

**APPEL D'OFFRES 2009 « AMP, diagnostic pré-implantatoire,
diagnostic génétique »
Résumés résultats et publications**

| Chercheur | Sujet de recherche | Thème |
|-------------------------------|--|-------|
| COURBIERE Blandine | Impact cytotoxique et génotoxique des cryoprotecteurs utilisés pour la vitrification des ovocytes humains | 3 |
| DURANTHON Véronique | Perturbations épigénétiques induites par la culture in vitro de l'embryon : dérégulation des séquences rétrovirales | 2 |
| VILLE Isabelle | Du test prénatal à l'expérience du handicap : les mécanismes de la traduction en France, au Pays-Bas et au Brésil | 1 |
| LAINÉ Agnès | Les choix des personnes et couples à risque face aux tests génétiques et à l'intervention sur le vivant : le cas de la drépanocytose | 1 |
| PELLESTOR Franck | Etude des facteurs moléculaires de non-disjonction ovocytaire, et nouvelles approches pour la réduction de l'aneuploidie | 4 |
| CEDRIN-DURNERIN Isabelle | Impact de l'alimentation et du statut nutritionnel sur les troubles de l'ovulation : étude prospective multicentrique | 3 |
| KHOSHNOOD Babak | Assistance médicale à la procréation et risque de cardiopathies congénitales : étude en population | 3 |
| FOIX – L'HELIAS Laurence | Poursuite du suivi des enfants conçus par fécondation in vitro avec le diagnostic préimplantatoire (DPI) | 3 |
| MOREAU Caroline | Attitudes et représentations en matière d'assistance médicale à la procréation et de génétique de la reproduction en France | 1 |
| HEDON Bernard | Endométriose I/II traitée et fertilité | 4 |
| LEDEE Nathalie | Validation finale du G-CSF Folliculaire comme biomarqueur non invasif du potentiel d'implantation embryonnaire | 4 |
| GERARD Bénédicte | Défauts de fermeture du tube neural : recherche d'un déficit en donneurs de méthyle par biochimie et biologie moléculaire | 4 |
| COSTA Jean-Marc | Diagnostic prénatal non invasif de l'achondroplasie | 4 |
| STERNBERG Damien | Dépistage génétique des dysfonctions de la jonction neuromusculaire dans les syndromes d'akinésie fœtale | 4 |
| PATERLINI-BRECHOT Patrizia | Extension de validation clinique d'une méthode non invasive de DPN de l'amyotrophie spinale | 2 |
| SALLE Bruno | Préservation de la fertilité : évaluation de 2 protocoles congélation lente et vitrification d'ovaires humains entiers | 4 |

**THEMES DE RECHERCHE : ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION,
DIAGNOSTIC PRENATAL ET DIAGNOSTIC GENETIQUE**

- 1) **Sciences humaines, économiques et sociales : étude en santé publique et / ou éthique ;**
- 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**

Impact cytotoxique et génotoxique des cryoprotecteurs utilisés pour la vitrification des ovocytes humains

Blandine COURBIERE (Université de la Méditerranée)

Objectifs : Si elle pouvait être réalisée en routine, la cryoconservation des ovocytes humains matures pourrait avoir de nombreuses applications en médecine de la reproduction : alternative à la congélation des embryons dans les procédures de fécondation in vitro, préservation de la fertilité avant la mise en route d'un traitement anticancéreux gonadotoxique, création de « banques » d'ovocytes pour les patientes souffrant d'insuffisance ovarienne précoce. Les premières naissances humaines après cryoconservation d'ovocytes ont été rapportées en 1986 après congélation lente et en 1999 après vitrification. Cependant, les ovocytes matures sont un des types cellulaires les plus difficiles à congeler, du fait de leur sensibilité particulière aux cristaux de glace. La vitrification est une technique de cryoconservation actuellement en plein essor en médecine de la reproduction. La vitrification consiste à transformer un liquide en un état vitreux ou amorphe, grâce à l'utilisation de cryoprotecteurs à haute concentration et à des vitesses de refroidissement élevées. La vitrification permet de conserver un échantillon biologique sans qu'il y ait eu formation de cristaux de glace. Nous avons pour projet d'étudier les risques cytotoxiques et génotoxiques des cryoprotecteurs (diméthylsulfoxyde et éthylène glycol) utilisés à haute concentration dans le cadre de différents protocoles de vitrification actuellement décrits pour la vitrification des ovocytes humains.

Résultats attendus : Etude des concentrations cytotoxiques et des concentrations génotoxiques des cryoprotecteurs, c'est à dire recherche des effets mutagènes éventuels ou non au niveau de l'ADN ovocytaire. Etude génotoxique de protocoles de vitrification utilisés en médecine humaine. La vitrification des ovocytes matures est une technique innovante, qui mérite cependant de prouver son innocuité à long terme sur la descendance.

Méthodologie :

Notre modèle d'évaluation des risques mutagènes utilise une lignée cellulaire CHO (Cellules d'ovaires d'Hamster Chinois), dont le modèle a été validé sur le plan international pour les études de génotoxicité (OCDE guidelines). Les résultats de génotoxicité sur notre modèle d'étude, les cellules CHO, sont théoriquement extrapolables à l'ovocyte humain, car l'espèce joue peu sur les phénomènes mutagènes.

- Etude de la cytotoxicité des cryoprotecteurs (diméthylsulfoxyde et éthylène Glycol) par des réactions colorimétriques (test de cytotoxicité au WST-1) sur des lignées cellulaires CHO.
- Etude de la génotoxicité des cryoprotecteurs:
 - Test des comètes pour rechercher des lésions primaires de l'ADN
 - Test des micronoyaux pour rechercher des dommages chromosomiques

Etude de la cytotoxicité et de la génotoxicité de différentes solutions cryoprotectrices et de différents protocoles de vitrification décrits pour la vitrification des ovocytes humains et comparaison avec la méthode classique de congélation lente sur cellules CHO.

Publications :

1. Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, Botta A, Perrin J, Courbiere B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: Dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food and Chemical Toxicology*. juill 2010;48(7):1905-12.
2. Berthelot-Ricou A, Perrin J, Di Giorgio C, De Meo M, Botta A, Courbiere B. Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells. *Fertility and Sterility*. mars 2011;95(4):1452-7.
3. Berthelot-Ricou A, Perrin J, di Giorgio C, de Meo M, Botta A, Courbiere B. Assessment of 1,2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay. *Fertility and Sterility*. oct 2011;96(4):1002-7.
4. Berthelot-Ricou A, Perrin J, di Giorgio C, de Meo M, Botta A, Courbiere B. Genotoxicity assessment of mouse oocytes by comet assay before vitrification and after warming with three vitrification protocols. *Fertility and Sterility*. sept 2013;100(3):882-8.
5. Berthelot-Ricou A, Perrin J, Orsière T, Aye M, Roustan A, Botta A, et al. Risque génotoxique et ovocytes : principes de toxicologie génétique et applications. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. sept 2013;41(9):544-7.

Posters

Etude du risque génotoxique des protocoles de vitrification ovocytaire par test des comètes sur ovocytes de souris.



Anaïs BERTHELOT-RICOU^{1,2}, Jeanne PERRIN^{1,3}, Audrey ROUSTAN¹, Carole DI GIORGIO⁴, Michel DE MEO⁴, Alain BOTTA¹, Blandine COURBIERE^{1,5*}.

¹ Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE), UMR CNRS7263/IRD237, Equipe Biogénotoxicologie, Santé Humaine & Environnement FR CNRS 3098 ECCOREV, Faculté de Médecine de l'Université d'Aix-Marseille, Marseille.
² Pôle de Gynécologie-Obstétrique, CHU de la Réunion, Site CHFG, route de Bellepierre, 97400 Saint Denis, Ile de la Réunion.
³ CECOS - Laboratoire de Biologie de la Reproduction, AP-HM La Conception, 147 Bd Baïlle, 13005 Marseille.
⁴ Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement (CEREGE), UMR CNRS 7330, Europe Méditerranéenne de l'Arbois, Aix-en-Provence.
⁵ Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE), Laboratoire de Mutagenèse et Toxicologie Environnementales, IMBE, Faculté de Pharmacie de l'Université d'Aix-Marseille, Marseille.
^{*} Pôle de Gynécologie-Obstétrique et Reproduction, AP-HM La Conception, 147 Bd Baïlle, 13005 Marseille.
^{*} blandise.courbiere@imbe.fr / blandise.courbiere@ap-hm.fr



Introduction

La vitrification des ovocytes est devenue en une dizaine d'année une technique de routine en biologie de la reproduction, avec naissance de plusieurs centaines d'enfants dans le monde. La vitrification est un processus physique qui permet - grâce à l'utilisation de cryoprotecteurs à haute concentration - de piéger les solutions aqueuses dans un état solide dit amorphe ou « vitreux »; évitant ainsi toute formation de cristaux de glace pouvant être délétères pour les cellules.

