

**AOR 2008 « AMP, Diagnostic prénatal et Diagnostic génétique »  
Résumés résultats et publications**

<b>Chercheur</b>	<b>Sujet de recherche</b>	<b>Thème</b>
<b>BAHON-RIEDINGER Isabelle</b>	<a href="#">Dosage des Auto-anticorps anti-récepteurs des folates chez les mères d'enfants atteints de Spina Bifida ou d'Anencéphalie</a>	4
<b>BERTHIAU Denis</b>	<a href="#">Enquête d'éthique clinique sur des cas d'assistance médicale à procréation (AMP) "dérangeants" au plan éthique</a>	1
<b>BONNEFONT Jean-Paul</b>	<a href="#">Amélioration des procédures de diagnostic prénatal des maladies génétiques résultant de mutations de l'ADN mitochondrial</a>	4
<b>BOURROUILLOU Georges</b>	<a href="#">Diagnostic anténatal des remaniements chromosomiques par CGH array utilisant l'ADN fetal libre circulant dans le liquide amniotique</a>	4
<b>DOCO-FENZY Martine</b>	<a href="#">Extension d'une plate-forme informatique sécurisée pour la gestion du contrôle de qualité externe rétrospectif et prospectif en cytogénétique (EPICQE)</a>	4
<b>DOMMARGUES Marc</b>	<a href="#">Elaboration d'un indicateur de qualité des images d'échographie fœtale au deuxième trimestre de la grossesse. Impact sur les pratiques</a>	4
<b>LE BOUC Yves</b>	<a href="#">Evaluation du risque de pathologies liées à l'empreinte parentale après Assistance Médicale à Procréation (AMP)</a>	3
<b>LEFEVRE Annick</b>	<a href="#">La maturation <i>in vitro</i> des ovocytes frais ou cryopréservés : aspect épigénétique, analyse de la méthylation de l'ADN et du profil d'acétylation des histones</a>	2
<b>LEPORRIER Nathalie</b>	<a href="#">Etude des micro-remaniements chromosomiques chez des fœtus polymalformés par CGH-array sur ADN fœtal libre du surnageant de liquide amniotique.</a>	4
<b>LEVY-MOZZICONACCI</b>	<a href="#">Génotypage plaquettaire fœtal : Diagnostic prénatal non invasif sur sang maternel</a>	4
<b>LUCAS Josette</b>	<a href="#">Etude rétrospective par CGHarray de 50 cas de clarté nucale <math>\geq</math> 4 mm ou d'hygroma kystique du 1er trimestre à caryotype normal</a>	4
<b>PLOTTON Ingrid</b>	<a href="#">Préservation de la fertilité à l'adolescence dans les troubles de la spermatogenèse : étude prospective</a>	3
<b>SAUVAT Frédérique</b>	<a href="#">Greffe d'ovaire non pubère chez la brebis : étude de l'induction de la puberté, fertilité et risque épigénétique dans la descendance</a>	4
<b>SCHUBERT Benoît</b>	<a href="#">Vitrification des ovocytes : étape pré-clinique en vue d'une utilisation dans le cadre de la préservation de la fertilité</a>	2
<b>VEKEMANS Michel</b>	<a href="#">Etude de patients présentant une avance staturale syndromique par hybridation comparative sur puce à ADN</a>	4
<b>VIVILLE Stéphane</b>	<a href="#">Génétique de l'infertilité masculine</a>	2

## **Thème de recherche : AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique**

- 1) Etudes en sciences humaines, économiques et sociales, ainsi qu'en santé publique portant notamment sur les réflexions éthiques que font surgir les enjeux nouveaux de ces activités ;
- 2) Sécurité et qualité des pratiques, notamment dans les technologies innovantes ;
- 3) Impact des diverses méthodes en matière de santé ;
- 4) Amélioration des techniques et méthodes.

## **Dosage des Auto-anticorps anti-récepteurs des folates chez les mères d'enfants atteints de Spina Bifida ou d'Anencéphalie**

**BAHON-RIEDINGER Isabelle - CHU Rennes**

### **Résumé :**

Les auto-anticorps anti-récepteurs des folates sont associés à la survenue de malformations du tube neural. Cet examen n'est actuellement pas pratiqué en France.

Objectif 1 : Il s'agit de mettre au point les dosages d'Auto-anticorps anti-récepteurs des folates, examen indispensable aux processus de prise en charge et d'accompagnement des mères et des couples. Il faut parfaire la méthode : simplification, comparaison à plusieurs populations témoins dont des femmes présentant des maladies auto-immunes.

Objectif 2 : Il s'agit de détecter l'évolution des taux d'Auto-anticorps anti-récepteurs des folates chez les mères d'enfant spina bifida. Nous ignorons tout actuellement de l'apparition, de la persistance et de la disparition de ces anticorps.

Objectif 3 : Il s'agit de déterminer si l'acide folinique pourrait être utilisé en prévention des risques de récurrences (ce dérivé n'est pas bloqué par les anticorps) mieux que par l'acide folique actuellement recommandé. Le statut sérique en folates peut-être simplement associé aux résultats auto-immuns.

Objectif 4 : Il s'agit de réaliser une recherche cohérente sur les causes des malformations du tube neural, en étudiant le polymorphisme des gènes (et notamment des récepteurs) du métabolisme des folates chez ces mères et dans ces familles, et ultérieurement étude des gènes du développement embryonnaire du système nerveux central ; ces études étant conjointes avec le centre maladie rare des anomalies du développement de l'Ouest.

**Résultats attendus** : On s'attend à environ 50% de cas positifs chez les patientes au cours ou au décours d'une grossesse, contre moins de 10% chez les témoins. On ignore si les taux sont stables ou décroissants dans le temps. Ces données seront croisées avec les données biologiques (dosages sériques des folates), et les durées écoulées entre grossesse et prélèvement. **Méthodologie** : Recrutement d'environ 100 femmes ayant ou ayant eu un enfant avec malformation du tube neural par les centres de diagnostic prénatal, les centres de génétique et les centres de suivi des enfants ou adultes atteints de spina bifida. Trois cohortes de témoins : 100 femmes vues dans les mêmes conditions (grossesses, génétique ou suivi adulte), mais qui n'ont aucun antécédent de malformation du tube neural ; une trentaine de femmes ayant une maladie avec forte présence d'auto-anticorps (maladie lupique), et une centaine de témoins donneuses de sang appariées pour l'âge. Les prélèvements concernent des sérums, pour dosage des folates sanguins, et du sang total pour étudier le polymorphisme des gènes du métabolisme des folates. La mise au point du dosage des autoanticorps se fait selon une méthode dérivée de celle décrite par Rothenberg et Ramaekers.



## Blocking Folate Receptor(FR $\alpha$ ) Auto-Antibodies in women with a pregnancy complicated by a neural tube defect (NTD).

I.Bahon-Riedinger(1) M.Corolleur(2) H.Journal(3)

1 Auto-immunity Laboratory CHU RENNES FRANCE 2 Immunology Laboratory CHU RENNES FRANCE 3 Geneticist CH VANNES FRANCE

### Introduction:

Neural Tube Defects occur in approximately 1 per 1000 births in France and Folate metabolism is implicated in this problem. Although folic acid supplementation reduces the occurrence, the underlying mechanism is not well understood, as pregnant women with fetus with NTD do not have clinical folate deficiency. Rothenberg SP (1) identified Autoantibodies against FR $\alpha$  in sera of women with a pregnancy complicated by NTD, but Molloy AM (2) couldn't find any significant association between antibodies and NTD. The assays used receptor extracted from human placenta tissue radiolabeled with [ $^3$ H] Folic Acid (1), ED27 and KB cell culture (1) and/or folate receptor purified from cow's milk in an ELISA assay (2).

### Objective:

The aim of our study was to work without extracting FR $\alpha$ . We decided to use cell culture and to observe direct effect of antibodies on cultured cells, but cultured cells are very resistant to folate depletion and direct effect of Anti-FR $\alpha$  was difficult to demonstrate. Finally, inhibition of [ $^3$ H] Folic Acid incorporation by KB cells in presence or absence of suspected autoantibodies was used. KB cells were used because of high density of FR $\alpha$  and nonfunctional Reduced Folate Carrier (3). The amount of receptor activity increases markedly when cells are depleted of folate through growth in folate depleted medium (4,5,6). So we chose two culture media: normal RPMI with 2300nM folate and folate depleted medium RPMI with 2nM Folate.

### Material and methods:

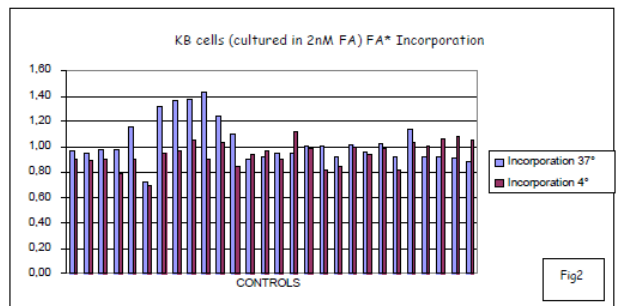
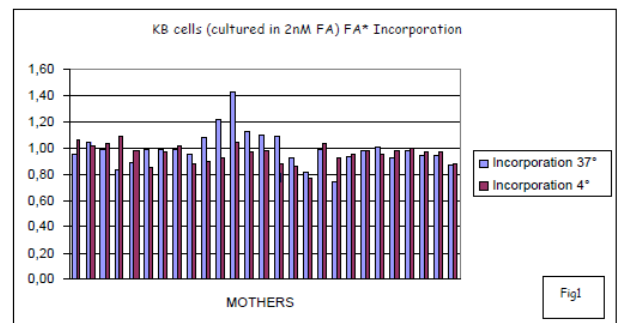
- 24 sera of women with pregnancy complicated by NTD
- 16 sera from fathers and 10 healthy (7 women and 3 men) as control cases.
- KB were grown in two medium : normal (high folate concentration = 2300nM) and depleted (reduced folate concentration = 2nM). In this depleted medium, density of FR $\alpha$  on the cell surface is increased and [ $^3$ H] Folic Acid incorporation is three to four higher than with normal medium.

