donnent la possibilité d'évaluer la qualité embryonnaire, la détermination d'une réceptivité endométriale n'est pas résolue.

La mesure de l'épaisseur de l'endomètre par échographie est une donnée insuffisante pour permettre de prédire les chances d'implantation embryonnaire, démontrant que le potentiel implantatoire de l'endomètre est un processus moléculaire complexe. Dans la littérature, des études d'analyse génomique, transcriptomique et protéomique ont montré qu'il existait des profils d'expression spécifique de la fenêtre d'implantation et que la réceptivité endométriale pouvait être altérée par les traitements d'hyperstimulation ovarienne contrôlée. Par contre, peu d'études se sont intéressées à l'impact des traitements substitutifs de préparation de l'endomètre sur sa réceptivité. Cependant, ces traitements substitutifs associant œstrogènes et progestérone sont préconisés chez les receveuses présentant une insuffisance ovarienne et entrant dans un programme de don d'ovocytes. Malgré cette préparation endométriale, le taux de grossesse n'est que de 25 à 30% après transfert d'embryon(s), montrant les limites de ce protocole.

**L'objectif** de notre étude est de valider un panel de biomarqueurs pertinents (ITIH5, Annexine A4, HOXA10, Récepteur à la progestérone et Prolactine) afin d'évaluer la réceptivité endométriale et d'établir les chances de succès de l'implantation sous traitement hormonal substitutif.

Il s'agit d'une étude prospective, monocentrique, de soins courants, sur tissus endométriaux collectés au moment d'une biopsie d'endomètre. Dans notre service de Médecine de la Reproduction, cette biopsie est réalisée en pratique courante entre J18 et J22 du cycle précédent le transfert d'embryon chez les receveuses ayant un traitement hormonal substitutif, afin de préparer l'endomètre à une future implantation embryonnaire. Sur ces tissus endométriaux, nous réaliserons une analyse histologique, immunohistochimique ainsi qu'une analyse quantitative protéique des biomarqueurs pré-cités. Une première étape consistera à établir une relation entre l'aspect morphologique de l'endomètre, le site d'expression de marqueurs spécifiques et le taux d'expression précis de chacun de ces marqueurs.

L'étape suivante consistera à associer les données précédemment obtenues avec l'état de succès ou d'échec d'implantation embryonnaire, afin d'étudier l'impact de ce traitement hormonal substitutif sur la qualité endométriale.



## Validation du diagnostic moléculaire par séquençage haut débit ciblé des rétinopathies pigmentaires (Jean MULLER)

Les Rétinopathies Pigmentaires (RP) sont des affections génétiques qui entraînent une dégénérescence rétinienne conduisant à une malvoyance sévère et constituent la première cause de consultation dans les centres de référence dédiés à la génétique ophtalmologique. Ces maladies rares sont caractérisées par une triple hétérogénéité (clinique, génétique et moléculaire), qui a rendu leur diagnostic moléculaire inaccessible par les techniques traditionnelles de séquençage par le nombre très important de gènes à tester (>200).

L'avènement du séquençage haut-débit (NGS) et de la capture ciblée ouvre des perspectives inespérées d'investigations et in fine d'amélioration de la prise en charge des patients. Le laboratoire de diagnostic génétique des HUS a récemment utilisé et validé cette technologie sur 2 groupes de maladies rares (ciliopathies et déficience intellectuelle) avec des résultats très prometteurs sur >180 patients (Redin et al, 2012, Piton et al en cours).

Ce projet propose d'étudier l'épidémiologie moléculaire et génétique d'une cohorte de patients atteints de RP issus du centre de référence affections rares en génétique ophtalmologique (CARGO, Strasbourg). Les patients bénéficieront d'un phénotypage rétinien détaillé (acuité visuelle, champ visuel, photographies du fond d'œil, OCT et ERG). Leur ADN sera analysé par NGS ciblé sur les ~200 gènes connus (<https://sph.uth.edu/retnet/>). Cette étape nécessitera diverses investigations pour le design du test, l'analyse génétique et la validation bioinformatique des résultats. La demande effectuée sur cet appel d'offre vis la mise au point fine des paramètres techniques attendant au NGS.

A terme, cette recherche permettra une étude d'épidémiologie moléculaire sur une cohorte à comparer aux publications récentes sur la fréquence des gènes impliqués. Le bénéfice pour les patients sera majeur pour: établir un mode de transmission de la maladie et optimiser le conseil génétique (actuellement très empirique) ; établir des corrélations phénotypes-génotype au sein de la population française (très peu d'études à ce jour) et par rapport aux données de la littérature internationale; identifier les patients susceptibles d'être inclus dans des protocoles futurs de recherche thérapeutique; identifier les patients avec un potentiel important pour des projets ultérieurs d'identification de nouveaux gènes.

Cette étude pilote réalisée sur une cohorte restreinte de patients (50 patients) permettra de définir les éléments techniques d'un projet plus vaste (de 150 patients) qui devrait aboutir à une stratégie nationale de prise en charge diagnostique des patients atteints de RP.

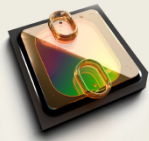
## Dépistage prénatal non invasif d'aneuploïdies fœtales dans le plasma maternel par séquençage haut débit par la technologie des semi-conducteurs (Caroline ROORYCK THAMBO)

**Objectifs :** L'objectif de ce projet pilote est la détection prénatale non invasive d'aneuploïdies fœtales de type trisomies 21, 13, et 18, par séquençage haut débit ciblé de l'ADN non cellulaire présent dans le plasma maternel, en utilisant la technologie des semi-conducteurs (Ion Torrent).