Dans un travail préliminaire, notre équipe avait étudié la génotoxicité de trois cryoprotecteurs sur une lignée cellulaire CHO, et nous avons observé des lésions de l'ADN induites par le 1,2 propanediol (PrOH) [1]. Des lésions de l'ADN avaient ensuite été observées chez des ovocytes de souris après exposition au PrOH à haute concentration [2, 3]. L'objectif de ce travail a été d'étudier, grâce au test des comètes sur ovocytes de souris, les risques génotoxiques de trois protocoles de vitrification:

1. Immédiatement après exposition des ovocytes aux solutions d'équilibration et de vitrification.
2. Après vitrification, réchauffement, et réhydratation des ovocytes.

Matériels et méthodes

1. Exposition des ovocytes aux protocoles de vitrification

Les ovocytes ont été obtenus après superovulation chez des souris CD1. Des groupes de 40 ovocytes ont été exposés à trois kits de vitrification commercialisées selon les recommandations des fabricants :

- Protocole 1 (P1) : diméthylsulfoxyde (DMSO) + éthylène glycol (EG),
- Protocole 2 (P2) : DMSO + EG
- Protocole 3 (P3) : PrOH + EG

Les 3 protocoles de vitrification ont été appliqués à 3 reprises sur 3 groupes de 40 ovocytes. Les ovocytes ont tous été vitrifiés en système fermés Cryotip[®] (InVivo Scientific® Unit 31, Wicklow, Ireland)

→ Le test des comètes a pour but de détecter et quantifier les lésions primaires de l'ADN d'une cellule individualisée.

L'ADN lésé apparaît sous la forme de comètes dont la partie distale est proportionnelle au nombre de cassures de brin. L'interprétation de ce test est quantitative grâce au logiciel Komet 6.0. L'Olive Tail Moment (OTM) est défini comme le produit du pourcentage d'ADN réparti dans la queue de la comète par la distance entre les barycentres de la tête et de la queue de la comète.

2. Test des comètes sur ovocytes de souris

Ce test a été réalisé sur des groupes de 40 ovocytes de souris [2] à 3 reprises

- (1) Immédiatement après exposition des ovocytes aux solutions de vitrification
- (2) Après Vitrification, réchauffement, réhydratation, rinçage et incubation de 3 heures à 37 °C.
 - Les contrôles négatifs (Cont Neg) étaient, pour les comètes avant vitrification, un groupe de 40 ovocytes maintenus à T° ambiante dans du milieu M2, pour les comètes après réchauffement un groupe de 40 ovocytes maintenus à 37 °C dans du milieu M16;
 - Pour le contrôle positif (Cont Pos) 40 ovocytes ont été exposé juste avant la réalisation du test, durant 5min à 4 °C dans l'obscurité, à du Peroxyde d'Hydrogène (H₂O₂)

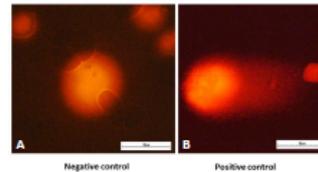


Figure 1 Aspect de l'ADN ovocytaire après test des comètes et coloration à l'Iodure de Propidium. A : Témoin négatif; B : après exposition à un agent génotoxique: H₂O₂ à 250µM, 5 minutes à 4 °C.

Résultats

Figure 2: Génotoxicité des protocoles de vitrification Immédiatement après exposition aux solutions de vitrification

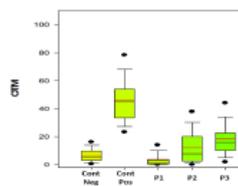
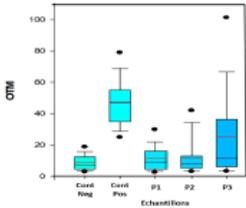


Figure 3: Génotoxicité des protocoles de vitrification après vitrification, réchauffement et réhydratation



1. Test de comètes avant vitrification

L'exposition aux solutions d'équilibration et vitrification des protocoles 1 et 2 contenant de l'EG et du DMSO, n'a pas induit de lésions significatives de l'ADN par au témoin négatif. la solution 3 composée de PrOH et EG a induit des lésions primaires d'ADN de façon statistiquement significative par rapport au témoin négatif.



| Groupe | n | Médiane OTM | 25% | 75% | T | U ^a | valeur p ^b |
|--|----|-------------|-------|--------|----------|----------------|-----------------------|
| Première partie: Test des comètes après exposition des ovocytes de souris aux solutions de vitrification | | | | | | | |
| Cont Neg | 54 | 5.515 | 3.043 | 9.697 | | | |
| P1* | 74 | 0.910 | 0.270 | 3.688 | 4622.500 | 858.500 | <0.001 |
| P2** | 57 | 7.760 | 2.540 | 20.065 | 2720.500 | 1235.500 | 0.074 |
| P3** | 91 | 15.870 | 9.950 | 22.710 | 2364.500 | 879.500 | <0.001 |
| Deuxième partie: Test des comètes après vitrification, réchauffement, et réhydratation des ovocytes de souris | | | | | | | |
| Cont Neg | 74 | 5.425 | 2.550 | 10.455 | | | |
| P1** | 65 | 7.230 | 2.510 | 14.240 | 4827.000 | 2128.000 | 0.243 |
| P2** | 29 | 5.740 | 3.135 | 10.980 | 1605.000 | 976.000 | 0.479 |
| P3** | 49 | 9.810 | 4.060 | 34.780 | 3627.000 | 1224.000 | 0.002 |

Tableau 1: Analyse statistique du test des comètes avant et après vitrification.

Test de Normalité de Shapiro-Wilk significatif p<0.050
 Cont Neg: témoin négatif, ovocytes à T° ambiante dans du milieu M2
 * : exposition des ovocytes aux solutions d'équilibration et vitrification des protocoles 1,2,3
 ** : vitrification, réchauffement, réhydratation et incubation des ovocytes à 37°C pendant 3h
^a : Test de Mann-Whitney, U Statistique
^b : significativité statistique pour p<0.05



Après vitrification des ovocytes de souris avec les protocoles 1 et 2, nous n'avons pas observé de lésions statistiquement significatives de l'ADN par rapport au groupe témoin négatif, tandis que la vitrification avec le protocole 3 a induit des lésions significatives de l'ADN par rapport au groupe témoin négatif.

2. Test de comètes après vitrification, réchauffement, réhydratation

Conclusion

Nos résultats montrent sur modèle souris l'absence d'effet génotoxique des protocoles de vitrification utilisant du DMSO et de l'EG. En revanche, nous avons observé un effet génotoxique du PrOH sur ovocytes de souris qu'il soit employé seul [3] ou en association avec de l'EG, que ce soit avant et après vitrification. L'extrapolation à l'ovocyte humain se doit d'être prudente car l'ADN de l'ovocyte de souris n'est pas parfaitement identique à celui de la femme, mais pourrait nous conduire à préférer l'utilisation de protocoles de vitrification sans PrOH.

Références

- [1] Aye M, Di Giorgio C, De MEO M, Botta A, Perrin J, Courbiere B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants commonly used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. Food Chem Toxicol. 2010; 48: 1905-12.
- [2] Berthelot-Ricou A, Perrin J, Di Giorgio C, De MEO M, Botta A, Courbiere B. Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells. Fertil Steril. 2011;95:1452-7.
- [3] Berthelot-Ricou A, Perrin J, Di Giorgio C, De MEO M, Botta A, Courbiere B. Assessment of 1,2-propanediol genotoxicity on mouse oocytes by comet assay. Fertil Steril. 2011;96:1002-7.

TEST DES COMETES SUR OVOCYTES DE SOURIS : ETUDE DE LA GENOTOXICITE DU 1, 2 PROPANEDIOL.