Inhibition of binding of FA H $^{[3]}$  by FR $\alpha$  Ab was demonstrated by incubating KB with serum (previously devoid of serum folate by charcoal) prior to incubation with FA\*. Cell associated reactivity was counted and the percentage of H $^{[3]}$  FA blocked from binding to the FR (as compared with medium alone) was determined within four conditions: with KB cultured in normal medium and in depleted medium and with FA\* incubation at 37° and 4°. Incubation at 4° avoid release of the FR $\alpha$ (FBP) from the cell membrane (7,8).

**Results and Discussion:** Results are expressed as percent inhibition relative to the control wells (without serum).

As shown in fig1 (mothers with NTD fetus) and fig2 (controls), none of the results found in conditions mentioned above showed a significant difference between mother's sera and controls. Unlike the study of Rothenberg (1) using ED27 and KB cells with two antibodies positive sera, we were not able to demonstrate the FR $\alpha$  Auto-antibodies inhibition of incorporation of H $^{[3]}$  FA in a cell culture model in our population of mothers. More work needs to be done to solve this vexed question.

Results were easier to evaluate with KB cultured in 2nMFA medium



### References:

1. Rothenberg S P NEJM 2004 350: p 134-142 Autoantibodies against FR in women with a pregnancy complicated by a neural tube defect
2. Molloy A M NEJM 2009 361 p 152-160 Lack of association between FR Ab and neural-tube defects
3. Antony A A Blood 1992 :79: p2807-2820 The biological chemistry of Folate Receptors
4. Doucette M M J Nutrition 2001: 131 p 2819-2825 FR function is regulated in response to different cellular growth rates in cultured mammalian cells
5. Kamen B A PNAS 1986: 83 p 5983-5987 Receptor mediated folate accumulation is regulated by the cellular folate content
6. Kane M A J Clin Invest 1988 81 p 1398-1406 Influence on immunoreactive FBP of extracellular folate concentration in cultured human cells
7. Antony A A J of Biol Chemistry 1985 260 p 14911-14917 Studies of the role of a particulate FBP in the uptake of 5MTHF by cultured human KB cells
8. Kane M A J of Biol Chemistry 1986 261: p15625-15631 The interrelationship of the soluble and membrane associated FBP in human KB cells

## **Enquête d'éthique clinique sur des cas d'assistance médicale à procréation (AMP) "dérangeants" au plan éthique**

**BERTHIAU Denis** - GH Cochin Saint Vincent de Paul

### **Résumé :**

Le Centre d'éthique clinique (Cec) est une structure d'aide et d'accompagnement à la disposition de ceux, patients comme soignants, qui sont confrontés à une prise de décision médicale « éthiquement » difficile. Dans ce contexte, il a été saisi à plusieurs reprises à propos de demandes d'accès à l'assistance médicale à la procréation (AMP) posant problème au plan éthique aux équipes sollicitées. C'est pourquoi il s'associe aujourd'hui à des équipes médicales d'une part et des associations de patients d'autre part, particulièrement concernées, afin de mener une étude plus approfondie sur le sujet. L'objectif est de bien comprendre comment les couples demandeurs fondent au plan éthique leur demande d'accès à l'AMP quand celle-ci apparaît à première vue « dérangement » et quels sont les arguments qui sous-tendent les décisions médicales prises par les équipes soignantes en réponse à ces demandes ? Il ne s'agit ni de prendre part aux décisions, ni de porter un jugement au plan éthique sur les argumentations des uns ou des autres, mais plutôt de mettre en lumière la dimension éthique de ces argumentations. L'étude consistera en une enquête qualitative prospective, c'est-à-dire en une série d'entretiens menés par un binôme médecin – non médecin selon la méthode d'éthique clinique auprès d'un échantillon de couples demandeurs d'AMP (45 au moins au total) et auprès des équipes qui les reçoivent, alors qu'ils sont dans l'un des trois cas suivants, choisis pour être illustratifs de situations qui peuvent être considérées à première vue comme éthiquement « dérangement » :

1. L'un des membres du couple est âgé (homme âgé de plus de 55 ans et/ou femme âgée de plus de 45 ans)
2. L'un des membres du couple est atteint d'une maladie grave et invalidante (suffisamment pour engager sa qualité de vie ou son pronostic vital à plus ou moins court terme : cancer, SIDA, mucoviscidose, etc.) ou il est porteur d'une maladie génétique grave et transmissible
3. Il y a une demande d'accès à une technique interdite en France, en l'occurrence la gestation pour autrui.

Parallèlement une étude quantitative (non concernée par la demande de subvention) sera menée auprès des 19 centres agréés pour pratiquer l'AMP en France afin de tenter de préciser la proportion que représentent ces situations « dérangement » par rapport à l'ensemble des demandes faites d'accès à l'AMP. Le résultat recherché est de produire une connaissance jamais élaborée sur les fondements éthiques contenus dans une demande d'AMP éthiquement « dérangement ». En miroir, il s'agit de produire cette même connaissance à propos de l'argumentaire éthique propre que développe l'équipe sollicitée qui va accéder ou non à la demande. Il est aussi de tenter de saisir des tendances qui seraient révélatrices de valeurs en changement au plan éthique et mériteraient des investigations plus approfondies. Ce premier matériau d'enquête devrait ainsi pouvoir contribuer à alimenter utilement le débat public autour de ces questions.

### **Publication :**

Fournier V, Berthiau D, d'Haussy J, Bataille P. Access to assisted reproductive technologies in France: the emergence of the patients' voice. *Med Health Care and Philos.* 31 mars 2012;16(1):55-68.



## Quand la demande d'enfant dérange l'éthique: une étude d'éthique clinique.

Denis Berthiau<sup>(1)(2)</sup>, Véronique Fournier<sup>(1)</sup>, Philippe Bataille<sup>(3)</sup>, Julie d'Haussey<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Centre d'éthique clinique, Hôpital Cochin, Paris, France,

<sup>(2)</sup> Faculté de Droit, Université Paris Descartes

<sup>(3)</sup> CADIS, EHESS, Paris

[www.ethique-clinique.com](http://www.ethique-clinique.com)

### Objectifs

- 1- Identifier les arguments des demandeurs et ceux des équipes médicales lorsque la demande d'AMP dérange l'équipe au plan éthique
- 2 - Faire une lecture critique pluri-disciplinaire de ce qui s'exprime alors sur le terrain à ce sujet (médecine, philosophie, droit, sociologie)

### Méthode

Enquête qualitative prospective: mai 2007 - janvier 2009

Entretiens semi directifs en *one-to-one* avec les couples demandeurs d'une part et les soignants d'autre part.

Population étudiée: demandes d'AMP posant problème au plan éthique soit du fait de l'âge, soit du fait de la maladie, soit du fait de la technique sollicitée (Gestation pour autrui) :

**N = 48 couples et 4 femmes seules**

**23 pour âge élevé:** 15 hommes (âge moyen : 66 ans), 8 femmes (âge moyen : 46 ans)

**15 pour maladie grave:** mucoviscidose (6), cancer (6), divers (3)

**14 pour GPA:** Rokitanski (5), impossibilité utérine ancienne de porter un enfant (3); hystérectomie pour éclampsie (5); homosexualité (1)

Méthode d'analyse : thématization séquentielle, "grounded theory"

### Résultats: Les demandeurs:

Résultats très cohérents entre les 3 groupes de l'étude.  
Expriment une grande colère sur l'intrusion dans leur vie privée de la société via la médecine

Réclament le respect de leur autonomie reproductive.

Contestent les 3 arguments fondateurs de la loi:

**L'intérêt de l'enfant:** Se considèrent ses meilleurs garants

**Le non droit à l'enfant :** disent que l'argument est contraire à la finalité même de l'AMP.

**Le respect d'un certain ordre social:** se sentent représentatifs de ce qui fait "norme" aujourd'hui sur le plan social. Pour eux, la famille "idéale" implicitement souhaitée par la loi n'est plus la norme au plan social.

Promeuvent d'autres valeurs qui devraient servir selon eux à repenser les limites de l'accès à l'AMPP: égalité d'accès pour tous, non commercialisation de l'AMP, sécurité sanitaire.

### Résultats: Les soignants

Se distinguent en 2 groupes selon leur interprétation de la loi et de leur rôle en tant que soignants:

**Groupe 1:** la loi leur a confié le rôle de garant de l'accueil d'un enfant dans une "bonne" famille. Ils sont soucieux d'honorer la responsabilité qui leur a été confiée, y compris aux dépens du demandeur.

**Groupe 2:** ils se considèrent davantage au service des couples que de la société: tant que la loi n'interdit pas, ils vont jusqu'au bout de ce qu'ils peuvent faire pour répondre à la demande.

### Discussion

Le tryptique éthique ayant porté les options législatives en matière d'AMP (intérêt de l'enfant, non droit à l'enfant, respect d'un certain ordre social et familial) reste-t-il légitime ?

**Subjectivité :** L'infini des jugements subjectifs et personnels sur ces questions ne doit-il pas inviter à la tolérance plutôt qu'à l'interdit ?

**Rôle de la médecine :** Au coeur des tensions entre intérêt individuel et intérêt collectif, quelle est sa mission première ?

**Autonomie reproductive :** jusqu'où l'Etat doit-il/peut-il restreindre l'autonomie reproductive des citoyens ? Au nom de quels arguments éthiques ?

### Conclusions

#### Conclusions de la lecture critique et pluridisciplinaire:

**Le désir d'enfant apparaît élémentaire et vital.** Ni interrogeable ni contestable, il fait partie de la sphère privée.