**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 21, 18 et 13. Le principal résultat attendu est la mise en évidence des 28 aneuploïdies fœtales parmi 50 prélèvements, 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 (SNP) localisés dans les régions ciblées.

**Méthodologie :** Nous proposons d'analyser de manière rétrospective l'ADN plasmatique non cellulaire issu de 50 grossesses à risque élevé d'aneuploïdie fœtale, incluant 22 fœtus euploïdes, 20 trisomies 21, 5 trisomies 18 et 3 trisomies 13. La population à risque correspond aux patientes avec un risque combiné supérieur ou égal à 1/250. Ces patientes bénéficieront donc, dans le cadre du diagnostic anténatal de routine, d'un caryotype fœtal permettant de définir la ploïdie de leur fœtus. Le séquençage haut débit ciblé des régions d'intérêt sera effectué après amplification ciblée (Ampliseq custom, Life Technologies) de l'ADN plasmatique de la mère. Au préalable les régions à amplifier seront définies à partir du design Ampliseq exome, et de nouvelles régions seront choisies de telle sorte qu'elles incluent un SNP dont l'allèle mineur présente une fréquence élevée (environ 1000 régions, 330 régions pour chacun des chromosomes 13, 18 et 21). Plus d'un million de séquences de qualité seront générées par échantillon à l'aide d'une puce PI du Proton (Life Technologies). La présence d'une aneuploïdie sera évaluée grâce à un dosage chromosomique relatif des chromosomes d'intérêt basé sur la profondeur de séquençage (au minimum 1000x). 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, ainsi que par une deuxième technique de génotypage sur puces à SNPs.

**Originalité et impact :** Du fait de la spécificité de notre centre de médecine fœtale pratiquant principalement des biopsies du trophoblaste à un terme de grossesse précoce (à partir de 12 SA), il nous faut mettre au point ce dépistage non invasif d'aneuploïdie fœtale dès ce terme plus précoce. De plus, la méthode de séquençage haut débit ciblé est basée sur des technologies moléculaires de pointe dont chaque centre académique doit acquérir le savoir-faire car elles constituent les méthodes d'avenir en génétique biologique. En particulier, l'utilisation de la technologie des semi-conducteurs que nous allons mettre au point est prometteuse pour ce type d'application prénatale car les durées de run sont inférieures à celles des autres technologies. 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.



# Non-Invasive Prenatal Testing for the most common aneuploidies (trisomies 21, 18, and 13) using a semiconductor-sequencing platform : a French multicenter pilot study

S. Brun<sup>1</sup>, P. Gueguen<sup>2</sup>, L. El Khattabi<sup>3</sup>, N. Chatron<sup>4</sup>, J. Nectoux<sup>5</sup>, S. Schutz<sup>6</sup>, J. Pipoli da Fonseca<sup>6</sup>, E. Guichoux<sup>7</sup>, A. Sorlin<sup>8</sup>, M. Quere<sup>9</sup>, J. Boudjarane<sup>10</sup>, C. Bonnet<sup>8</sup>, F. Letourneur<sup>6</sup>, C. Schluth-Bolard<sup>4</sup>, P. Jonveaux<sup>8</sup>, C. Barde<sup>11</sup>, V. Paquis-Fluckinger<sup>9</sup>, S. Bannwarth<sup>9</sup>, B. Arveiler<sup>12</sup>, M. Goossens<sup>13</sup>, C. Badens<sup>10</sup>, J. Dupont<sup>3</sup>, C. Rooryck<sup>12</sup>, D. Sanlaville<sup>4</sup>, C. Ferec<sup>2</sup>, M. Vidau<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Maternité Centre Aliénor d'Aquitaine, CHU Bordeaux, Bordeaux, France, <sup>2</sup>Laboratoire de génétique moléculaire, INSERM U1078, CHRU de Brest, Brest, France, <sup>3</sup>Service de Cytogénétique, APHP-HUPC, INSERM U1016, Université Paris Descartes, Paris, France, <sup>4</sup>HCL, Service de Génétique, UCBL1, Lyon, France, <sup>5</sup>Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, HUPC Hôpital Cochin, Paris, France, <sup>6</sup>Plateforme génomique – Inserm U1016, Paris, France, <sup>7</sup>Plateforme Génomique Transcriptome de Bordeaux, INRA Cestas, Bordeaux, France, <sup>8</sup>Service de génétique-CHRU Nancy-INSERM U954-Université de Lorraine, Nancy, France, <sup>9</sup>Service de Génétique Médicale, Hôpital de l'Archet II, CHU de Nice, Nice, France, <sup>10</sup>Département de génétique médicale, CHU Timone, Marseille, France, <sup>11</sup>HCL, Service de Biostatistique, CNRS UMR 5558, UCBL1, Lyon, France, <sup>12</sup>Service de Génétique Médicale, CHU Bordeaux, Université Bordeaux, Bordeaux, France, <sup>13</sup>Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, HUPC Hôpital Cochin, Bordeaux, France