Anais BERTHELOT-RICOU¹, Jeanne PERRIN^{1,3}, Carole DI DIOGGIO¹, Michel DE MEO¹, Alain BOTTA¹, Blandine COURBIERE^{1,2},
(1) Laboratoire de Biogéotoxicologie et de Mutagenèse Environnementale (EA 1784), Fédération de Recherche ECCOREV (FR 3098), Faculté de Médecine de Marseille, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille 2.
(2) Service de Gynécologie – Obstétrique, Centre d'Assistance Médicale à la Procréation, Pr GAMERRE, AP-HM La Conception, Marseille.
(3) CECOS, Pr JM GRILLO, AP-HM La Conception, Marseille.

INTRODUCTION

Le 1,2 Propanediol (PrOH) est un cryoprotecteur largement utilisé à basse concentration en biologie de la reproduction et maintenant utilisé à haute concentration pour la vitrification. Un précédent travail avait étudié la géotoxicité de 3 cryoprotecteurs sur une lignée cellulaire de cellules CHO: PrOH, dimethylsulfoxyde (DMSO), éthylène glycol (EG). Le DMSO et l'EG ne présentaient pas d'effet génotoxique. En revanche, le PROH était responsable d'une activité génotoxique sur les cellules CHO¹. Ces résultats ont imposé la poursuite des tests de géotoxicité en les appliquant à l'ovocyte. Grâce à un modèle de test des comètes sur ovocytes de souris², l'objectif de notre travail a été de tester différentes conditions d'exposition au PrOH afin de préciser son effet génotoxique sur l'ADN ovocytaire.

MATERIELS ET METHODES

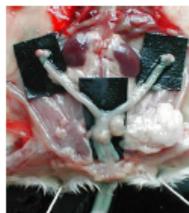
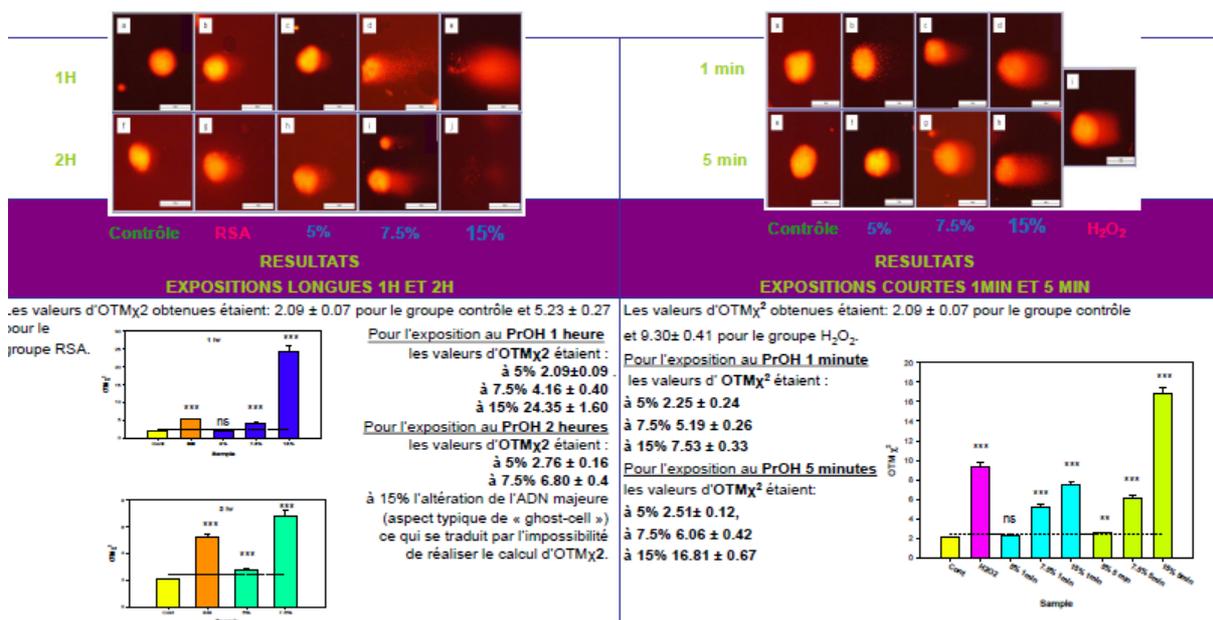


Figure 1:
Tractus Génital de souris CD1

Notre modèle d'étude a utilisé des ovocytes matures de souris CD1 déconionisés mais non dépellucidés. Trois groupes d'ovocytes (n= 40) ont été exposés à 3 concentrations différentes de PrOH (5%, 7.5%, 15%). Chaque concentration a été testée à trois reprises avec 4 durées d'exposition au PrOH : deux durées d'exposition longues (1 heure et 2 heures) tel qu'il est établi en matière de recherche en géotoxicologie et deux durées d'exposition courtes (1 minute et 5 minutes) tels que sont employés les cryoprotecteurs dans le cadre des protocoles de vitrification. L'exposition des ovocytes au PrOH a été comparée avec l'exposition des ovocytes à un milieu de culture (groupe témoin négatif) et avec l'exposition au rayonnement solaire artificiel (RSA) pour les expositions longues et au peroxyde d'hydrogène (H2O2) pour les expositions courtes (groupes témoins positifs). Le test des comètes en version alcaline adapté à l'ovocyte de souris a été appliqué à ces différents groupes d'ovocytes. L'analyse des images obtenues par microscopie à fluorescence a été effectuée à l'aide d'un logiciel validé (KOMET 5.5, Nottingham, UK). Les lésions de l'ADN ont été quantifiées par un paramètre appelé « Olive Tail Moment » (OTM) qui associe la longueur de la queue de la comète et le pourcentage d'ADN qui y est contenu (« Tail DNA »). L'interprétation des résultats était donnée par l'OTMx2³. Le test était considéré comme positif quand une exposition à un agent induisait une augmentation significative de l'OTMx2 en comparaison avec l'OTMx2 obtenu pour les ovocytes du groupe témoin négatif avec un p<0.001.

EFFET GENOTOXIQUE SIGNIFICATIF DU PROH À HAUTE CONCENTRATION 7.5 ET 15% MÊME EN CAS D'EXPOSITIONS COURTES DE 1 ET 5 MIN



CONCLUSION

Nos résultats ont montré que le PrOH, employé seul, induisait des lésions primaires de l'ADN ovocytaire chez la souris. L'effet génotoxique était plus marqué à haute concentration. Il faut cependant interpréter nos résultats avec prudence car l'ADN de l'ovocyte de souris n'est pas parfaitement identique à celui de la femme et d'autre part, le test des comètes ne tient pas compte des phénomènes de réparation ovocytaire. Toutefois, ces résultats imposent la poursuite des tests de géotoxicité sur l'ovocyte ainsi que l'étude des cinétiques de réparation.

REFERENCES

- (1) Aye M, et al. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: Dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. Food and Chemical Toxicology 2010;48:1905-1912.
- (2) BertheLOT-Ricou et al. Development of comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate germ cell genotoxicity. Fertil Steril 2010 Article in press
- (3) Bauer E, et al. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (chi2) not a gaussian distribution. Mutation Research 1998;398:101-110.

Projet réalisé avec le soutien financier de l'Agence de la Biomédecine

Perturbations épigénétiques induites par la culture *in vitro* de l'embryon : dérégulation des séquences rétrovirales

Véronique DURANTHON (INRA)

Objectifs : le précédent projet soutenu par l'Agence de la biomédecine (GENINVITRO) met en évidence une surexpression de certaines séquences de type rétroviral, induite par la culture *in vitro* de l'embryon préimplantatoire de mammifères. Ces séquences sont habituellement exprimées lors de l'activation transcriptionnelle du génome embryonnaire (EGA) et nos données montrent que leur expression est étroitement associée à l'état toti/pluripotent des cellules de l'embryon. L'objectif de ce projet est d'analyser l'hypothèse selon laquelle, au cours de l'EGA, l'expression de ces séquences rétrovirales est affectée par l'état de méthylation de leurs séquences LTR régulatrices qui serait lui-même altéré par la culture *in vitro* de l'embryon. La persistance de ces dérégulations (surexpression, hypométhylation des LTR) sera testée au cours du développement fœtal et son éventuelle transmission aux embryons issus d'individus développés *in vitro* analysée. Enfin, le lien fonctionnel entre la sous expression du gène MAT2A, (impliqué dans la synthèse de S adenosyl methionine (SAM), principal donneur de groupements methyl dans la cellule), également observée dans l'embryon cultivé *in vitro* et la dérégulation de l'expression des séquences rétrovirales sera recherché. **Résultats attendus :** Ce projet apportera une contribution importante à l'analyse de l'innocuité de la culture *in vitro* de l'embryon de mammifères. Alors que la question du risque épigénétique lié aux procédures d'AMP est le plus souvent posée par rapport aux gènes soumis à empreinte parentale, ce projet propose d'analyser les conséquences de la culture *in vitro* sur la régulation des séquences rétrovirales qui pourraient à moyen terme constituer un nouveau « sensor » pour évaluer ce risque. **Méthodologie :** L'embryon de lapin, choisi pour ses similitudes avec l'embryon humain, cultivé *in vitro* ou développé *in vivo*, sera utilisé comme modèle. Deux types de séquences rétrovirales surexprimées *in vitro* seront analysés, leur expression sera quantifiée par qRT-PCR; la méthylation de leurs LTR sera analysée par traitement au bisulfite puis clonage séquençage et/ ou pyroséquençage. Des embryons cultivés *in vitro* seront transférés dans des femelles receveuses pour l'analyse des fœtus et la transmission à la descendance. Le lien fonctionnel entre sous-expression de MAT2A et dérégulation des séquences rétrovirales sera analysé par ARN interférence. Enfin, les conséquences plus générales de la sous-expression MAT2A seront analysées par analyse du transcriptome embryonnaire sur le réseau dédié et quantification de la méthylation globale du génome par immunofluorescence indirecte (anticorps anti 5 methyl cytosine).