Les citoyens devraient avoir le droit à toute l'aide et la **solidarité** possibles de la société.

**La priorité de la médecine: être une médecine du sujet et non de la société.**

Appuyer les politiques publiques sur **les valeurs-socles** qui émergent (refus de l'exploitation des vulnérables, pas de commercialisation, refus des inégalités d'accès, respect des règles de sécurité et de qualité sanitaires)

#### Intérêt de ce type de recherche de terrain :

Mieux comprendre ce qu'ont à dire les demandeurs versus les équipes soignantes sur ce sujet des limites en matière d'AMP

Observer **les valeurs-socles** de la société et leur évolution en regard des cadres normatifs existants

Potentiellement utiles pour revisiter les lois existantes et/ou remettre en cause leur intérêt

### Bibliographie:

Quand la demande d'enfant dérange l'éthique, Ed. Centre d'éthique clinique, Juillet 2011

Access to assisted reproductive technologies in France: the emergence of the patients' voice, Véronique Fournier et al, Med Health Care and Philos, (2013) 16:55-68



## Que vivent les candidats-donneurs de foie lorsqu'ils se proposent comme donneurs?

### Que faut-il en penser?

#### Une étude d'éthique clinique

Véronique Fournier<sup>(1)</sup>, Eirini Rari<sup>(1)</sup>, Nicolas Foureur<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Centre d'éthique clinique, Hôpital Cochin, AP-HP

[www.ethique-clinique.com](http://www.ethique-clinique.com)

#### Objectifs de l'étude:

- Mieux connaître ce que vivent les candidats-donneurs et ce qu'ils pensent au plan éthique de la procédure
- Enrichir la réflexion collective sur les enjeux éthiques de la transplantation hépatique par don vivant (THDV) [1].

#### Méthode:

Etude qualitative rétrospective, menée entre avril 2007 et décembre 2009, sous forme d'entretiens téléphoniques approfondis (30 à 45 mn), conduits par un binôme médecin-psychologue auprès de candidats-donneurs dont le receveur a été greffé depuis au moins un an.

#### Population:

**N = 46**

Donneurs parent/enfant (atrésie des voies biliaires +++)

24 prélevés, 22 non prélevés

19 mères, 27 pères

Âge moyen: 33 ans (25 – 40)

Age moyen de l'enfant à la greffe: 24 mois

3 receveurs décédés dont 1 après don vivant

20 candidats-donneurs faisant partie de la population d'inclusion n'ont pas pu être recontactés: 15 perdus de vue et 5 refus

#### Résultats:

- **85% des enfants greffés vont bien** : décrits comme dynamiques, gais, bien intégrés socialement et à l'école. Les parents disent que le suivi médical post greffe est peu pesant, mais qu'ils craignent la rechute.
- **Les parents prélevés vont bien** : les hommes gardent le souvenir d'une grosse épreuve douloureuse et restent inquiets pour leur foie. Les femmes semblent avoir « tourné la page » plus vite.
- **Grosse épreuve familiale** mais attribuée à la maladie plutôt qu'à la greffe qui est vécue comme une « bénédiction ».
- **Tous témoignent d'une forte solidarité sociale** face à l'épreuve. Aucun des donneurs ne demandent d'indemnité compensatrice : *c'est la moindre des choses de donner, vu tout ce que la médecine et la société font pour notre enfant.*
- **Un grand « enthousiasme éthique » pour THDV** : les candidats plébiscitent la procédure sur le fond comme sur la forme, qu'ils aient été prélevés ou non et quelque soit l'état de santé du receveur. Ils sont fiers d'avoir pu participer activement au processus.
- **Un poids trop lourd donné à la recherche du consentement** : ils dénoncent la lourdeur du processus de recueil de consentement, qu'ils comprennent comme une façon pour la société et les médecins de se décharger de leur responsabilité sur eux en cas d'accident.
- **Une demande forte d'accompagnement** : ils sont nombreux à s'être sentis insuffisamment suivis et accompagnés au plan médical, psychologique et social.

#### Discussion:

- L'étude ne concerne que THDV : attention à ne pas élargir les conclusions à toute activité de transplantation.
- On est rassuré quant au vécu de la procédure THDV pour les candidats-donneurs.
- Mais on est frappé par l'importance (excessive?) que représente le recueil du consentement : comme si c'était la seule chose importante pour la société : vécu comme tel par les candidats-donneurs. Pourtant, la littérature internationale est unanime et dit la même chose que ce que nous avons trouvé dans une étude préalable: le consentement du donneur est un leurre [1].
- La validation éthique de la THDV par les candidats-donneurs ne suffit donc pas à rassurer au plan éthique: ils sont essentiellement préoccupés du receveur et prêts à beaucoup subir pour cela. Ils font alliance avec le chirurgien-transplantateur et leur alliance fait force: elle impose le recours à la THDV, il est difficile de la contester, il n'y a plus qu'à suivre,
- L'éthique ne consiste-t-elle pas alors à maximiser l'accompagnement sous toutes ses formes plutôt qu'à trop s'appesantir sur la seule recueil du consentement?.
- Le consentement du receveur est souvent négligé, comme si celui-ci ne pouvait qu'être content qu'on veuille le sauver à tout prix, y compris avec un greffon venu d'un donneur proche.

#### Conclusions:

La procédure gagnerait probablement au plan éthique à moins se focaliser sur la recherche d'un consentement libre et éclairé du donneur que sur une maximisation de son accompagnement au plan médical, psychologique et social.

Malgré ce qui peut être considéré comme un plébiscite de la procédure THDV par les candidats-donneurs, il convient de ne pas perdre de vue certaines limites éthiques :

- Les limites des équipes, au nom de leur intégrité professionnelle : leur tolérance à l'accident-donneur est moindre que celle des candidats au don, voire celle de la population générale [1].
- La place du receveur dans le processus décisionnel : et en particulier: peut-on et comment aborder cette question pour les receveurs-enfants? [2]

Ces études qualitatives, permettent de récupérer des éléments de terrain et sont utiles pour évaluer et/ou repenser les cadres normatifs (et législatifs) existants.

#### Bibliographie:

- [1] : Fournier V et al. "Consent by living donors: an ethics alibi?". *Bioethics Forum*. 2008; vol 1; No2 : 115-120
- [2] : Fournier V et al. "The ethics of living donation for liver transplant: Beyond donor autonomy". *Med Health Care Philos*. 2013 Feb;16(1):45-54.

#### Remerciements:

Cette étude a été menée dans le cadre d'une collaboration avec le département d'hépatologie pédiatrique de l'hôpital Bicêtre et le service de chirurgie digestive adulte de l'hôpital Cochin (transféré depuis à Saint Antoine). Elle a été co-financée par l'ABM.

## **Amélioration des procédures de diagnostic prénatal des maladies génétiques résultant de mutations de l'ADN mitochondrial**

**BONNEFONT Jean-Paul** - Hop NECKER

### **Résumé :**

La chaîne respiratoire mitochondriale est constituée de 5 complexes enzymatiques dont certaines sous-unités sont codées par l'ADN mitochondrial (ADNmt). Les maladies résultant d'une mutation de l'ADNmt (syndromes « NARP », « MELAS », « MERRF »...) revêtent une grande hétérogénéité clinique, liée à la coexistence de molécules d'ADNmt normales et mutées en proportion variable dans les différents tissus, cellules, mitochondries d'un individu (hétéroplasmie). Il s'agit d'affections graves, avec atteinte cérébrale fréquente, risque élevé de transmission à la descendance des femmes « mutées » (héritéité « maternelle »), et sans traitement efficace à ce jour. De ce fait, les couples à risque sollicitent fréquemment une procédure de diagnostic préimplantatoire (DPI) ou de diagnostic prénatal (DPN). Du fait du recrutement important de telles familles à Necker, nous avons pu réaliser 3 DPI de ces affections, les seuls rapportés à ce jour. Cependant, la lourdeur et le faible taux de succès de cette procédure amènent les couples à se diriger vers le DPN. Le DPN de ces affections est techniquement délicat, repose sur une évaluation du taux d'hétéroplasmie sur plusieurs tissus fœtaux à plusieurs termes de la grossesse, et la valeur prédictive d'un taux d'hétéroplasmie prénatal vis-à-vis du phénotype postnatal demeure incertaine. De ce fait, nous sommes à notre connaissance le seul groupe susceptible de proposer un DPN de ces affections. L'objectif de ce projet est d'améliorer la fiabilité et simplifier la procédure de DPN chez les femmes portant une mutation de l'ADNmt. Nous avons entrepris, après recueil du consentement parental, de collecter des prélèvements maternels (cellules lymphocytaires, du tractus urinaire, buccales, follicules pileux, peau), fœtaux dans le cadre d'actes de DPN [placenta (10-12 SA), amniocytes (14-16 SA et 24-26 SA, sang de cordon et placenta dans sa totalité à la naissance), et des tissus fœtaux (*cerveau, cœur, muscle, foie, reins, pancréas, ovaires* à 14-22 SA) recupérés lors d'IMG en cas de DPN « défavorable », et ce pour diverses mutation de l'ADNmt (NARP, MELAS, mutation ND3). Après recueil du consentement des parents à l'étude de leur ADN, de celui des enfants à naître ou des fœtus après IMG, nous nous proposons : 1/ d'améliorer la précision de notre mode de mesure du taux d'hétéroplasmie (passage d'une approche PCR-restriction à une approche PCR en temps réel) ;

2/ d'établir, pour différentes mutations de l'ADNmt, si le taux d'hétéroplasmie :

a/ mesuré sur prélèvement unique de trophoblaste est un reflet fidèle de celui du placenta dans sa globalité      b/ est stable i) à différents termes de la grossesse ii) dans les différents tissus fœtaux analysés (tissus et cellules uniques de trophoblaste, amniocytes, et autres tissus), ce qui est suggéré par nos données préliminaires

c/ mesuré en période prénatale est un bon outil prédictif de l'état clinique postnatal (suivi clinique prolongé et à intervalle régulier des enfants nés après DPN)

3/ d'établir pour différentes mutations de l'ADNmt,

a/ l'existence éventuelle de lésions neurodégénératives apoptotiques dans le cerveau de fœtus ayant fait l'objet d'une IMG (suggérée par nos données préliminaires)

b/ la relation éventuelle entre l'intensité de ces lésions et le taux d'hétéroplasmie dans le cerveau fœtal.