## INTRODUCTION

Combined first-trimester screening has improved prenatal screening for trisomy 21. However the number of unnecessary invasive diagnostic procedures still remains high. Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT) using massively parallel sequencing of cell-free fetal DNA from maternal plasma, which is now part of the prenatal landscape, should drastically diminish the risk associated with invasive techniques. Several publications have established NIPT's effectiveness using mainly the Illumina sequencing technology. A French consortium of seven academic hospitals : H\* Consortium collaborates to validate a common protocol and to evaluate the efficiency and reliability of NIPT of the most common chromosomal aneuploidies using a semiconductor-sequencing platform. Indeed many French laboratories are already equipped with this technology

## PATIENTS and METHODS

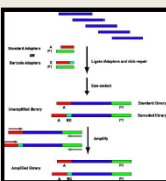


Figure 1: Ion Plus Fragment Library preparation (Life technologies®)

Since April 2014 a total of 396 pregnant women, who presented either a high risk of aneuploidy during the first trimester, an abnormality at the ultrasound scan, or a history of chromosomal abnormality and/or genetic disease and underwent fetal karyotyping were included in a prospective study.

10mL of peripheral venous blood was collected prior to chorionic villus sampling or amniocentesis after written informed consent. For each sample plasmatic DNA was extracted using the QIAamp® Circulating Nucleic Acid kit (Qiagen®). The libraries were prepared using an optimized protocol of the Ion Plus Fragment Library Kit (Life technologies®), the DNA is although not fragmented (Figure 1). Semiconductor-sequencing was performed using an Ion Proton sequencer (Life technologies®). A collection of 16 euploid pregnancies included in the H\* Consortium study was used to construct our reference set. The bioinformatic analysis was performed using Wisecondor® software (1).

## RESULTS

396 pregnant women were prospectively included, the median maternal age was 35 (18-52) and the median gestational age was 16 (11-37,71). There were several indications of fetal karyotyping in our population : 169 for scan abnormality (nuchal translucency ≥ 3,5mm or other : exomphalos, cardiopathy...), 159 for combined first trimester risk ≥ 1/250, 23 for combined first trimester risk ≥ 1/250 associated with a scan abnormality, 30 for family history of chromosomal abnormality and/or genetic disease and 15 non documented cases (Figure 2).

The NIPT results matched the fetal karyotyping results in all of the cases: **all trisomies were detected (43 Trisomy 21, 12 Trisomy 18 and 9 Trisomy 13)** (Figure 3).

The analysis of whole genome sequencing data including notable libraries quantification, total raw reads per sample enabled us to establish the quality criteria required for its use in routine diagnosis. The median of total raw reads was 14505787 with a minimum of 680000 reads.

The average runtime of this semiconductor-sequencing is around 2 hours and 30 minutes and the average cost per patient is 300 € (=214€). This method reduces therefore the time and cost of the sequencing while producing results of a 100% sensitivity and specificity in detecting the fetal trisomies 21,18 and 13.

		Total consortium population	No trisomy	T21	T18	T13
DEMOGRAPHIC DATA	maternal age (min-max)	35 (18-52)	34 (18-52)	35,5 (22-42)	38,5 (33-45,5)	37 (26-45)
	gestational age weeks of gestation (min-max)	16 (11-37,71)	16,21 (11-37,71)	15 (11,29-35)	15,5 (11-30,29)	13,57 (11,71-33,71)
FETAL KARYOTYPE INDICATION	Scan abnormality	42,7% (169/396)	39,2% (130/332)	55,8% (24/43)	66,7% (8/12)	77,8% (7/9)
	R<math>1/250</math>	40,1% (159/396)	44,9% (149/332)	16,3% (7/43)	8,3% (1/12)	22,2% (2/9)
	R<math>1/250</math> + scan abnormality	5,8% (23/396)	4,2% (14/332)	16,3% (7/43)	16,7% (2/12)	0% (0/9)
	Family history	7,6% (30/396)	8,7% (29/332)	0% (0/43)	8,3% (1/12)	0% (0/9)
	Non documented	3,8% (15/396)	3% (10/332)	11,6% (5/43)	0% (0/12)	0% (0/9)

Figure 2: H\* Consortium's population

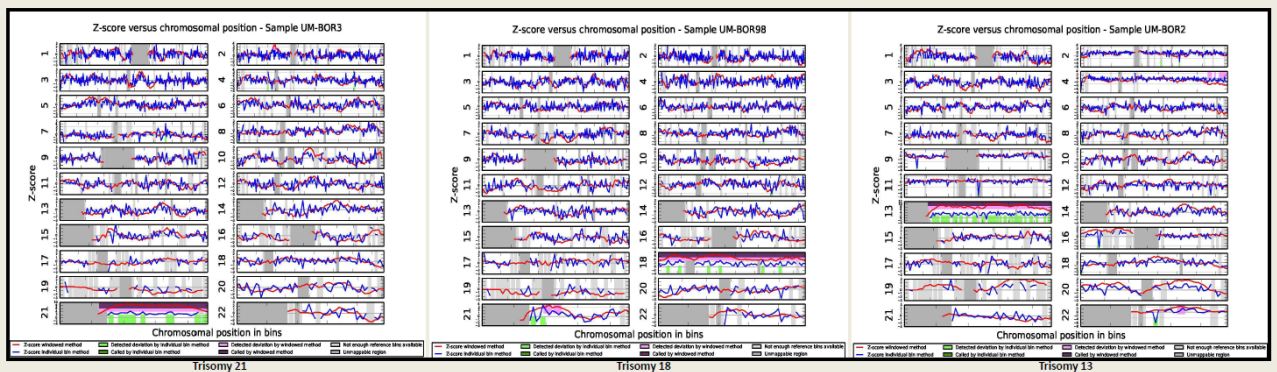
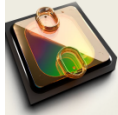


Figure 3: Detection of Trisomy 21,18 and 13

NIPT using a semiconductor-sequencing platform is a rapid, cost-effective, entirely automatable technology and represents an attractive approach for large scale population NIPT. Sensitivity and specificity were 100% for 396 pregnant women including 43 fetuses with T21, 12 with T18 and 9 with T13. As expected triploidies were not detected, however interestingly some small interstitial deletions were. This study is also the first clinical set to use the online free access Wisecondor software.