Publications :

1. Reis e Silva AR, Bruno C, Fleurot R, Daniel N, Archilla C, Peynot N, et al. Alteration of DNA demethylation dynamics by *in vitro* culture conditions in rabbit pre-implantation embryos. *Epigenetics*. 2012;7(5):440–446.
2. Reis Silva AR, Adenot P, Daniel N, Archilla C, Peynot N, Lucci CM, et al. Dynamics of DNA methylation levels in maternal and paternal rabbit genomes after fertilization. *Epigenetics*. août 2011;6(8):987-93.

Dynamics of DNA Methylation levels in Rabbit Preimplantation Embryos Developed *in Vivo* or *in Vitro*

Silva A.R.R.^{1,2}, Bruno C.^{1,3}, Fleuret R.^{1,3}, Daniel N.^{1,3}, Adenot P.^{1,3}, Archilla C.^{1,3}, Peynot N.^{1,3}, Lucci, C.M.², Beaujean, N.^{1,3}, Duranthon V.^{1,3}

1- INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy en Josas, France.

2- Faculty of Veterinary Medicine, University of Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil.

3- ENVA, F-94704 Maisons Alfort, France.

Introduction

DNA methylation alterations have been attributed to *in vitro* culture and may alter normal embryo development. We chose to analyse DNA methylation reprogramming in the rabbit which among species with a delayed transcriptional activation of the embryonic genome allows easy comparisons between *in vivo*-developed (IVD) and *in vitro*-cultured (ITD) embryos. In this species, the variations of DNA methylation had not been previously quantified during preimplantation development even in IVD embryos.

Materials and methods

IVD and ITD embryos were recovered at the 2, 4, 8 and 16 cell, morula and blastocyst stages. ITD embryos were cultured in B2 medium with or without 2.5% FCS (B2S or B2) at 38.5 °C in 5 % CO₂ in air. Blastocysts were hemi-sectioned with a scalpel in order to avoid biases due to reduced penetration of labeled molecules into the blastocoel. Immunostaining for 5-methyl cytosine and DNA labelling by EthD2 were then performed. The embryos were observed on a microscope with structured illumination and analyzed by fluorescence quantification. Quantitative analyses of DNA methylation levels and total DNA contents were estimated by quantifying fluorescence signals as follows: 1) the area of each nucleus was outlined manually and the mean fluorescence intensity was measured for both 5-mC and EthD-2 images, 2) the mean fluorescence intensities were divided by the acquisition times of the corresponding signal and 3) these corrected mean fluorescence intensities were multiplied by the nuclei areas to obtain the total fluorescence intensities for both 5-mC and EthD2. Finally, DNA methylation levels (5-mC total fluorescence intensities) were divided by total DNA contents (EthD2 total fluorescence intensities) to calculate normalized methylated DNA quantities.

Results

Dynamics of DNA methylation reprogramming in IVD and ITC rabbit embryos

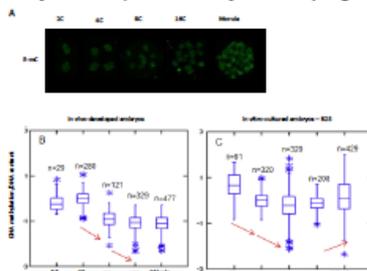
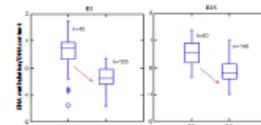


Figure 1 - (A) Representative images of 5-mC immunostaining during preimplantation development of *in vivo*-developed rabbit embryos. (B,C) Normalized DNA methylation levels (5-mC/EthD-2) in the nuclei of (B) *in vivo*-developed or (C) *in vitro*-cultured (B2S) rabbit embryos. On these box plots, values between the inner and outer fences are plotted with asterisk. n= number of blastomeres analyzed at each stage. The arrows indicate a significant difference ($p < 0.05$) between two consecutive development stages.

Quantitative analysis evidenced a DNA demethylation during preimplantation development in IVD and ITD embryos, however with different kinetics. Demethylation started earlier *in vitro* than *in vivo*.

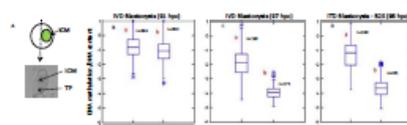
Variations in DNA demethylation kinetics with culture media composition



Embryo culture conditions and especially the presence of serum affects the extent of DNA demethylation during cleavages.

Figure 2 - Normalized DNA methylation levels (5-mC/EthD-2) in rabbit embryos cultured in B2 or B2S media. n= number of blastomeres analyzed. On these box plots, values between the inner and outer fences are plotted with asterisk. The arrows indicate a significant difference ($p < 0.05$) between two consecutive development stages. The letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between treatments.

DNA methylation in rabbit blastocysts



The ICM was more methylated than the trophectoderm.

Figure 3 - (A) Representative example of *in vivo*-developed blastocyst after hemi-section. (B-D) Normalized DNA methylation levels (5-mC/EthD-2) in blastocysts either *in vivo*-developed (IVD) (B,C) or *in vitro*-cultured (ITD) in B2S (D). n= number of blastomeres analyzed. On these box plots, values between the inner and outer fences are plotted with asterisk. The letters indicates a significant difference ($p < 0.05$) between inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TP) cells of blastocysts within each development time for each condition of development (IVD at 91 hpc, IVD at 97 hpc or ITD at 98 hpc).

Discussion and Perspectives

- This study provided the first quantitative analysis of DNA methylation dynamics during both *in vivo* and *in vitro* preimplantation development in the rabbit.
- The quantitative data evidenced a gradual demethylation in IVD or ITD embryos during successive cell cleavages, as reported in cattle, mice, sheep and pigs.
- The rabbit blastocysts behave in the same way as cattle, mice, pigs, sheep and human with their ICM cells more methylated than their trophectoderm cells. Despite a morphological delay in *in vitro* cultured blastocysts, the difference in DNA methylation between ICM and trophectoderm appeared at the same time post-fertilization in IVD and ITD embryos, which may reflect another difference in the dynamics of DNA methylation during blastocyst formation.
- The data establish an effect of embryo environment on DNA methylation reprogramming over preimplantation development in non rodent species.
- Taken together, the results showed differential effects of different culture conditions stressed the need for further researches to optimize culture media and conditions especially in the perspective of Assisted Reproductive Technologies.

Du test prénatal à l'expérience du handicap : les mécanismes de la traduction en France, au Pays-Bas et au Brésil

Isabelle VILLE (INSERM ADR Paris 11, hôpital Paul Brousse)

Dans une perspective sociologique, le projet vise à étudier les mécanismes de la traduction à l'œuvre dans la pratique du diagnostic prénatal (DPN) qui, à partir du résultat d'un test ou d'une image échographique aboutissent à l'anticipation de l'expérience d'un handicap. Il s'agit, en quelque sorte, de compléter les travaux existants en y introduisant une dimension importante et souvent négligée que sont les significations du handicap. En effet, la question du handicap a fait l'objet, au cours des trente dernières années, de nombreux débats qui ont largement nourri les politiques nationales et internationales et ont contribué à transformer l'expérience quotidienne de la vie avec des déficiences. Et puisque les pratiques du DPN sont, pour une part, destinées à prévenir les handicaps, il apparaît essentiel d'analyser les différentes acceptations qui sont produites et qui circulent dans l'espace défini par ces pratiques.