Il s'agit d'un projet avec bénéfice direct, dans la mesure où les familles impliquées bénéficieront de l'amélioration des procédures de DPN générée par ce travail, lors d'une grossesse ultérieure.

### **Publication :**

Monnot S, Gigarel N, Samuels DC, Bulet P, Hesters L, Frydman N, et al. Segregation of mtDNA throughout human embryofetal development: m.3243A>G as a model system. Human Mutation. janv 2011;32(1):116-25.



## **Diagnostic anténatal des remaniements chromosomiques par CGH array utilisant l'ADN fœtal libre circulant dans le liquide amniotique**

**BOURROUILLOU Georges - CHU TOULOUSE**

### **Résumé :**

Ce projet consiste en l'utilisation d'un nouveau matériel, l'ADN fœtal libre issu de surnageant de liquide amniotique, pour l'hybridation sur CGH array bien connue dans le domaine du diagnostic post natal, afin de l'appliquer au diagnostic anténatal pour la recherche de perte ou de gain de matériel chromosomique. Cette étude comporte deux parties :

- Une partie qui définit un protocole d'extraction et d'obtention de cffDNA utilisable en CGH array. 2 équipes dans la littérature, Miura et al et Lapaire et al ont déjà décrit cette méthode et utilisé ce substrat pour l'hybridation sur puces à ADN. Le but ici est d'optimiser ces résultats pour définir un protocole reproductible d'obtention d'un matériel utilisable en pratique hospitalière courante. Nous nous proposons ensuite de tester 40 cffDNA issus de LA, 20 normaux et 20 anormaux dont les caryotypes auront préalablement été déterminés, ( analyse rétrospective) sur les puces de CGH array Cytochip\* Blue Gnome\* déjà utilisées dans le laboratoire. L'utilisation de ce type d'ADN présente un grand intérêt clinique, puisque contrairement au caryotype, méthode de référence, il ne nécessite pas de mise en culture et permet donc l'obtention de résultats beaucoup plus rapides (de 3 semaines à 3 jours). De plus par cette absence de culture, le risque de sélection de clones maternels est très faible. Elle possède en outre un pouvoir de résolution théorique supérieur à la FISH interphasique, et évite la restriction de la recherche à des remaniements connus ou fréquents.

- Une deuxième partie permettra la caractérisation des performances de la CGH array en prénatal, qui elle-même peut se diviser en 2 parties :

a) une évaluation de la sensibilité de la méthode, c'est-à-dire la capacité de cette méthode à dire que le résultat est anormal quand il existe effectivement une anomalie, par les tests en CGH array. 20 liquides amniotiques seront analysés. Ils seront issus de fœtus porteurs d'une anomalie chromosomique reconnue par la technique de référence, et recrutés selon les critères médico-légaux habituels amenant à un diagnostic anténatal. Une confrontation des résultats obtenus par le caryotype et la CGH array sera réalisée

b) une évaluation de la spécificité de la méthode, c'est-à-dire la capacité qu'a ce test de dire que le résultat est normal quand il n'existe pas d'anomalie. 20 LA analysés en CGH array alors qu'aucune anomalie n'a été retrouvée selon les méthodes standards que sont le caryotype et la FISH seront testés. La possibilité de faux positifs (résultats anormaux donnés par la CGH array alors qu'ils n'existent pas) sera évaluée par la vérification systématique de toute anomalie en FISH, par l'utilisation des BACs décrits comme anormaux utilisés comme sonde en FISH.

Au total nous nous proposons donc de réaliser une étude préliminaire visant à établir un protocole d'utilisation de cffDNA utilisable en CGH array et d'évaluer cette méthode d'analyse au cours de diagnostics anténatals. Cette étude préliminaire ouvrira les portes à une deuxième étude prospective, visant à prouver la reproductibilité de la technique, et de mieux définir les critères d'analyse.

## **Extension d'une plate-forme informatique sécurisée pour la gestion du contrôle de qualité externe rétrospectif et prospectif en cytogénétique (EPICQE)**

**DOCO-FENZY Martine** - Association des Cytogénéticiens de Langue Française

### **Résumé :**

Le but de ce projet est de consolider et de compléter l'outil sécurisé permettant aux cytogénéticiens Français de réaliser leur contrôle de qualité externe (CQE) dans les meilleures conditions de confidentialité. Le CQE en cytogénétique s'est développé en France depuis 2005 à l'initiative du GFCH (Groupe Français de Cytogénétique Hématologique) et de l'ACLF (Association des Cytogénéticiens de Langue Française). La principale difficulté est liée à la gestion d'un grand nombre d'images à expertiser du fait du grand nombre de laboratoires. Grâce au support du projet PEGH 2006 par l'Agence de Biomédecine, une plate-forme informatique a été mise en place pour le CQE rétrospectif, constitutionnel (pré et post-natal). Cette plate-forme informatique permet aujourd'hui une gestion des dossiers rapide, fiable, et sécurisée. Elle permet de faire l'économie d'une personne pour la réception et l'anonymisation des dossiers et d'un local pour leur stockage. Il s'agit d'un support technique indispensable pour le succès du CQE en ligne, testé en 2007. Nous souhaitons créer une base de données supplémentaire pour développer un contrôle de qualité prospectif, pour les trois secteurs cytogénétiques : constitutionnel (pré et post-natal), et onco-hématologique ainsi que pour les techniques de cytogénétique moléculaire comme l'Hybridation *In Situ* en Fluorescence (FISH). Le CQE prospectif complémentaire du rétrospectif permettra aux différents laboratoires de cytogénétique français d'analyser les mêmes images des mitoses proposées sur le site web. Ils répondront en ligne au sein d'un questionnaire par transfert de fichiers texte, et d'images de mitoses classées. Les experts examinateurs consulteront les dossiers après anonymisation et transmettront leurs évaluations sur la même base de données commune. Les évaluations seront comparées au sein d'un même groupe d'experts, puis entre tous les groupes afin d'harmoniser les résultats. Les résultats seront mis à disposition directement sur la base de données en ligne. Le but est donc de créer un réseau où tous les cytogénéticiens interviendront en tant qu'évalués mais aussi à leur tour en tant qu'experts de ce contrôle. Il en découlera la formation des praticiens avec l'homogénéisation et l'amélioration de la pratique de la cytogénétique comme l'a montré la première phase du contrôle rétrospectif en ligne. Ce système pourra être adapté à la fois à la cytogénétique constitutionnelle pré et post natale, à la cytogénétique hématologique et à la cytogénétique des tumeurs solides. Il pourra s'étendre dans l'avenir aux techniques innovantes telles que la CGH-array.

## **Elaboration d'un indicateur de qualité des images d'échographie fœtale au deuxième trimestre de la grossesse. Impact sur les pratiques**

**DOMMERMUES Marc** - AP-HP GH Pitié-Salpêtrière

### **Résumé :**

Etat de la question. Du fait du caractère dynamique de l'échographie fœtale, l'interprétation des images se fait en temps réel. Il n'est pas possible d'améliorer les performances du dépistage par une double lecture de chaque examen visant à repérer des anomalies. En revanche, la production de clichés échographiques standardisés conforme à des schémas de référence serait une voie pour améliorer le dépistage des malformations fœtales. **Objectifs.** (1) Elaborer un indicateur appréciant la conformité des clichés échographiques au schéma du référentiel du Comité National Technique de l'Echographie de Dépistage Prénatal pour l'échographie du deuxième trimestre de la grossesse. (2) Etudier l'impact sur les pratiques professionnelles de la restitution aux praticiens des scores de conformité de leurs clichés. **Méthode.** (1) Une grille de lecture aboutissant à un score de cotation sera établie empiriquement pour chacun des 9 clichés recommandés, par consensus entre les investigateurs. Une gamme de clichés sera cotée par 3 échographistes-cotateurs. La faisabilité sera évaluée notamment par le pourcentage d'items non cotés, la reproductibilité intra coteur et inter cotateurs. On sélectionnera ainsi les critères les plus pertinents pour l'élaboration d'un score de conformité au référentiel. La grille de lecture sera modifiée pour optimiser la concordance, puis testée sur une gamme de cliché par des cotateurs n'ayant pas participé à sa mise au point. (2) Grâce à l'outil de cotation des images mis au point, une évaluation des pratiques sera effectuée à trois niveaux : réseau inter hospitalier de l'Est parisien, territoire de santé 75-2 (12000 naissances), évaluation ouverte sans base géographique via internet. L'impact de la restitution aux professionnels des scores de conformité de leurs clichés sera évalué. La moitié des échographistes, tirés au sort, recevront les résultats de leur cotation, l'autre moitié ne recevant pas leurs résultats. Une deuxième évaluation des clichés sera alors réalisée. **Résultats attendus :** (1) Disposer d'une grille de lecture permettant une cotation fidèle des clichés d'échographie de dépistage du deuxième trimestre. (2) Montrer une amélioration des scores de conformité chez les échographistes ayant reçu les résultats de l'évaluation de leurs clichés, contrairement aux échographistes n'ayant pas reçu ces résultats. **Perspectives :** Contribuer à améliorer la conformité au référentiel des clichés d'échographie de dépistage du deuxième trimestre de la grossesse par la mise au point d'un outil d'évaluation fiable, dans la perspective d'augmenter la performance du dépistage échographique des anomalies fœtales au deuxième trimestre de la grossesse.