The authors declare no conflict of interest.

(1) Straver, Sierman EA, Holstege H, Visser A, Oudejans CB, Reinders ML. WISECONDOR: detection of fetal aberrations from shallow sequencing maternal plasma based on a within-sample comparison scheme. Nucleic Acids Res. 2014 Mar;42(5):e51. doi: 10.1093/nar/gkt992. Epub 2013 Oct 28.



# Comparison of two academic softwares (WISECONDOR and RAPIDR) for aneuploidies detection using semiconductor sequencing data in a NIPT process

Nectoux J<sup>1,3</sup>, Schutz S<sup>2</sup>, Chatron N<sup>3</sup>, Brun S<sup>4</sup>, Gueguen P<sup>2</sup>, El Khattabi L<sup>5</sup>, Pipoli Da Fonseca J<sup>6</sup>, Dumont F<sup>6</sup>, Sorlin A<sup>7</sup>, Quere M<sup>8</sup>, Boudjarane J<sup>9</sup>, Bonnet C<sup>7</sup>, Letourneur F<sup>6</sup>, Lagarde A<sup>9</sup>, Schluth Bolard C<sup>3</sup>, Guichoux E<sup>10</sup>, Campan-Fournier A<sup>11</sup>, Arveiler B<sup>12</sup>, Jonveaux P<sup>7</sup>, Goossens M<sup>1</sup>, Badens C<sup>9</sup>, Dupont JM<sup>5</sup>, Sanlaville D<sup>3</sup>, Ferec C<sup>2</sup>, Bardel C<sup>11</sup>, Vidaud M<sup>1</sup>, Rooryck C<sup>12</sup>

1.Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, HUPC Hôpital Cochin, Paris, France, 2.Laboratoire de Génétique Moléculaire, INSERM U1078, CHRU de Brest, France, 3.HCL, Service de Génétique, UCBL1, Lyon, France, 4.Maternité Centre Aliénor d'Aquitaine, CHU Bordeaux, France, 5.Service de Cytogénétique, APHP-HUPC, INSERM U1016, Université Paris Descartes, France, 6.Platforme Génomique, Inserm U1016, Paris, France, 7.Service de Génétique, CHRU Nancy-INSERM U954-Université de Lorraine, France, 8.Service de Génétique Médicale, Hôpital de l'Archevêque, CHU de Nice, France, 9.Département de Génétique Moléculaire, CHU de Marseille, Marseille, France, 10.Platforme Génomique Transcriptome de Bordeaux, INRA Cestas, France, 11.HCL, Service de Biostatistique, UCBL1, Lyon, France, 12.Service de Génétique Médicale, CHU Bordeaux, Bordeaux, France

## INTRODUCTION

Based on a statistical analysis of low coverage genome sequencing data, non-invasive prenatal testing (NIPT) of aneuploidies is being provided in a growing numbers of countries. It has proved a major improvement versus classic screening strategies but still requires invasive procedures when positive. Several publications have established NIPT's effectiveness using mainly the Illumina sequencing technology. The French H+ Consortium, bringing together seven academic hospitals, collaborated to validate a common protocol and to evaluate the efficiency and reliability of NIPT of the most common chromosomal aneuploidies using a semiconductor-sequencing platform. Here we compare two different academic softwares available in open source developed for this application : WISECONDOR<sup>1</sup> and RAPIDR<sup>2</sup>.

## MATERIALS AND METHODS

Since April 2014, a total of 386 pregnant women, who presented either a high risk of aneuploidy during the first trimester, an abnormality at the ultrasound scan, or a history of chromosomal abnormality and/or genetic disease and underwent fetal karyotyping were included in a prospective study. For each patient, peripheral venous blood was collected prior to invasive testing, circulating DNA was extracted using the QIAamp® Circulating Nucleic Acid kit (Qiagen®), libraries were prepared using an optimized protocol of the Ion Plus Fragment Library Kit (Life technologies®), and semiconductor-sequencing was performed using an Ion Proton sequencer (Life technologies®). Then, data were analyzed using two different academic softwares available in open source (WISECONDOR<sup>1</sup> and RAPIDR<sup>2</sup>), a collection of 16 euploid pregnancies included in the H+ Consortium study being used to construct our reference set.

The general principle of NIPT bioinformatics for the detection of aneuploidies via whole genome sequencing is to compare the read count of the sample to a reference euploid data set (n=16 in our study) used as a baseline. As GC content is known to bias read counts, the analysis is generally preceded by a GC correction step. To facilitate the comparison, both programs were used with their default parameters.