La démarche suppose de rassembler des expertises dans le domaine du handicap et des pratiques du suivi des grossesses ainsi que dans les méthodes d'investigation du travail médical « en actes », expertises réunies dans l'équipe de recherche. Les mécanismes de la traduction sont complexes et sont médiés par différents acteurs (professionnels, parents...) et différents dispositifs (outils techniques, règles d'organisation des services, cadres législatifs...). La comparaison des mêmes pratiques en France, aux Pays-Bas et au Brésil permet de faire varier les contextes législatifs et réglementaires, très différents dans ces trois pays.

La recherche s'appuiera sur une méthodologie qualitative (observations ethnographiques et entretiens auprès des femmes et des professionnels). En suivant une série de 10 situations dans chaque pays, depuis l'admission dans le centre de DPN pour anomalie non létale suspectée ou diagnostiquée, jusqu'à l'issue de la grossesse, il s'agira d'étudier finement, à partir des assemblages entre acteurs et dispositifs, les différentes significations du handicap qui sont produites, la façon dont elles circulent et sont partagées ou, au contraire, controversées. L'analyse des données s'appuiera sur l'approche de la *Grounded Theory*.

Cet intérêt pour la production et la circulation des significations du handicap dans l'espace de travail quotidien du suivi des grossesses, à travers l'analyse des associations entre professionnels, femmes et couples, objets techniques et dispositifs de régulations locaux et nationaux, devrait permettre de dépasser le dualisme entre une analyse pragmatique et locale des actions, centrée sur les pratiques professionnelles, et une analyse éthique, davantage préoccupée par les questions morales universelles et les grands choix de société.

Publications :

1. Mirlesse V, Perrotte F, Kieffer F, Ville I. Women's experience of termination of pregnancy for fetal anomaly: effects of socio-political evolutions in France. *Prenat Diagn.* 1 nov 2011;31(11):1021-8.
2. Ville I. Quand le handicap interroge la naissance. Introduction au dossier thématique. *ALTER - European Journal of Disability Research / Revue Européenne de Recherche sur le Handicap.* janv 2011;5(1):1-6.

Appel d'Offres

« AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique »

Du test prénatal à l'expérience du handicap:
Les mécanismes de la traduction en France, aux Pays-Bas et au Brésil
V. Mirlesse - I. Ville - S. Rosman
Cermes 3 - Villejuif

Objectif et Méthode:

Dans une perspective sociologique, ce projet vise une analyse comparative des pratiques du diagnostic prénatal (DPN) en lien avec la question du handicap dans 3 pays aux législations et réglementations différentes: France, Brésil et Pays-Bas.

Les domaines du handicap et de la périnatalité ont connu d'importantes évolutions durant les trente dernières années, durant lesquelles le DPN est devenu une forme de « prévention » des handicaps (Ville 2011). Le champ du handicap a évolué suite à la mobilisation collective des personnes handicapées et au développement des *disability studies* (Olivier 1990) mais ces évolutions n'ont que très peu pénétré la périnatalité. Au-delà de la mondialisation des innovations techniques, des ultrasons aux progrès de la génétique, nous avons étudié la façon dont, au travers des appropriations locales, le résultat défavorable d'un test est anticipé et « traduit » en termes de handicap futur pour l'enfant à naître.

Notre recherche inclut plusieurs étapes:

- une description et analyse comparative des contextes législatifs, réglementaires et culturels (France, Brésil et Pays-Bas) avec, pour objectif, d'étudier l'articulation fine entre les acteurs, les dispositifs, et la façon dont les différentes significations du handicap circulent et sont partagées ou controversées en anténatal. Elle est complétée par l'observation ethnographique de consultations de diagnostic prénatal, dans chacun des pays en vue d'une analyse qualitative. L'analyse des données qualitatives a été réalisée selon la Grounded Theory (Strauss et Corbin 1990).

- une analyse d'un corpus de questionnaires existant sur l'expérience de l'interruption de grossesse face aux pathologies fœtales telle qu'elle est vécue en France par les femmes, à deux époques différentes (1999-2005) dans une même institution, en lien avec les transformations législatives et l'évolution des pratiques. (Mirlesse.V 2011). L'analyse porte sur les paramètres décisionnels, les pratiques autour du deuil et la dépression post natale.

- une analyse des usages de l'échographie obstétricale à Rio de Janeiro au Brésil, dans un environnement où l'interruption de grossesse n'est pas légalement accessible en cas de pathologie fœtale non létale (Mirlesse.V 2013).

Cette étude fait également l'objet d'un financement ANR dans le cadre du programme « Sciences et savoirs en société » coordonné par Isabelle Ville (ANR-09-SSOC-026-01)

Résultats et Discussion

La description des contextes nationaux de l'organisation des pratiques de DPN dans chacun des pays est présentée tableau 1. [Les observations des consultations en France ouvre 3 pistes de réflexion:](#)

- La biomédicalisation de la médecine (Clarke 2002) est au cœur des pratiques de DPN, avec les avancées techniques (biologie et imagerie), les réglementations des pratiques (par les politiques, l'administration et les professionnelles) et leur standardisation grâce aux statistiques et technologies de l'information. La législation sur l'avortement est centrale et place les praticiens en juge de la « particulière gravité » et des limites de la « curabilité ».

- La seconde piste de réflexion concerne les différents usages de l'échographie fœtale dans les CPDPN en France : pratique holistique et intersubjective visant à « ne pas passer à côté » d'une pathologie syndromique (association malformative souvent associée à un retard mental) vs pratique standardisée et codifiée (signes d'appel) visant un calcul de risque.

- La troisième piste de réflexion porte sur la place des praticiens qui négocient ces nouvelles contraintes et ressources inhérentes aux transformations de la médecine dans le colloque singulier avec les femmes et les couples.

| | Naissances annuelles/ 2010 | Reconnaissance | Législation Interruption Volontaire de Grossesse - nombre/an | Législation Interruption Médicale de Grossesse | Dépistage 1 ^{er} trimestre | Ultrasons |
|----------|----------------------------|----------------|--|--|--|---|
| France | 832 759 | 2,01 | 220 000 | 7000 CPDPN/terme | Proposé et pris en charge | Environ 5/6 Enquête périnatale 2010 |
| Pays Bas | 184 000 | 1,8 | 28 000 | < 24 SA Absence de comptabilisation spécifique des anomalies fœtales | Proposé depuis 2007 Pris en charge pour les femmes à risque et/ou de plus de 36 ans. | 2/3 remboursées 10-12SA et 20 SA |
| Brésil | 2 747 000 | 1,94 | Clandestine Estimation 1 000 000 | Santé maternelle/ vio/ anencéphalie | Accès possible mais aucune prise en charge | Aucune recommandation officielle 1/3 mois accès libre mais payant |

Tableau 1

Leur priorité est la transmission des informations : jusqu'ou informer et de quelle manière sans risquer d'inquiéter. La plupart des cliniciens français que nous avons observés semblent être parvenus à gérer ces impératifs en mettant en avant la valeur de l'autonomie du patient, concernant au mieux la position du couple, pour les accompagner dans la voie choisie (poursuite ou interruption de grossesse).

Aux Pays-Bas, l'étape diagnostique est souvent présentée par les praticiens comme un « bénéfice » voire, un « privilège » : « Parce que vous êtes devenue enceinte par FIV et ICSI, vous avez le droit de faire plus d'exams que quelqu'un d'autre ». Par ailleurs, le terme de 24 semaines au-delà duquel l'interruption de grossesse n'est plus autorisée conduit parfois à délivrer une information brutale et à prescrire des examens complémentaires dans l'urgence, lorsque le délai se rapproche.

Un autre volet de l'analyse des consultations tant en France qu'aux Pays Bas, a porté sur l'information spécifiquement délivrée aux femmes dites « à risque » que le fœtus présente un risque de malformation, le plus souvent un syndrome de Down. Ces observations montrent une hypertrophie de l'information technique sur le risque, et les techniques, au détriment des autres aspects permettant de qualifier l'événement associé au risque, à savoir, la trisomie 21 et ses conséquences anticipées en termes de fonctionnalités et de handicap.