### **Publication :**

Jaudi S, Tezenas Du Montcel S, Fries N, Nizard J, Halley Desfontaines V, Dommergues M. Online evaluation of fetal second-trimester four-chamber view images: a comparison of six evaluation methods. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. août 2011;38(2):185-90.

## **Evaluation du risque de pathologies liées à l'empreinte parentale après Assistance Médicale à Procréation (AMP)**

**LE BOUC Yves** - Hôpital Armand TROUSSEAU

### **Résumé :**

**Objectifs et résultats attendus** : L'empreinte parentale concerne différentes régions autosomiques et joue un rôle majeur dans le développement et la croissance du fœtus. Deux étapes sont importantes pour sa mise en place : la gamétogénèse (apposition) et la période suivant la fécondation (maintenance). Sur le plan moléculaire, les marques d'empreinte parentale sont des modifications épigénétiques du génome, parmi lesquelles la méthylation différentielle des deux allèles parentaux est un élément clé. Des pathologies bien caractérisées comme les syndromes de Wiedemann-Beckwith (SWB), de Willi-Prader ou d'Angelman (SA) sont en rapport avec des anomalies génétiques ou épigénétiques de régions soumises à empreinte parentale (régions 11p15 et 15q11). Récemment, l'AMP a été incriminée dans des pathologies en rapport avec des anomalies épigénétiques de régions soumises à empreinte parentale chez l'animal (Large Offspring syndrome) et chez l'homme (SWB et SA), notamment par notre équipe. Dans ces trois modèles, l'anomalie mise en évidence est un défaut de méthylation d'un locus maternel normalement méthylé entraînant une dérégulation de l'expression des gènes situés à proximité. Les procédures d'AMP pourraient donc empêcher l'apposition ou le maintien des marques d'empreintes maternelles. **L'objectif principal** de ce projet est de déterminer si l'AMP comporte un risque accru d'anomalie épigénétique dans les régions soumises à empreinte. Si la réponse à cette première question est positive (résultat attendu), l'objectif est de pouvoir préciser si certaines procédures d'AMP sont spécifiquement associées à ce risque et donc de les supprimer ou de les modifier. Ce projet permettra aussi de constituer une banque d'ADN, ARN et de tissu (placenta) pour analyse ultérieure d'autres modifications épigénétiques non seulement au niveau des loci soumis à empreinte mais au niveau d'autres régions génomiques soumises à une régulation épigénétique. Ce projet est déjà soutenu en partie par un PHRC national (P040440) et a reçu l'avis favorable du CPP de Cochin. Les crédits supplémentaires permettront d'une part d'augmenter le nombre de régions génomiques analysées, le type de modifications épigénétiques (acétylation, méthylation des histones...), le nombre de sites impliqués dans le recrutement et le temps de techniciens de recherche clinique (TEC) pour assurer la qualité du recueil des données.

### **Publication :**

Le Bouc Y, Rossignol S, Azzi S, Steunou V, Netchine I, Gicquel C. Epigenetics, genomic imprinting and assisted reproductive technology. *Annales d'Endocrinologie*. 1 mai 2010;71(3):237-8.

## **La maturation *in vitro* des ovocytes frais ou cryopréservés : aspect épigénétique, analyse de la méthylation de l'ADN et du profil d'acétylation des histones**

**LEFEVRE Annick – INSERM**

### **Résumé :**

Pour augmenter le nombre d'ovocytes mûrs, les protocoles standards de Fécondation In Vitro (FIV) font appel à une stimulation ovarienne par des doses élevées de gonadotrophines avec le risque pour certaines patientes (1 à 3%) de développer un syndrome sévère d'hyperstimulation ovarienne. Par ailleurs certaines femmes ne répondent pas aux protocoles de stimulation. Dans ces cas, le développement d'un procédé fiable de maturation *in vitro* d'ovocytes prélevés immatures est une alternative très attractive aux traitements actuels mis en œuvre dans les centres d'AMP. Par ailleurs, depuis les avancées considérables dans le traitement des cancers, en particulier chez l'enfant, et l'amélioration de la survie des patients, la prise en compte des effets secondaires à long terme devient une nécessité. Or, les effets sur la fertilité sont connus, même pour les enfants. La restauration d'un potentiel de vie procréative devient alors une question à laquelle il faut tenter d'apporter des solutions. La vitrification d'ovocytes immatures, susceptibles après décongélation d'être mûris *in vitro* (MIV) puis fécondés par ICSI (intracytoplasmic Sperm Injection) constitue une alternative prometteuse à la greffe d'ovaire cryopréservé, particulièrement dans le cas où une récurrence est à craindre. Or, des informations récentes suggèrent que des pathologies liées à des anomalies de l'empreinte parentale sont plus fréquentes chez les enfants nés *via* l'AMP comparés à la population générale. L'ovogenèse est le siège d'importantes modifications épigénétiques qui permettent à l'ovocyte d'acquies sa capacité fécondante et développementale, ainsi qu'une « information maternelle » transmissible au zygote. Que ce soit la culture *in vitro* dans le cas de la MIV, ou l'emploi de cryoprotecteurs dans le cas de la cryopréservation, l'environnement de l'ovocyte est modifié pendant une période où son épigénome est reprogrammé. Le but de ce projet est, afin d'apprécier le degré de sécurité offert par ces nouvelles technologies, d'évaluer leur impact au niveau de l'épigénome ovocytaire dans le modèle ovin dans un premier puis chez la femme. Nous proposons de :

- développer un modèle de maturation *in vitro* de l'ovocyte ovin
- développer un procédé de vitrification pour cryoconserver les ovocytes ovins au stade VG
- évaluer l'impact de différents facteurs, stimulation hormonale, culture *in vitro*, cryoprotecteurs, sur l'épigénome des ovocytes après MIV en analysant 1- la méthylation différentielle de gènes soumis à empreinte parentale (Igf2r, KCNQ1OT1, H19, Peg1/Mest), par la technique de mutagenèse de l'ADN par le bisulfite de sodium 2- le profil global d'acétylation des histones par immunofluorescence, dans les ovocytes prélevés à différents stades de leur différenciation.
- déterminer les conditions d'application à l'ovocyte humain des procédés évalués chez l'ovine.

### **Publication :**

Al-Khtib M, Perret A, Khoueiry R, Ibalá-Romdhane S, Blachère T, Greze C, et al. Vitrification at the germinal vesicle stage does not affect the methylation profile of H19 and KCNQ1OT1 imprinting centers in human oocytes subsequently matured *in vitro*. *Fertility and Sterility*. mai 2011;95(6):1955-60.

## **Etude des micro-remaniements chromosomiques chez des fœtus polymalformés par CGH-array sur ADN fœtal libre du surnageant de liquide amniotique**

**LEPORRIER Nathalie - CHU CAEN**

### **« » Résumé :**

En diagnostic prénatal un caryotype fœtal pratiqué en raison d'un signe d'appel échographique décèle 12,8% d'anomalies chromosomiques. Ce taux est sous estimé car le caryotype standard ne décèle pas les micro-remaniements responsables d'une partie des syndromes malformatifs. L'application de la CGH (comparative genomic hybridization) sur une puce (array) décrite par Solinas Toldo en 1997 paraît la plus appropriée des techniques pour les mettre en évidence. Elle est utilisée actuellement en cytogénétique clinique, notamment pour identifier la localisation et la taille de réarrangements subtélomériques et sub-microscopiques chez des sujets avec retards mentaux idiopathiques, mais peu encore en prénatal car elle doit être interprétée avec prudence. Elle nécessite une validation par une autre technique, FISH ou QMPSF (quantitative multiplex PCR of short fluorescent) ce qui en prénatal rallonge encore le délai de réponse surtout si elle est pratiquée sur l'ADN extrait de cellules cultivées. Appliquer la CGH-array sur l'ADN des cellules cultivées de liquide amniotique dont le caryotype est normal améliorerait la détection d'anomalies chromosomiques déséquilibrées en décelant les anomalies sub-microscopiques mais la faisabilité de cette procédure est souvent incompatible avec le délai requis pour un diagnostic anténatal. Très récemment, Lapaire en 2007 a montré qu'il est possible d'identifier les anomalies chromosomiques sur de l'ADN fœtal libre par CGH-array à partir d'un volume de 10 ml de surnageant de liquide amniotique frais ou congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ce procédé se prête donc à la détection d'anomalies chromosomiques sans dépendre d'une culture de cellules. Il est donc particulièrement bien approprié au diagnostic prénatal du fait du gain de temps qu'il permet. En outre, si elle est validée dans la mise en évidence de micro-remaniements dans les syndromes polymalformatifs, cela permettrait de faire des recherches d'anomalies chromosomiques sur des liquides amniotiques du troisième trimestre de grossesse, quand la culture n'est plus réalisable. Le premier objectif de notre travail est de confirmer que la CGH-array utilisée en complément de la cytogénétique classique sur des fœtus polymalformés augmente le taux de détection des anomalies de 10% et de tenter d'évaluer la responsabilité de ces anomalies dans la genèse des malformations en confrontant l'ADN fœtal aux ADN parentaux. Ce travail sera réalisé à partir de 45 ADN issus d'amniocytes congelés remis en culture, provenant de grossesses avec un fœtus polymalformé et un caryotype normal. Ces ADN sont actuellement étudiés par la technique MLPA dans le cadre d'un appel d'offre interne. Le second objectif est d'appliquer la technique CGH-array sur de l'ADN fœtal libre du surnageant du liquide amniotique afin d'identifier plus rapidement, sans attendre la culture cellulaire, les micro-remaniements dans le cadre de syndromes malformatifs décelés par échographie. Cette étude sera réalisée avec les deux ADN, fœtal libre et cellulaire, du même liquide amniotique correspondant à 30 grossesses avec fœtus polymalformé et caryotype normal. Par ailleurs, l'ADN cellulaire et fœtal libre (surnageant congelé à  $-80^{\circ}$ ) de toutes les anomalies chromosomiques retrouvées après caryotype, seront testés sur les puces. Ceci permettra de valider la technique CGHarray pour les anomalies habituelles.