### WISECONDOR

WISECONDOR (Within Sample Copy Number aberration DetectOR) uses a LOWESS function for GC correction of read counts and computes per bin z-scores using a within sample reference. A set of euploid sample is first used to define, for a given bin k (1 Mb) on chromosome i, a set of reference bin with similar read frequencies as bin k and located on all the other autosome. The z-score for bin k of patient j is defined as:

$$z_k = (R_k - M_{ref_k}) / SD_{ref_k}$$

$R_k$  is the number of reads in bin k of patient j

$M_{ref_k}$  and  $SD_{ref_k}$  are the mean and standard deviation of the number of reads computed on the set of reference bin for bin k in patient j

The bin is called aberrant if  $z_k$  is over a given threshold (3 in our analysis) and an aneuploidy is called at the chromosome level if more than 80% of the bins are aberrant. Moreover, a whole-autosome profile representing the per-bin z-score along the chromosome is also generated and was visually interpreted by cytogeneticists for every sample.

### RAPIDR

RAPIDR (Reliable Accurate Prenatal non-Invasive Diagnosis R package) was developed and tested using data from the RAPID project. For the GC bias correction step, we used the Principal Component Analysis (PCA) which is considered to have a higher sensitivity. The idea is to reduce systematic noise by regressing the count ratios in each 20 kb bin of the genome with the first 10 principal components defined using an euploid reference set.

Then, for each chromosome i of the tested patient j, a chromosome wide z-score is computed:

$$z_{(i,j)} = (R_{(i,j)} - M_i) / SD_i$$

Ratio of the number of reads mapped to chromosome i in the j<sup>th</sup> sample compared to the number of reads mapped to all the autosomes in the j<sup>th</sup> sample

$M_i$  and  $SD_i$  are the mean and standard deviation of the same ratios computed on a reference set of euploid samples. A trisomy is called if the z-score exceeds a given threshold (3 in our analysis)

## RESULTS

All 386 patients included in the study were sequenced and analyzed with both WISECONDOR and RAPIDR softwares. A common set of 16 samples was used for the creation of the two reference baselines.

Trisomy	Number of cases	NIPT via WISECONDOR	NIPT via RAPIDR
<b>Trisomy 21</b>	39 of 370 (11%)	% (95% CI)	% (95% CI)
Sensitivity		100% (91-100)	100% (91-100)
Specificity		100% (98.8-100)	98% (95.8-99)
Positive predictive value		100%	85%
Negative predictive value		100%	100%
<b>Trisomy 18</b>	12 of 370 (3%)		
Sensitivity		100% (75.8-100)	100% (75.8-100)
Specificity		100% (99.9-100)	99% (96.8-99.4)
Positive predictive value		100%	71%
Negative predictive value		100%	100%
<b>Trisomy 13</b>	9 of 370 (2%)		
Sensitivity		100% (70.1-100)	100% (70.1-100)
Specificity		100% (98.9-100)	98% (96.5-99.2)
Positive predictive value		100%	60%
Negative predictive value		100%	100%

Table 1. Test performance

## DISCUSSION

The PCA method used herein with RAPIDR is known to be more sensitive, generating more false positive than WISECONDOR in our study. The number of false negative cases, main concern for a screening test, is comparable between the two strategies. The same 16 samples were used for the creation of the two reference baselines. Increasing the number of patients used for the reference should generate even more accurate results. Both programs require relatively low computing power, compatible with routine practice on a NGS platform. Initially developed with Illumina dye sequencing data, we have demonstrated that these two algorithms are compatible with semiconductor sequencing data. Further bioinformatics explorations are necessary to select the most efficient strategy for NIPT with semiconductor sequencers.

The authors declare no conflict of interest.

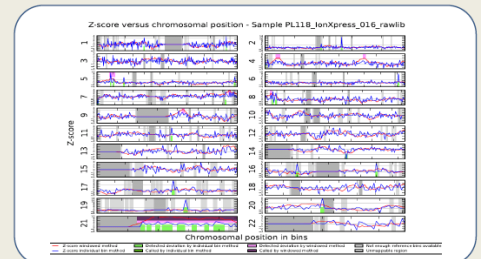


Figure 1. Example of detection of trisomy 21 using WISECONDOR algorithm

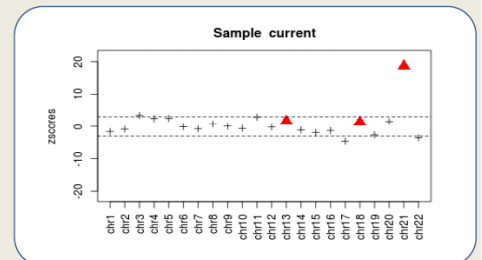


Figure 2. Example of detection of trisomy 21 using RAPIDR algorithm

- (1) Straver R, Sietarmans EA, Holstege H, Visser A, Oudejans CB, Reinders MJ. WISECONDOR: detection of fetal aberrations from shallow sequencing maternal plasma based on a within-sample comparison scheme. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(5). <https://github.com/rstraver/wisecondor>
- (2) Lo KK, Bousted C, Chitty LS, Plagnol V. RAPIDR: an analysis package for non-invasive prenatal testing of aneuploidy. *Bioinformatics.* 2014; 30(20):2965-7. <http://cran.r-project.org/web/packages/RAPIDR/index.html>

## Génétique de l'infertilité masculine : gènes impliqués dans l'azoospermie non obstructive (Stéphane VIVILLE)

L'infertilité est définie comme l'absence de grossesse après 1 an de relations sexuelles sans protection. Parmi les couples avec un désir d'enfant, approximativement 15 % ont un problème d'infertilité dont 30-40 % sont dus à un facteur masculin. La spermatogenèse est un processus extrêmement complexe qui implique des mécanismes spécialisés exigeant plusieurs centaines de gènes et des protéines. Bien que des données suggèrent que beaucoup de ces infertilités masculines aient une origine génétique, la cause n'a pas été élucidée dans la grande majorité de cas.