La comparaison en France, de deux séries de femmes en 1999 (n=103) et en 2005 (n=120) ayant répondu au même questionnaire, après qu'elles aient eu recours à une interruption de grossesse pour pathologie fœtale, montre une évolution significative dans le temps en faveur d'un partage de la décision d'interrompre entre équipes médicales et couples concernés. Cependant, quand la grossesse est avancée, que le pronostic fœtal est incertain ou à l'origine d'un retard mental, les femmes sont plus nombreuses à juger que la décision d'interruption leur revient. Par ailleurs, entre les deux séries, un nombre croissant de femmes souhaitent voir le corps de leur fœtus et procéder à des funérailles. Enfin, le taux de dépression du post partum après interruption pour pathologie fœtale est très supérieur comparé aux situations d'accouchement d'enfant vivant. Plus généralement, les résultats montrent une relation étroite et complexe entre le vécu des femmes et les évolutions sociopolitiques. Cette évolution peut sembler paradoxale: les femmes qui, en 1999 sollicitaient une décision plus autonome, et l'ont obtenue, grâce aux évolutions légales et d'organisation des soins, manifestent en 2005 le souhait d'une décision plus partagée avec les praticiens. Ces résultats soulignent la difficulté particulière de la décision en médecine fœtale où, contrairement à de nombreuses affirmations : « savoir n'est pas pouvoir ». L'information ne suffit pas.

Enfin, les observations réalisées dans les centres d'échographie privés et au centre de référence des malformations fœtales de l'Etat de Rio de Janeiro illustrent des usages nouveaux et non univoques de l'échographie. Elles ont permis d'identifier trois moments idéal-typiques du parcours des femmes enceintes pour lesquelles une anomalie du fœtus est diagnostiquée au Brésil. Le premier, avant la découverte de l'anomalie fœtale, concilie les impératifs de la biomédecine avec la culture locale qui fait l'éloge de la maternité et utilise l'imagerie pour anticiper la naissance sociale de l'enfant. Ce registre d'action, se trouve bouleversé brutalement lors de la découverte d'une anomalie fœtale. Le second moment idéal type se recentre sur la biomédecine. L'examen de référence privilégie le regard technique et la mise à distance du fœtus examiné. Mais alors que l'évocation de l'avortement n'est pas possible, les praticiens de l'hôpital public tentent d'éduquer les femmes pour leur permettre d'exercer leur autonomie en leur inculquant une compréhension de la situation selon les standards du raisonnement médical. Cette démarche représente pour les praticiens comme un premier pas vers une meilleure justice sociale. Circonscrite dans le temps, cette étape ouvre la porte au troisième moment idéal type, où l'image échographique se voit qualifiée devant la naissance annoncée de l'enfant qui, même malformé, n'en est pas moins acteur du défi de sa propre naissance. L'incertitude portée par l'outil échographique est soulignée comme une limite à la biomédicalisation du suivi de la grossesse face à la préoccupation de l'individu à naître et les enjeux du devenir mère.

Conclusions

Les aspects légaux de l'accès à l'interruption de grossesse dans le cadre des malformations fœtales conditionnent l'organisation des pratiques mais sont loin de résumer l'approche anténatale. Dans le contexte de la mondialisation des techniques et connaissances, l'approche biomédicale fait l'objet d'appropriation multiples et de dynamiques diversifiées selon les cultures et les modalités d'accès au soin. La place des praticiens et la voix des femmes et des couples concernés sont centrales et encore insuffisamment explorés dans cette étude de l'articulation entre médecine fœtale et handicap.

Bibliographie:

- Clarke, A.E., Mamo, L., Fishman, J.R., Shim, J. & Foskay, J.R. (2003) Biomedicalization: Technoscientific transformations of Health, illness, and U.S. Biomedicine. *American Sociological Review*, 68(2), 161-194.
- Mirlesse V, Perrotte F, Kieffer F, Ville I. Women's experience of termination of pregnancy for fetal anomaly: effects of socio-political evolutions in France. *Prenat Diagn*. 2011 Nov;51(11):1021-8.
- Mirlesse V, Ville I. The uses of ultrasonography in relation to foetal malformations in Rio de Janeiro, Brazil. *Social Science and medicine*. <http://authors.elsevier.com/sd/article/S0277735613002037> in press.
- Oliver, M. (1990). *The politics of disability*. London: Macmillan.
- Strauss, A., & Corbin, J. (1990). *Basics of qualitative research: Grounded theory procedures and techniques*. Newbury Park, CA: Sage Publications, Inc.
- Ville, I. Disability policies and perinatal medicine: the difficult conciliation of two fields of intervention on disability. *Alter European Journal of Disability Research*, 2011, 5(1), 16-25.

Version française : http://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/96/94/09/DF/Ville_2011.pdf

Journées de l'Agence
30-31 mai 2013

Les choix des personnes et couples à risque face aux tests génétiques et à l'intervention sur le vivant : le cas de la drépanocytose

Agnes LAINE (ALLT Étude et recherche)

La prévalence élevée de la drépanocytose, la souffrance des malades et le coût de la prise en charge ont motivé le développement d'une offre de prévention par le dépistage néonatal de la drépanocytose par lequel on dépiste les atteints et les hétérozygotes, le dépistage en population générale des adultes hétérozygotes et sur le dépistage prénatal (DPN) suivi (ou non) d'IMG. Le diagnostic préimplantatoire (DPI) est une alternative au DPN encore peu utilisée. Le constat est celui d'une adhésion très modérée des personnes à l'offre de prévention. Aussi le projet propose une étude des implications des techniques de dépistage et d'intervention sur le vivant pour les personnes à risque en France : la population concernée est originaire pour 1/3 des Antilles et pour près des 2/3 d'Afrique, ce qui motive une étude centrée sur cette pathologie et sur ces populations dont le parcours pose la question de la prise en compte des différences socioculturelles dans les dispositifs de prévention.

Ce programme comporte deux axes :

1) Une étude rétrospective des dépistages d'adultes hétérozygotes effectués au centre d'information et de dépistage de la drépanocytose (CIDDD), inauguré fin 2006. L'objectif est de mesurer les conséquences personnelles, sociales et familiales de ces dépistages, ainsi que leur efficacité. Cette partie du programme reposera sur des entretiens.

2) Une étude des implications du DPN, de l'interruption de grossesse voire du diagnostic préimplantatoire pour les couples à risque, reposant d'une part sur l'observation du conseil génétique et d'autre part sur l'analyse d'entretiens réalisés auprès de couples postérieurement à une naissance ou à une IMG consécutive à un conseil génétique. Nous étudierons notamment l'influence des représentations de la conception, de l'hérédité et de la filiation inscrites au cœur des religions africaines dans l'attitude des personnes concernées. Nous étudierons aussi les cheminements et les interactions sociales avec lesquels les couples construisent leur décision.

Cette étude sera faite sur 3 sites relevant des deux centres de référence français de la drépanocytose, Henri-Mondor, Robert-Debré et le Centre Guy Méréault de la Guadeloupe.

Les disciplines mobilisées : l'histoire, l'anthropologie, l'éthique et la psychologie en relation avec les disciplines médicales impliquées dans la prise en charge des couples à risque, devraient permettre de proposer des éclairages sur les liens entre société et prévention des naissances pathologiques ainsi que, le cas échéant, des aménagements aux fins d'optimiser la prévention dans le respect des conceptions religieuses et éthiques des personnes.

Publication :

Lainé A, Bardakdjian J, Prunelle F, Maroja FE, Quélet S, Girot R, et al. L'impact du dépistage du trait drépanocytaire en population. Une étude rétrospective au Centre d'information et de dépistage de la drépanocytose (Paris). *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*. 1 avr 2015;63(2):77-84.