### **Publication :**

Gruchy N, Decamp M, Richard N, Jeanne-Pasquier C, Benoist G, Mittre H, et al. Array CGH analysis in high-risk pregnancies: comparing DNA from cultured cells and cell-free fetal DNA: Array-CGH in prenatal diagnosis using cell free fetal DNA. *Prenatal Diagnosis*. avr 2012;32(4):383-8.



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

## CGH-array sur l'ADN foetal libre du surnageant de liquide amniotique

Nathalie Leporrier, Nicolas Gruchy Service de génétique-CHU Caen

### Introduction

L'hybridation génomique comparative sur puces à ADN (CGH-array) est une nouvelle technique de cytogénétique de résolution plus élevée que celle du caryotype classique. Elle permet de détecter des modifications cryptiques identifiées comme des variations de nombre de copies (CNVs).

En diagnostic prénatal, elle est appliquée majoritairement sur l'ADN extrait des cellules cultivées du liquide amniotique (LA). L'avantage de l'utiliser sur l'ADN foetal libre (Cff) du surnageant de LA est de réduire les délais de réponse puisqu'elle épargne le temps de culture.

### Objectif

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la faisabilité de la technique de CGH-array sur l'ADN foetal libre du surnageant de LA congelé en comparant les résultats obtenus à ceux de la CGH-array sur l'ADN des cellules du LA cultivées.

### Méthodologie

Quarante-huit cas de grossesses ont été sélectionnées du fait d'un risque élevé d'anomalie chromosomique :

- retard de croissance intra-utérin (RCIU),
- et/ou au moins 2 malformations.

Sur ces 48 cas, 10 avec anomalie au caryotype ont été exclus de l'étude.

	> 1 malformation	RCIU ± malformations	total
Nombre de cas	32	16	48
Anomalies du caryotype	9 (28%)	1 (6%)	10 (21%)

38 échantillons d'ADN, ADN foetal libre du surnageant (Cff) congelé du LA et ADN des cellules cultivées ont été analysés sur une puce BlueGnome® (puces de chromosomes artificiels de bactéries (BACs)).

Les résultats des CGH-array sur ces deux sources d'ADN ont été comparés.

### Conclusion

Cette étude comparative démontre la faisabilité de la technique CGH-array (sur puces type BACs) à partir de l'ADN foetal libre du surnageant de liquide amniotique. On obtient une hybridation plus homogène et une meilleure qualité des profils.

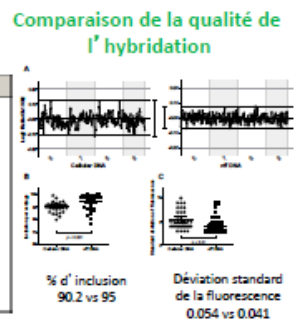
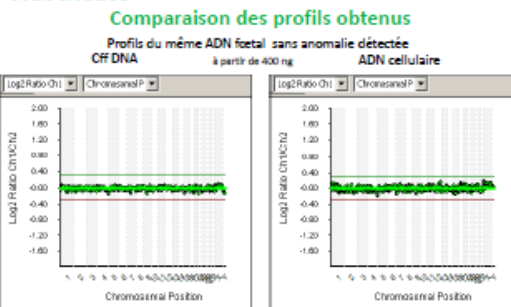
L'intérêt d'utiliser l'ADN foetal libre réside dans la rapidité du résultat qui s'abstrait de la culture de cellules et la recherche éventuelle d'anomalies chromosomiques lorsque le caryotype nécessitant une culture cellulaire n'est plus possible, notamment en raison d'un terme trop avancé de la grossesse.

### Méthodologie



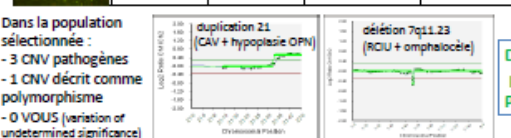
Cff DNA	ADN cellulaire	Vérification de la qualité de l'ADN
Après congélation (1-162j) (moyenne 2 mois)	Pas de congélation	1. Spectromètre Nanovue® ratio 260/280: pas significativement différent
Kit Qiagen® QIA Amp DNA Blood Maxi incluant traitement par protéase	Kit nucleon Bacc 2 Amersham® Traitement protéinase K	2. migration sur gel
Concentration et purification dans colonne microcon PCR jusqu'à un volume de 20-30 µl	Pas de concentration	
Pas d'amplification	Pas d'amplification	
Quantité moyenne d'ADN obtenu : 6 µg (0.4-26 µg)	Quantité moyenne d'ADN obtenu : 13 µg (4-22 µg)	Electrophorèse des 2 types d'ADN

### Résultats



Résultats CGH-array

	> 1 malformation	RCIU ± malformations	total
Nombre de cas	32	16	48
Anomalies du caryotype	9 (28%)	1 (6%)	10 (21%)
Sélection CGH	23	15	38
Anomalies CGH	1 (4%)	2 (13%)	3 (8%)



Hybridation de l'ADN foetal libre de meilleure qualité

- + déviation standard de la fluorescence plus faible
- + pourcentage d'inclusion plus grand

Détection de 8% d'anomalies en plus du caryotype conventionnel

Plus importante en cas de RCIU (13%)

## **Génotypage plaquettaire fœtal : Diagnostic prénatal non invasif sur sang maternel**

**LEVY-MOZZICONACCI – APMH**

### **Résumé :**

La thrombopénie néonatale par allo-immunisation foetomaternelle (TNAF) est liée à une immunisation maternelle contre les plaquettes fœtales portant des antigènes d'origine paternelle non présents chez la mère. L'incidence de cette pathologie est d'environ 1 sur 800 à 1000 naissances. Les formes les plus graves s'associent à un risque majeur d'hémorragie cérébrale (20% à 25% des cas) pouvant entraîner le décès de l'enfant (15%) ou laisser des séquelles neurologiques graves (15 à 30%). Cette pathologie peut se manifester dès la 20ème semaine de grossesse par la découverte d'une dilatation ventriculaire cérébrale majeure voire d'une porencéphalie à l'échographie reflet d'une hémorragie cérébrale. Les alloanticorps responsables de l'atteinte fœtale sont dirigés contre les alloantigènes plaquettaires : ce sont les antigènes des systèmes HPA (human platelet antigen). Les corrélations génotype-phénotype ont été réalisées pour 22 des 24 alloantigènes et montrent que le polymorphisme antigénique résulte de la substitution d'une base au niveau du gène codant pour la glycoprotéine ce qui correspond à la présence d'un SNP (single-nucleotide polymorphism) au niveau de la séquence du gène. Nous nous proposons de développer le diagnostic non invasif du génotypage plaquettaire fœtal (HPA-1, HPA-3 et HPA-5) à partir du sang maternel. En effet, la seule approche actuelle pour identifier le génotypage plaquettaire fœtal nécessite un geste invasif inutile depuis le développement de l'analyse de l'ADN fœtal dans le sang maternel. Pour cela, différentes étapes sont envisagées : Dessin (« design ») des outils moléculaires de sondes LNA utilisables en PCR quantitative en temps réel, création de gammes plasmidiques d'étalonnage incluant le SNP d'intérêt permettant de tester les outils dans un contexte de chimérisme, analyse des plasmas maternels de patientes présentant un risque prouvé ou suspecté d'allo-immunisation plaquettaire fœto-maternelle, La collaboration étroite avec le centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal (CPDPN) de l'Hôpital Nord et l'EFS PACA permettra le recrutement et l'analyse phénotypique et moléculaire des patientes enceintes. Environ 60 patientes seront recrutées pour ce projet

## **Etude rétrospective par CGHarray de 50 cas de clarté nucale $\geq 4$ mm ou d'hygroma kystique du 1er trimestre à caryotype normal**

**LUCAS Josette - CHU RENNES**

### **Résumé :**

La mesure de la clarté nucale à l'échographie de 12 SA représente un outil majeur de diagnostic cytogénétique prénatale. Une anomalie chromosomique est présente dans plus de 50% des hygromas kystiques. Dans l'autre moitié des cas, l'analyse cytogénétique conventionnelle (caryotype) et en hybridation in situ en fluo (fISH) n'indique pas la présence d'une anomalie. Or ce groupe de patients représente une population à risque élevé d'anomalie chromosomique submicroscopique accessible à la méthode des puces à ADN. Cette fréquence peut être estimée entre 10 et 15% compte tenu de l'importance du nombre des anomalies détectées et du taux d'issues défavorables, même si le caryotype est normal. Notre objectif est d'analyser rétrospectivement 50 cas d'hyperclarté nucale avec caryotype normal, sur 24 mois, en étudiant l'ADN de fœtus sur puce oligonucléotidique 4x44K Agilent, afin d'évaluer le pourcentage de cas pour lesquels un déséquilibre submicroscopique peut être mis en évidence. Ces informations seront utiles pour informer les couples confrontés durant une grossesse à un problème de clarté nucale augmentée ainsi que pour le conseil génétique lors des grossesses ultérieures.