Notre compréhension des bases génétiques de l'infertilité masculine a de grandes implications non seulement pour comprendre la cause de cette infertilité, mais aussi dans la détermination du pronostic et de la prise en charge de tels couples et fournir la thérapie la mieux adaptée. L'azoospermie non obstructive (NOA) correspond à l'incapacité de produire des spermatozoïdes par défaut de production. Ceci concerne 10 % des hommes infertiles et est diagnostiqué chez 60 % des hommes azoospermiques. Basées sur des études d'infertilité masculine familiale, qui implique souvent deux ou plus enfants de mêmes parents, la plupart des patients NOA sont considérés comme porteurs de mutations autosomal inconnues. Cependant peu de défauts autosomal impliqués dans cette forme d'infertilité sont connus. Les approches par gènes candidats ont principalement été utilisées pour essayer d'identifier des mutations causant l'infertilité, cependant en raison de la grande hétérogénéité génétique et le nombre limité de patients testés, les résultats apportés par ces approches sont peu concluants. Récemment l'approche d'analyse du génome par des puces à ADN a permis de mettre en évidence le rôle de gènes différents chez des patients globozoospermiques. Dans notre projet nous aspirons à identifier des gènes responsables d'azoospermie non obstructive. Nous avons identifié deux familles consanguine d'infertilité masculine où les patients souffrent de NOA. Nous utiliserons la nouvelle génération de puce à SNP (Single-Nucleotide Polymorphisms) pour identifier les régions de homozygotie dans la population recrutée associé au séquençage de l'exome de deux patients atteints. La combinaison de ces approches permet une accélération de la découverte de la mutation causale. En effet, ce cela permet de limiter l'analyse du séquençage aux régions d'homozygotie. Il sera alors possible de développer une étude fonctionnelle de ces gènes ainsi qu'un test de diagnostic moléculaire aux patients présentant un phénotype semblable.

La compréhension des mécanismes sous-jacents la spermatogénèse ouvrira la voie à l'étude de la responsabilité des perturbateurs endocriniens dans le déclin de la fertilité masculine et leurs mécanismes d'action avec l'espoir de pouvoir interférer sur ces actions délétères.

### Publications :

1. Okutman O, Muller J, Baert Y, Serdarogullari M, Gultomruk M, Piton A, et al. Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. *Hum Mol Genet.* 1 oct 2015;24(19):5581-8.
2. Okutman O, Muller J, Skory V, Garnier JM, Gaucherot A, Baert Y, et al. A no-stop mutation in MAGEB4 is a possible cause of rare X-linked azoospermia and oligozoospermia in a consanguineous Turkish family. *J Assist Reprod Genet.* mai 2017;34(5):683-94.

## Evaluation de la lettre d'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques (Cécile ZORDAN)

### **Objectifs**

La récente publication du décret n° 2013-527 du 20 juin 2013 fixe les différentes modalités de transmission de l'information de la parentèle dans le cadre de la mise en évidence chez une personne d'une anomalie génétique pouvant être responsable d'une affection grave justifiant de mesures de prévention ou de soins. Ainsi, si cette personne ne souhaite pas informer elle-même les membres de sa famille, elle peut demander au médecin de procéder à la transmission de cette information. Un modèle de lettre pouvant être adressé par le médecin aux apparentés potentiellement concernés a été publié en annexe de ce décret.

L'objectif principal de cette étude est l'harmonisation des pratiques concernant la procédure d'information de la parentèle avec l'utilisation par le plus grand nombre de professionnels exerçant en Génétique d'un même modèle de lettre, permettant une cohérence de l'information au sein des familles. Cette étude applique les recommandations de la Haute Autorité de la Santé (Elaboration d'un document écrit d'information à l'intention des patients et des usagers du système de santé) pour proposer une lettre répondant aux critères de compréhension nécessaire à instaurer un dialogue clair avec le patient et sa famille.

### **Résultats attendus**

Cette recherche permettra de :

- savoir comment le modèle de lettre paru en annexe du décret (lettre A) est compris et perçu
- connaître les représentations associées à certains mots spécifiques de cette lettre
- proposer une nouvelle lettre (lettre B) prenant en compte les résultats obtenus
- déterminer une lettre, forte de ces évaluations scientifiques, qui conviendrait au plus grand nombre afin d'uniformiser les pratiques sur l'ensemble du territoire national garantissant ainsi une unité de soins aux consultants et à leur famille.

### **Méthodologie**

Une première partie (étude 1a) permettra d'évaluer la compréhension et les émotions suscitées par la lettre publiée en annexe du décret (lettre A) sur les patients et la population générale grâce à un questionnaire rempli au cours d'un entretien individuel.

Cette étude 1a sera complétée par des entretiens semi-directifs auprès des deux populations précitées mais également auprès de professionnels travaillant en Génétique et des personnes ayant reçu cette lettre (étude 1b).