Etude des facteurs moléculaires de non-disjonction ovocytaire, et nouvelles approches pour la réduction de l'aneuploïdie

Franck PELLESTOR (INSERM ADR 8 Montpellier)

Les erreurs de ségrégation (non-disjonctions) dans les ovocytes humains sont à l'origine de 90% des aneuploïdies, et il a été mis en évidence un lien direct entre l'âge maternel et la survenue de ces anomalies. Les recherches menées sur divers organismes ont permis d'identifier les protéines impliquées dans le contrôle de la ségrégation chromosomique au cours de la méiose, dont certaines pourraient devenir déficientes avec le vieillissement. Ainsi, l'aneuploïdie est prévenue par un système de contrôle de l'assemblage du fuseau de division, le système SAC (Spindle Assembly Checkpoint). De concert avec ce système, diverses protéines dont CENP-E et l'Aurora kinase B (Aurkb) contrôlent l'alignement des chromosomes sur le fuseau. De plus, d'autres protéines (Rec8, Sughoshin) s'associent aux chromosomes pour prévenir la séparation prématurée des chromatides sœurs durant la méiose. Chez l'homme, l'identité et le fonctionnement de ces facteurs moléculaires restent mal connus. Ce projet a pour but d'étudier 3 facteurs de ces mécanismes de contrôle de la ségrégation chromosomique dans l'ovocyte humain, en utilisant des techniques sophistiquées d'imagerie cellulaire, d'analyse chromosomique et génique, et de blocage de l'expression génique. Les 3 points étudiés seront : le fonctionnement du système SAC dans la méiose féminine et sa sensibilité à l'âge; le rôle des protéines CENP-E et Aurkb dans l'alignement des chromosomes; et le rôle des cohésines Rec8 et Sughoshin dans la prévention des séparations prématurées des chromatides et l'effet de l'âge maternel sur leurs fonctionnements.

Ce projet fournira une approche directe du déroulement de la méiose, et ainsi contribuera à une meilleure connaissance de la genèse des aneuploïdies et de sa relation avec l'âge. De plus, ce travail peut ouvrir la voie à de nouvelles approches pour la prévention des non-disjonctions et l'amélioration des protocoles d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP).

Publications :

1. Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hedon B, et al. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Human Reproduction Update*. 1 juill 2011;17(4):476-94.
2. Pellestor F, Puechberty J, Weise A, Lefort G, Anahory T, Liehr T, et al. Meiotic segregation of complex reciprocal translocations: direct analysis of the spermatozoa of a t(5;13;14) carrier. *Fertility and Sterility*. juin 2011;95(7):2433.e17-2433.e22.

Etude des facteurs moléculaires de non-disjonction ovocytaire et effet de l'âge maternel

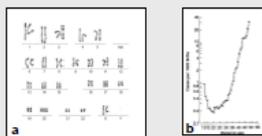
Franck Pellestor

Laboratoire de Génétique Chromosomique, Hôpital Arnaud de Villeneuve, CHRU de Montpellier, 34295 Montpellier, France

@: f.pellestor@chu-montpellier.fr

Objectifs

Dans l'espèce humaine, les anomalies chromosomiques constituent l'essentiel des anomalies observées à la naissance, ainsi que la principale cause de mortalité embryonnaire. Ces anomalies peuvent être transmises par le spermatozoïde ou l'ovocyte lors de la fécondation. Pour la plupart, ce sont des erreurs de transmission des chromosomes, appelées *non-disjonctions*, qui apparaissent préférentiellement lors de la formation des ovocytes humains. Il existe un lien direct entre l'âge maternel et la survenue de ces anomalies.



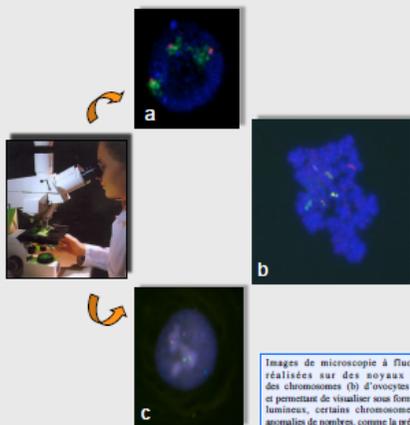
Caryotype d'une trisomie 20 (a) et diagramme de corrélation entre l'âge maternel et la fréquence des anomalies chromosomiques à terme (b)

L'étude de la formation et de l'étiologie de ces anomalies constitue une importante thématique de recherche. Nous avons été l'une des premières équipes à visualiser les chromosomes d'ovocytes et de spermatozoïdes humains, à identifier leurs anomalies chromosomiques et à analyser leur transmission.



Carvoxytes de spermatozoïde (a) et d'ovocyte humains (b)

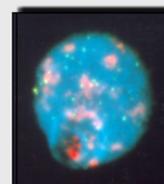
Aujourd'hui, des recherches menées sur divers organismes (bactéries, champignons, souris) ont permis d'identifier des protéines impliquées dans la régulation de la ségrégation chromosomique qui pourrait devenir déficiente avec le vieillissement maternel. Chez l'homme, l'identité et la fonction de ces facteurs moléculaires restent mal connues. Notre projet a pour but d'étudier ces mécanismes de contrôle de la ségrégation chromosomique dans l'ovocyte humain, en utilisant des techniques sophistiquées d'imagerie cellulaire et d'analyse de l'expression des gènes.



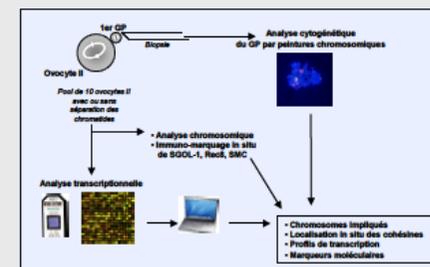
Images de microscopie à fluorescence réalisées sur des noyaux (a, c) et des chromosomes (b) d'ovocytes humains, et permettant de visualiser sous forme de spots lumineux, certains chromosomes, et des anomalies de nombres, comme la présence de 3 copies du même chromosome (a)

Approches expérimentales

Une première approche vise à localiser dans les noyaux d'ovocytes humains isolés, les chromosomes et les principales protéines participant à la mise en place des chromosomes sur le fuseau de division et à la ségrégation de ces chromosomes. Le choix s'est porté sur les chromosomes les plus fréquemment impliqués dans les trisomies (chromosomes 13, 16, 21), et pour lesquels l'effet de l'âge maternel sur la survenue des trisomies est clairement identifié. Les protéines détectées sont des molécules qui assurent le positionnement des chromosomes sur le fuseau de division (CENP-E, Aurkb) et le contrôle de leur ségrégation (Mad2, BubR1).



Co-marquage des chromosomes (en rouge) et de protéines nucléaires de régulation (en vert)



La deuxième partie du projet combine l'analyse chromosomique des ovocytes isolés avec l'analyse globale de l'expression des gènes de ces cellules, afin de réaliser une étude génétique approfondie (chromosomique + génique) des mécanismes de contrôle de la ségrégation chromosomique, en fonction de l'âge maternel.

Cette étude fournit une approche directe du déroulement de la méiose, et contribue à une meilleure connaissance de la genèse des aneuploïdies et de sa relation avec l'âge maternel. De plus, ce travail peut ouvrir la voie à de nouvelles thérapies pour le traitement de l'infertilité.

Impact de l'alimentation et du statut nutritionnel sur les troubles de l'ovulation : étude prospective multicentrique

Isabelle CEDRIN-DURNERIN (SAIC)

De nombreux facteurs environnementaux dont la nutrition et le style de vie sont susceptibles d'agir sur la fertilité. Le rôle du poids et des apports énergétiques sur la fonction ovulatoire est bien établi et des données récentes suggèrent également un rôle indépendant de la composition alimentaire sur le risque d'infertilité par troubles de l'ovulation. Ce risque semble en effet lié aux apports en hydrates de carbone, acides gras, protéines, vitamines et minéraux. Cependant le niveau de preuve des études réalisées à ce jour reste insuffisant et dans ces études, les troubles de l'ovulation sont le plus souvent mal définis alors que l'impact des facteurs nutritionnels pourrait différer selon leur type. Les troubles de l'ovulation les plus fréquemment rencontrés sont ceux liés à des anomalies du pool des follicules en croissance soit en nombre excessif (syndrome des ovaires polykystiques ou SOPK), soit au contraire en nombre insuffisant (insuffisance ovarienne débutante ou IOD). Ces anomalies de la réserve ovarienne sont évaluées en échographie par la mesure du compte des follicules antraux (CFA). Dans les pays industrialisés, la prévalence de ces troubles est croissante du fait de la conjonction d'une véritable épidémie d'obésité et d'un désir plus tardif de maternité. Il n'existe à ce jour aucune étude comparant les consommations alimentaires et le statut biologique nutritionnel de femmes en âge de procréer en fonction du statut ovulatoire et de la réserve ovarienne. Il n'est donc pas possible de préconiser une composition alimentaire optimale en cas de désir de grossesse. Nous évaluerons dans cette étude prospective multicentrique, les comportements alimentaires et l'apport en nutriments spécifiques de 3 groupes homogènes de 100 femmes infertiles, constitués de 2 groupes de femmes présentant un trouble de l'ovulation en rapport avec un SOPK ($CFA \geq 24$) ou une IOD ($CFA < 10$) et d'un groupe contrôle de femmes normo-ovulatoires ($10 \leq CFA < 20$). Le statut nutritionnel sera évalué par des mesures anthropométriques, une enquête alimentaire, un questionnaire d'hygiène de vie (activité physique, alcool, tabac, café ...) et un bilan sanguin. Celui-ci comportera des marqueurs biologiques et hormonaux de l'état nutritionnel, des marqueurs du stress oxydatif, des dosages de micro-nutriments notamment les acides gras insaturés, dont les acides oméga 3 et les folates ainsi que l'analyse du polymorphisme de l'enzyme clé du cycle des folates, la méthylène-tétrahydro-folate réductase (MTHFR). La mise en évidence de différences clinicobiologiques dans le statut nutritionnel entre les femmes normo-ovulatoires et les femmes présentant des troubles de l'ovulation permettra d'établir des recommandations adaptées selon le type de troubles afin de prévenir leur apparition ou permettre leur régression. D'autre part, ces résultats pourraient permettre de formuler les bases d'un futur essai d'intervention pour une prise en charge nutritionnelle associée aux traitements inducteurs de l'ovulation. Au même titre qu'une alimentation adaptée est capable de prévenir les maladies cardio-vasculaires et certains cancers, l'alimentation pourrait constituer un élément essentiel, mais largement négligé dans la prévention et la prise en charge de l'infertilité d'origine ovulatoire.