## **Préservation de la fertilité à l'adolescence dans les troubles de la spermatogenèse : étude prospective**

**PLOTTON Ingrid - CHU LYON**

### **Résumé :**

L'objectif est de développer des mesures d'épargne de la fertilité dans les dysgénésies testiculaires diagnostiquées en pédiatrie et aboutissant à une stérilité par trouble de spermatogenèse à l'âge adulte. Certaines observations suggèrent que la spermatogenèse se mettrait en place, au moins partiellement, à la puberté, puis régresserait avant l'âge adulte. Ceci laisse l'espoir de pouvoir disposer de quelques spermatozoïdes si on les recherche au bon moment, entre la mise en place de la spermatogenèse et sa régression. Ces spermatozoïdes pourront être cryoconservés en vue d'une microinjection intraovocytaire lorsque le patient aura un désir de paternité. On ne sait actuellement reconnaître ni les cas ni le moment du développement pour lesquels des spermatozoïdes seront disponibles. Notre projet consiste à recruter des adolescents (15-18 ans) suivis en pédiatrie pour une dysgénésie testiculaire, soit dans le cadre du syndrome de Klinefelter (47XXY) situation fréquente et homogène soit dans d'autres dysgénésies testiculaires repérées en raison d'antécédents de cryptorchidie bilatérale ou d'ambiguïté sexuelle ou encore d'anomalie gonosomique au caryotype. Après estimation de leur maturité pour la réalisation de spermogrammes par la psychologue du CECOS de Lyon, 3 spermogrammes espacés sur la période de la mise en place de la spermatogenèse (18 mois) seront réalisés avec cryoconservation des spermatozoïdes si possible. En cas d'azoospermie, le patient sera inclus dans une étude comparant le pourcentage de cas où la biopsie testiculaire permet d'isoler des spermatozoïdes, chez les adolescents versus chez les adultes, présentant la même pathologie constitutionnelle induisant un trouble de la spermatogenèse, mais pris en charge en médecine de la reproduction pour infertilité. En cas de présence de spermatozoïdes, ceux-ci seront cryoconservés. Notre protocole permettra :

- 1) la comparaison du pourcentage de biopsie permettant la cryoconservation de spermatozoïdes entre les 2 groupes de patients azoospermiques par dysgénésie testiculaire, « adolescents » versus « adultes ». Les comparaisons seront stratifiées sur les sous-groupes « Klinefelter » et « Autres dysgénésies testiculaires »,
- 2) la recherche de facteurs pronostiques de la présence de spermatozoïdes dans la biopsie testiculaire, les marqueurs des fonctions testiculaires (volume et situation des testicules, FSH, Inhibine B, AMH, LH, Testostérone, Testostérone biodisponible, SHBG, Estradiol) seront comparés chez les sujets azoospermiques ayant des biopsies « avec » versus « sans » spermatozoïdes testiculaires, dans les groupes « adolescents » et « adultes »
- 3) la recherche de facteurs pronostics de la possibilité de réalisation de spermogrammes et des résultats des spermogrammes lors de la phase de préinclusion chez les adolescents
- 4) la recherche de marqueurs précoces prédictifs de la présence ou non de spermatozoïdes dans le sperme ou dans les biopsies testiculaires dans les données rétrospectives des dossiers du suivi pédiatrique.
- 5) L'étude du transcriptome des cellules de Sertoli des biopsies des azoospermies pour comprendre la physiopathologie des troubles de la spermatogenèse et envisager des mesures thérapeutiques s'appuyant sur la correction des dysfonctions sertoliennes.

### **Publication :**

Plotton I, Brosse A, Lejeune H. [Is it useful to modify the care of Klinefelter's syndrome to improve the chances of paternity?]. Ann Endocrinol (Paris). déc 2010;71(6):494-504.

## **Greffe d'ovaire non pubère chez la brebis : étude de l'induction de la puberté, fertilité et risque épigénétique dans la descendance**

**SAUVAT Frédérique -INSERM**

### **Résumé :**

Le but de ce projet est l'étude des possibilités de restauration de la fonction ovarienne après cryoconservation de cortex ovariens prélevés avant la puberté (définissant la notion de cortex immature), chez la brebis. En particulier, cette étude porte sur la possibilité d'instauration d'une puberté spontanée après greffe chez l'animal non-pubère, la restauration d'une activité hormonale cyclique et la possibilité de restauration de la fertilité. Le deuxième volet de ce projet est l'évaluation d'anomalies épigénétiques dans la descendance, liées à une anomalie de la mise en place de l'empreinte parentale au cours de cette technique (manipulation des ovaires, cryoconservation et réimplantation...). Chez la brebis adulte, les techniques de cryoconservation ainsi que les possibilités de gestation ont déjà été rapportées. A l'inverse, aucune publication ne fait état du devenir de cortex ovarien cryoconservé avant la puberté. Cette étude chez la brebis est réalisée parallèlement à une étude similaire dans un modèle murin. Ce projet a débuté en 2006 et a permis la mise au point du modèle chirurgical (prélèvement puis réimplantation orthotopique non vascularisée, chez des animaux non pubères), une évaluation préliminaire de l'initiation d'une fonction endocrine (déclenchement d'une puberté spontanée quand la réimplantation a lieu chez un animal non pubère) ou reprise d'une activité hormonale cyclique quand la réimplantation a lieu chez un animal pubère, ainsi que l'obtention de gestation au cours de la première saison sexuelle. Les résultats attendus pour la poursuite de ce projet porte, chez ces 12 brebis déjà opérées :

- Analyse de la fonction endocrine par des dosages sérique mensuels de progestérone et oestradiol comme reflet de la fonction ovarienne et des dosages de FSH comme reflet de la réserve ovarienne. Le but de ces dosages est double : confirmer les résultats préliminaires sur les possibilités d'instauration d'une puberté spontanée et de restauration d'une activité cyclique mais également évaluer la durée de vie des greffons.
- Etude des possibilités de fertilité à long terme et en fonction des groupes d'étude.
- Etude des greffons après épuisement (défini par un taux de FSH élevé et arrêt des gestations) en immunohistochimie ainsi qu'une étude de la néovascularisation (en comparant les brebis ayant eu ou non des gestations)
- Etude épigénétique de *Mest/Peg1* et *Igf2R* sur l'ADN génomique des descendants et celui des ovocytes recueillis au niveau des greffons. Le but est d'évaluer les risques d'anomalies sur des gènes soumis à empreinte liés à la manipulation du cortex ovarien comme cela a été montré chez l'homme après des techniques d'assistance médicale à la procréation (surincidence de syndrome de Wiedemann- Beckwith).

Ce projet a pour but la validation de la cryoconservation de cortex ovarien avant la puberté et surtout les modalités de la réimplantation ainsi que les risques pour la descendance.

### **Publication**

Sauvat F, Bouilly J, Capito C, Lefevre A, Blachere T, Borenstein N, et al. Ovarian function is restored after grafting of cryopreserved immature ovary in ewes. The FASEB Journal. 1 avr 2013;27(4):1511-8.

## **Vitrification des ovocytes : étape préclinique en vue d'une utilisation dans le cadre de la préservation de la fertilité**

**SCHUBERT Benoît** - AP-HP GH Pitié-Salpêtrière

### **Résumé :**

La vitrification ovocytaire est une technique d'assistance médicale à la procréation récente qui peut constituer une nouvelle option parmi les techniques de préservation de la fertilité de la femme avant un traitement stérilisant. Les données actuelles de la littérature tendent à montrer de meilleurs taux de succès qu'avec la technique de référence : la congélation lente. Actuellement, 43 enfants sont nés après fécondation *in vitro* d'ovocytes vitrifiés. Le but de notre étude est d'évaluer la vitrification d'ovocytes matures et immatures avec 2 systèmes de vitrification ovocytaire aseptique disponibles. Nous utiliserons le modèle souris pour cette étape pré-clinique. Les ovocytes frais ou décongelés feront l'objet d'une analyse morphologique (analyse microscopique, coloration vitale, coloration du fuseau méiotique et des chromosomes) et d'une analyse fonctionnelle (fécondation *in vitro*). Nous pourrions ainsi évaluer le comportement des ovocytes matures et immatures avec 2 systèmes de vitrification aseptique en comparant leurs résultats entre eux et avec ceux de la congélation lente. Ainsi ces résultats nous permettront de guider notre attitude thérapeutique pour offrir à nos patientes une technique efficace qui réponde aux règles de sécurité sanitaire les plus exigeantes.

**Projet annulé.**



## **Etude de patients présentant une avance staturale syndromique par hybridation comparative sur puce à ADN**

**VEKEMANS Michel** - AP-HP Hôpital Necker Enfants Malades

### **Résumé :**

De nombreux syndromes comportent une avance staturale (AS). Si les progrès de la génétique moléculaire ont permis d'identifier les bases moléculaires de certaines de ces conditions, de nombreux cas restent encore inexpliqués. L'observation d'anomalies chromosomiques associées à une AS syndromique suggère que certains de ces syndromes pourraient être la conséquence d'anomalies chromosomiques cryptiques. L'hybridation génomique comparative sur puces à ADN représente une avancée majeure qui permet l'exploration globale des chromosomes humains avec une résolution 10 fois supérieure à celle des techniques de cytogénétique classique. Notre projet a donc pour objectif d'évaluer par cette technique la fréquence et la nature des remaniements chromosomiques dans une population de patients présentant une avance staturale syndromique puis d'utiliser ces connaissances pour identifier de nouvelles entités cliniques associées à une AS et de nouveaux gènes responsables d'anomalies de la croissance. Depuis plusieurs années, et en collaboration avec l'association L'Veuil syndrome de Sotos, nous avons recueilli les prélèvements de plus de 160 patients présentant une AS syndromique rentrant dans un cadre connu (Sotos, Weaver, Marshall-Smith, etc.) ou non. Malgré des explorations cliniques, biochimiques et moléculaires extensives, dans plus de 50% des cas, la cause de l'anomalie de croissance demeure inexpliquée. Parallèlement, l'équipe du Dr L. COLLEAUX a développé dans son laboratoire une plateforme d'analyse par CGH-array. Ses travaux précédents montrent que l'utilisation d'une puce «pan-génome» avec une résolution de l'ordre de 1 Mb, conduit à l'identification d'un remaniement chromosomique pathogène chez 15% de patients retardés mentaux syndromiques. Ces résultats attestent de la puissance d'analyse de cette nouvelle technique et de son intérêt potentiel pour l'étude de cohorte de patients. Notre projet vise donc à analyser par CGH-array 80 patients présentant un syndrome d'AS idiopathique avec trois objectifs principaux :

- 1) Caractériser la nature et la fréquence des anomalies chromosomiques associées à une AS. Ce travail sera réalisé en utilisant une puce commercialisée par la société Affymetrix® et permettant l'exploration de l'ensemble du génome avec une résolution d'environ 40 kb.
- 2) Définir de nouvelles entités nosologiques
- 3) Etablir des corrélations génotypes/phénotypes pour identifier de nouveaux gènes impliqués dans des syndromes d'AS.