Toujours dans cette étude 1, un groupe focus sera constitué (regroupant différents professionnels travaillant en génétique et des représentants d'association) afin d'obtenir de nouvelles informations sur la compréhension de la lettre A (étude 1c). L'ensemble de ces observations nous permettra de rédiger une nouvelle lettre (lettre B) tenant compte des éléments de ces trois évaluations.

La seconde partie de notre étude comparera les deux lettres A et B sur des thèmes précis auprès de trois populations différentes : les patients, la population « tout venant » et les professionnels travaillant en génétique (étude 2) ; permettant ainsi d'identifier une lettre qui conviendrait au plus grand nombre.



## Evaluation de la lettre d'information de la parentèle dans le cadre d'un examen des caractéristiques génétiques (étude LIPEG)

Cécile ZORDAN (1), Linda AKLOUL (2), Christophe CORDIER (3), Pauline ROCHE (1), Didier LACOMBE (1), Laura RICHERT (4), Aline MAILLARD (4), Séverine MARTIREN (4), Laetitia MONTEIL (5), Emmanuelle HAQUET (6), Nicolas TARIS (7), Eva TOUSSAINT (1)

(1) Service de Génétique Médicale, CLAD Sud-Ouest, CHU de Bordeaux, Université de Bordeaux (cecile.zordan@chu-bordeaux.fr) (2) Service de Génétique Clinique, CLAD Ouest, Hôpital Sud, CHU de Rennes, (3) Service de Génétique Oncologique, UF 6948, CHRU de Strasbourg, (4) Unité de Soutien Méthodologique à la Recherche Clinique et Epidémiologique, CHU de Bordeaux, (5) Service de Génétique Médicale, Hôpital Purpan, CHU de Toulouse, (6) Service de Génétique Médicale, CLAD Sud-Languedoc Roussillon, Hôpital Arnaud de Villeneuve, CHRU de Montpellier, (7) Service de Génétique Oncologique, CRLCC Paul Strauss, Strasbourg.

### INTRODUCTION

Le décret d'application n°2013-527 du 20 juin 2013 fixe les différentes modalités de transmission de l'information de la parentèle en cas de diagnostic d'une anomalie génétique pouvant être responsable d'une affection grave. Si la personne chez qui l'anomalie est identifiée ne souhaite pas informer elle-même les membres de sa famille potentiellement concernés, elle peut demander au médecin prescripteur de procéder à cette information par l'envoi d'une lettre recommandée. Cette lettre a pour objectif d'inviter les apparentés à consulter dans un service de génétique. Le modèle de lettre publié en annexe de ce décret n'est pas consensuel, ayant fait l'objet de nombreuses réécritures par les professionnels de la Génétique. Il nous a donc paru essentiel de réaliser une étude visant à évaluer la compréhension et l'impact que cette lettre peut avoir sur les patients comme sur les professionnels.

### OBJECTIF

Notre recherche, intitulée LIPEG, a pour objectif d'évaluer la lettre du décret. Avec ces résultats, nous espérons proposer un modèle de lettre consensuelle dont l'utilisation par le plus grand nombre de professionnels permettrait d'harmoniser les pratiques dans l'information de la parentèle.

### METHODOLOGIE

Il s'agit d'une étude observationnelle nationale multicentrique qui a bénéficié d'un financement de l'Agence de la biomédecine.

Une première étude (1a) s'est intéressée, grâce à un questionnaire, à la compréhension de la lettre publiée en annexe du décret (lettre A), ainsi qu'aux sentiments qu'elle peut susciter et à l'envie d'y donner suite (patients reçus en consultation de conseil génétique et personnes de la population générale). Elle a été complétée par des entretiens semi-directifs auprès des deux populations précitées, de professionnels de la Génétique et de personnes ayant reçu cette lettre dans les conditions réelles. L'ensemble de ces observations a été la base d'échanges entre professionnels (conseillers en génétique, psychologue, médecin généticien et médecin généraliste) et associations de patients (Vaincre les Maladies Lysozymales, Association Française du Syndrome de Rubinstein-Taybi, Association Française Ataxie de Friedreich, Association Connaitre les Syndromes Cérébelleux, Alliance Maladies Rares) afin de rédiger une nouvelle lettre (lettre B).

L'étude a été poursuivie en deux phases :

- étude 2a : évaluation de la lettre B dans les mêmes conditions que pour la lettre A dans l'étude 1a, permettant une comparaison indirecte des deux lettres A et B
- étude 2b : comparaison directe des deux lettres A et B décrivant la préférence des participants, par un autre questionnaire après lecture aléatoire des deux lettres (patients, population générale et professionnels impliqués dans le conseil génétique).

**Lettre A**

Madame, Monsieur,

En ma qualité de médecin, j'ai été amené(e) à prendre en charge un membre de votre famille.

Les examens effectués sur cette personne ont mis en évidence une anomalie génétique d'origine familiale qui peut faire l'objet de mesures de prévention ou de soins. Appartenant à la même famille, il est possible que vous soyez également concerné(e) par cette anomalie de façon directe ou indirecte. Cela ne signifie, ni que vous êtes vous-même porteur de cette anomalie ni, si tel était le cas, que vous êtes ou serez atteint d'une maladie.

Tenu au respect de la loi, je ne peux vous révéler ni l'identité de cette personne ni l'anomalie génétique concernée.