Les résultats attendus sont une meilleure caractérisation des anomalies chromosomiques responsables d'une avance staturale. Outre l'importance de ces résultats pour le diagnostic, la caractérisation des anomalies moléculaires à l'origine de ces phénotypes sera d'un réel bénéfice pour les patients et leur famille. En effet, le diagnostic moléculaire fournit les éléments essentiels pour proposer un conseil génétique aux familles concernées et permet d'adapter la prise en charge en particulier sur le plan du risque tumoral. De plus, l'étude clinique détaillée de ces anomalies devrait permettre de définir de nouvelles entités nosologiques et d'aider la démarche diagnostique pour les futurs patients. Enfin, les remaniements ainsi identifiés seront un outil de choix pour caractériser par une approche de type «gène candidat» de nouveaux gènes dont le dysfonctionnement serait à l'origine d'anomalies de la croissance.

### **Publication :**

Malan V, Chevallier S, Soler G, Coubes C, Lacombe D, Pasquier L, et al. Array-based comparative genomic hybridization identifies a high frequency of copy number variations in patients with syndromic overgrowth. *European Journal of Human Genetics*. 2010;18(2):227–232.

## **Génétique de l'infertilité masculine**

**VIVILLE Stéphane – IGBMC**

### **Résumé :**

Actuellement, environ 12% des couples sont confrontés à une infertilité. Dans la moitié des cas, la cause est masculine. Il peut s'agir d'une anomalie quantitative ou qualitative du sperme comme une anomalie morphologique des spermatozoïdes (tératozoospermie), ou encore la combinaison de plusieurs anomalies. La globozoospermie est une tératozoospermie rare mais sévère caractérisée par une absence d'acrosome spermatique dont la tête apparaît globuleuse. Cette anomalie peut être observée de façon homogène sur tous les spermatozoïdes ou seulement sur une proportion variable (20 à 90%) d'entre eux. La globozoospermie résulte d'un trouble de la spermatogenèse. L'étiologie en est toujours mal connue même si une contribution génétique est avancée à partir de la publication de plusieurs cas report familiaux ainsi qu'à partir de 3 modèles murins impliquant les gènes *Csnk2A2*, *Hrb* et *GOPC7-9*. Récemment, l'exploration par puces à ADN d'une famille consanguine comprenant 3 frères globozoospermiques et 3 frères fertiles nous a permis la mise en évidence d'une mutation homozygote dans le gène *SPATA16*. *SPATA16* n'est exprimé que dans le testicule et la mutation mène à une infertilité isolée en dehors de tout syndrome.

Dans cette continuité, nous envisageons des études ultérieures à partir d'autres familles afin d'isoler d'autres acteurs de la formation de l'acrosome. Ceci permettra dans un premier temps d'affiner la dissection des mécanismes impliqués dans la formation d'un organite cellulaire aussi spécialisé que l'acrosome. Dans un deuxième temps, la grande spécificité d'expression tissulaire comme de fonction de *SPATA 16* ou de ses partenaires impliqués dans la formation de l'acrosome pourrait en faire d'excellentes cibles pour des contraceptifs chimiques masculins.

### **Publications :**

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

# DPY19L2 gène majeur de la globozoospermie



E ElInati<sup>1</sup>, P Kuentz<sup>2</sup>, C Redin<sup>1</sup>, S Jaber<sup>3</sup>, F Vanden Meerschaut<sup>4</sup>, I Kosciński<sup>1,5</sup>, M Nasr-Esfahani<sup>6</sup>, A Demiroglu<sup>7</sup>, T Gurgan<sup>7</sup>, N Louanjli<sup>8</sup>, N Iqbal<sup>9</sup>, M Bisharah<sup>9</sup>, F Carré Pigeon<sup>10</sup>, H Gourabi<sup>11</sup>, D De Briel<sup>12</sup>, F Brugnon<sup>13</sup>, S A Giltin<sup>14</sup>, JM Grillo<sup>15</sup>, P De Sutter<sup>3</sup>, J Müller<sup>1</sup>, Stéphane Viville<sup>1</sup>



## Introduction

Globozoospermia or round headed spermatozoa is a rare and severe teratozoospermia consisting of spermatozoa lacking an acrosome ( figure 1).

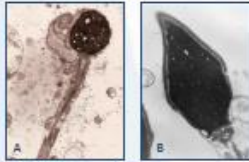


Figure 1. Electron microscopy A/ acrosomeless spermatozoa. B/normal spermatozoa

Studying a consanguineous family, we identified *DPY19L2* (figure 2) as responsible of globozoospermia. We identified four unrelated patients deleted for *DPY19L2*. The deletion of 200 Kb is due to a non allelic homologous recombination (NAHR) between the two LCR regions sharing 96.5 % of identity and flanking *DPY19L2*.

We present here the analysis of a larger cohort of globozoospermic patients which allowed us first, to refine the frequency rate of the deletion in our cohort, and second to enlarge the mutation spectrum.



Figure 2. Pedigree and Linkage Analysis of the Jordanian Family (Kosciński et al, AJHG 2011)

## Results

CNV Frequency of Individuals at the *DPY19L2* Locus and Expected Prevalence of Homozygotes (Kosciński et al, AJHG 2011)

	Pinto et al.	De Smith et al.	Conrad et al.	Itsara et al.	Shaikh et al.	Total	Frequency	Expected Homozygous Deletion Frequency
Gain	2	1	4	22	35	64	1/76	
Loss (Htz)	0	3	0	5	14	22	1/222	1/200,000
Population	506	50	450	1854	2026	4886		

We screened a larger cohort of 54 patients and we found in total :

- ✓ 25 patients homozygous deleted for *DPY19L2*
- ✓ 7 patients heterozygous composite for the deletion and a point mutation

- Globo5 p.R290H/del
- Globo9 p.Q345X/del
- Globo35 p.T493R/del
- Globo40 p.Lys680X/del
- Globo42,43 p.S395LfsX7/del
- Globo46 Ex5-6del/del

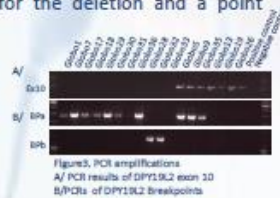


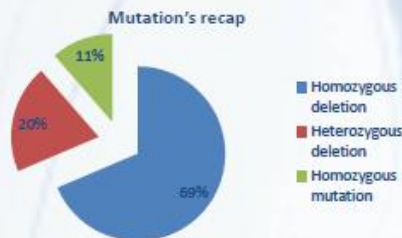
Figure 3. PCR amplifications A/ PCR results of DPY19L2 exon 10 B/ PCR results of DPY19L2 breakpoints

- ✓ 4 patients homozygous for a point mutation

- Globo55 Ex5-7del
- Globo13 Ex5-6del
- Globo26 p.R298C
- Globo19 c.1131+1G>A



Figure 4. PCR showing mutation effect of Globo13 and 19 A/ Minigene constructs used to test the splicing of exon 11 B/ PCR results of DPY19L2 exon 5 and 6



## Conclusion

66.6% of the patients are mutated for *DPY19L2*

*DPY19L2* is the major gene involved in globozoospermia

The deletion is due to the architectural features of the locus rather than a founder effect

This is a major finding with a view toward the development of an efficient molecular diagnosis strategy for globozoospermia

Clinical studies concerning ICSI attempt and their correlation with *DPY19L2* and *SPATA16* mutations are on going

So far, 9 breakpoints have been identified that cluster in 2 regions in the LCRs defining two hot spots of recombination.

Breakpoint zona	Origin	Sperm concentration, million/mL
BP1	Jordan	52
BP1	France	71
BP1	Iran	ND
BP2	Turkey	ND
BP2	France	ND
BP2	Algeria	90
BP2	Iran	ND
BP1/BP2	France	78
BP3	Turkey	10,25
BP4	Saudi Arabia	71,5
BP4	Belgium	13
BP5	Turkey	56
BP5	Morocco	94
BP5	Belgium	38
BP5	Belgium	61,9
BP5	France	0,35
BP6	Belgium	180
BP6	Iran	ND
BP7	Morocco	178
BP8	Morocco	64
BP9	Turkey	ND

Hot spot 1: 1.7 kb Alu seq  
Hot spot 2: 117 bp THE1B

We find the PRDM9 13mer recognition motif in hot spot 2 which coincides with a previously identified recombination hot spot of chromosome 12 (figure 5).

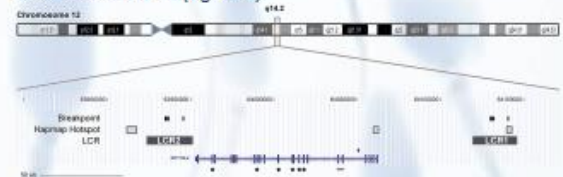


Figure 5. Distribution of the SPs

The *DPY19L2* locus is represented together with the two LCR, the hapmap recombination hotspots, the nine different BPs and the identified mutations (missense are marked with a star and larger deletions are represented using a black horizontal line).