En revanche, il est de mon devoir de vous inviter à consulter un médecin généticien qui sera à même de vous donner plus de précisions et de vous proposer les examens qu'il jugera utiles. Ce médecin pourra prendre contact avec moi pour obtenir plus d'informations. A titre indicatif, je vous transmets les coordonnées des consultations de génétique les plus proches de votre domicile. Vous pouvez également consulter un autre médecin de votre choix.

Je comprends que ce courrier puisse vous surprendre. D'autres membres de votre famille ont probablement reçu le même courrier. Certains en parleront et d'autres préféreront se taire. Il est souhaitable de respecter les choix de chacun. Vous pourrez évoquer également ces aspects avec le médecin généticien que vous consulterez.

Bien entendu, vous restez totalement libre de donner suite ou non à ce courrier.

Je vous prie d'agréer, Madame, Monsieur, l'expression de ma considération distinguée.

**Lettre B**

Chère Madame, Cher Monsieur,

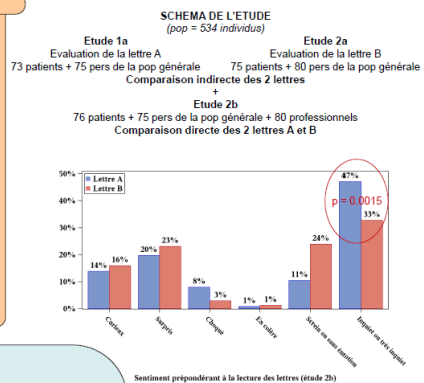
Nous avons été amenés à rencontrer un membre de votre famille en consultation de génétique. Les examens effectués chez cette personne ont mis en évidence une anomalie génétique pouvant être d'origine familiale.

La loi n°2011-814 du 7 juillet 2011 nous permet, avec l'accord de la personne que nous avons vue en consultation, d'informer les membres de sa famille potentiellement concernés par cette anomalie génétique. C'est la raison de ce courrier.

Nous vous invitons donc à consulter un médecin généticien ou un conseiller en génétique qui vous donnera une information sur cette anomalie génétique et sur les mesures de prévention et/ou de soins qui peuvent être envisagées. Vous pourrez alors discuter ensemble de l'intérêt de réaliser des analyses.

A titre indicatif, nous vous transmettons les coordonnées des consultations de génétique les plus proches de votre domicile. Vous êtes libre de rencontrer le médecin de votre choix.

Nous vous prions d'agréer, chère Madame, cher Monsieur, l'expression de notre considération distinguée.



### RESULTATS

**Compréhension** : Plus de 90% des personnes interrogées dans les études 1a et 2a ont compris le sens général des lettres A et B.

L'étude 2b ne montre pas de différence significative de compréhension entre les 2 lettres.

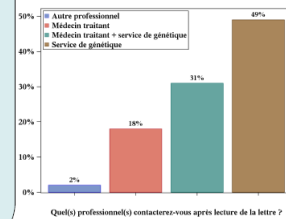
#### Sentiments :

- De manière très comparable après lecture des lettres A et B, le sentiment prépondérant dans les études 1a et 2a est l'inquiétude (54% des individus), suivi par la curiosité (20% lettre A et 22% lettre B). Pour les parents, cette inquiétude est concentrée sur leurs enfants.

- L'étude 2b confirme ce résultat et précise que la lettre A suscite significativement plus d'inquiétude que la lettre B ( $p = 0.0015$ ). De même les individus sont significativement plus sereins ou sans émotion après lecture de la lettre B par rapport à la lettre A ( $p = 0.0001$ ).

**Préférence** : L'étude 2b n'a pas permis d'observer de préférence significative d'une des deux lettres auprès des trois populations interrogées.

**Objectif de la lettre** : Après lecture des deux lettres, plus de 85% des individus contacteraient un professionnel de santé. A noter qu'une majorité des individus interrogés contacteraient, entre autre, leur médecin traitant.



### DISCUSSION

Nous notons des réponses homogènes entre les différentes populations interrogées, notamment en fonction de leurs caractéristiques (âge, sexe, catégorie socioprofessionnelle) ainsi qu'en fonction du centre recruteur. Nous n'avons pas relevé de préférence significative pour une des deux lettres alors que notre groupe de travail avait un a priori plutôt négatif sur la lettre publiée en annexe du décret.

Nous relevons des remarques intéressantes des participants, notamment qu'il semble important d'expliquer la procédure d'information de la parentèle dans la lettre, que l'adresse du service expéditeur peut lever l'anonymat, que la lettre A est préférée par certains car jugée plus humaine et rassurante alors que la lettre B est préférée par d'autres car plus simple et directe. Ces deux lettres ne semblent pas aussi inquiétantes que nous l'aurions pensé au préalable, avec des sentiments de surprise et de curiosité très présents. Mais nous reconnaissons que le fait que ces lettres ne soient pas lues en situation réelle a nécessairement un impact sur les sentiments ressentis.

### CONCLUSION

Cette étude montre une bonne acceptation des lettres. L'inquiétude induite par la lecture de la lettre encourage les personnes à contacter leur médecin traitant et/ou un service de génétique. Il semble donc important de diffuser une information sur cette procédure auprès des médecins traitants. La formulation du courrier n'interfère pas avec le sens compris par les individus ni avec leur volonté d'y donner suite. Malgré nos suppositions, cette étude démontre que le modèle initial proposé en annexe du décret, bien que significativement plus inquiétant que le second testé, est satisfaisant pour qu'il soit conservé et utilisé par tous.