Assistance médicale à la procréation et risque de cardiopathies congénitales : étude en population

Babak KHOSHNOOD (Inserm, ADR Paris 6)

Objectif principal : Estimer le risque de cardiopathies congénitales associé à différentes méthodes d'AMP pour l'ensemble des cardiopathies congénitales, ainsi que pour des sous-groupes de malformations cardiaques et certaines cardiopathies spécifiques majeures isolées (ex. : transposition des gros vaisseaux, hypoplasie du cœur gauche, tétralogie de Fallot).

Méthodes : Deux sources de données seront utilisées pour ce projet : 1) le registre des malformations congénitales de Paris et 2) l'étude EPICARD (Etude sur le devenir des enfants porteurs de cardiopathies congénitales). Une étude cas-témoin en population sera réalisée pour évaluer le risque de cardiopathies congénitales en relation avec l'AMP. Les cas incluront l'ensemble des cardiopathies congénitales (incluant les sous-groupes des malformations et les malformations spécifiques majeures isolées) dans la base de données du Registre et celle de l'étude EPICARD. La définition des sousgroupes de cardiopathies congénitales se réalisera en consultation avec des cardiopédiatres impliqués dans l'étude EPICARD. Au total, environ 5000 cas de cardiopathies congénitales seront inclus. Le choix des témoins est un point clef de notre étude dans laquelle nous utiliserons d'autres témoins malformés de la base de données du Registre (cf. Méthodes dans la description du projet pour les critères de sélection des témoins). La variable prédictive principale, l'AMP, sera étudiée en quatre catégories : aucune, inducteurs seuls, FIV, et ICSI. Les variables considérées comme facteurs de confusion potentiels ou d'interaction incluent l'âge maternel, la parité et les facteurs socioéconomiques.

Résultats attendus : Vu le peu de données sur le risque de cardiopathies congénitales en relation avec l'exposition à l'AMP, notre étude peut fournir des informations sur le risque associé à l'AMP qu'il serait difficile (et même impossible) à obtenir dans une étude de type cohorte, étant donné les moyens nécessaires pour étudier de tels devenirs rares, surtout en ce qui concerne les sous-groupes de cardiopathies congénitales ou bien les malformations spécifiques majeures isolées.

Publications :

1. Tararbit K, Houyel L, Bonnet D, De Vigan C, Lelong N, Goffinet F, et al. Risk of congenital heart defects associated with assisted reproductive technologies: a population-based evaluation. *European Heart Journal*. 2 févr 2011;32(4):500-8.
2. Tararbit K, Lelong N, Thieulin A-C, Houyel L, Bonnet D, Goffinet F, et al. The risk for four specific congenital heart defects associated with assisted reproductive techniques: a population-based evaluation. *Human Reproduction*. 1 févr 2013;28(2):367-74.

Poursuite du suivi des enfants conçus par fécondation in vitro avec le diagnostic préimplantatoire (DPI)

Laurence FOIX-L'HELIAS (hôpital Saint-Louis)

Le diagnostic pré-implantatoire (DPI) permet de diagnostiquer des pathologies génétiques au stade embryonnaire et peut donc être considéré comme une forme de diagnostic prénatal très précoce. L'avantage de cette technique est d'éviter un diagnostic prénatal et son corollaire qu'est, le cas échéant, l'interruption médicale de grossesse (IMG) lorsque le fœtus est atteint. Depuis les premières grossesses obtenues après DPI, il y a près de 15 ans au Royaume-Uni, cette technique s'est répandue et a évolué. En France, le DPI est autorisé dans trois centres : l'hôpital Antoine BécclèreNecker (Clamart), le Centre Médico-Chirurgical et Obstétrical–C.M.C.O. (Strasbourg) et l'hôpital Arnaud de Villeneuve (Montpellier). Face à l'évolution de l'ensemble de ces techniques et aux manipulations de plus en plus importantes des gamètes qu'elles impliquent, les équipes médicales sont confrontées à de nombreux problèmes d'évaluation des pratiques et surtout d'analyse des éventuels retentissements possibles sur la santé des enfants. Un suivi clinique systématique des enfants nés après DPI a déjà été mis en place depuis 2001 et concerne aujourd'hui plus d'une centaine d'enfants conçus par DPI et ICSI et plus d'une cinquantaine d'enfants conçus par ICSI sans DPI. Cette étude a été financée dans le cadre du PHRC 2005 AOM 05040.

Les premiers résultats du suivi de cette cohorte ont fait l'objet d'une présentation orale lors du 8^{ième} congrès « International Symposium on Preimplantation Genetic Diagnosis » à Barcelone en avril 2008. L'objectif de cette enquête est de suivre la santé et le développement d'enfants nés après DPI dans les 3 centres qui utilisent cette technique de façon à avoir une cohorte nationale. Il s'agit d'une étude multicentrique de cohorte de type exposés / non exposés réalisée par une équipe multidisciplinaire (biologistes, obstétriciens, pédiatres et épidémiologistes). Le suivi est prévu jusqu'à l'âge de 8 ans avec un examen clinique ou un questionnaire à 1, 2, 5 et 8 ans. Une évaluation du développement de l'enfant par une psychologue est également prévue à 5 ans en utilisant le test de WPPSI-III (Echelles de WECHSLER). Des enfants conçus par ICSI (Intra Cystoplasmic Sperm Injection) seront également suivis comme témoins.

Les caractéristiques maternelles et néonatales seront recueillies à partir de questionnaires et des dossiers médicaux. Après la naissance, des questionnaires (à 2 ans et 5 ans) ainsi que le test de WPPSI-III réalisé par une psychologue à 5 ans, enfin des examens cliniques (à 1 an et 8 ans) permettront d'évaluer le développement somatique et psychomoteur de l'enfant ainsi que ses caractéristiques psychologiques et comportementales. Les données médicales seront enregistrées séparément des données nominatives auxquelles elles ne seront reliées que par un numéro d'anonymat. L'objet de cette demande est de permettre la poursuite de cette cohorte (poursuite du suivi des enfants déjà inclus et poursuite des inclusions pour les DPI à venir) dont les résultats sont importants pour l'évaluation des activités novatrices en AMP.

Publication :

1. Foix-L'Hélias L, Grynberg M, Ducot B, Frydman N, Kerbrat V, Bouyer J, et al. Growth Development of French Children Born after In Vitro Maturation. Chavatte-Palmer P, éditeur. PLoS ONE. 26 févr 2014;9(2):e89713.

Attitudes et représentations en matière d'assistance médicale à la procréation et génétique de la reproduction en France

Caroline MOREAU (ADR PARIS XI)

Contexte : L'émergence de la génétique de la reproduction, conduit à l'extension des champs d'application de l'AMP, jusqu'alors essentiellement réservées aux couples infertiles, à de nouvelles indications dont il reste à définir les contours. Ces évolutions, et la distance croissante entre les modalités dites « naturelles » de la reproduction humaine et les processus rendus possibles par l'innovation scientifiques, génèrent de nouvelles questions, éthiques, sociales et légales. Le recueil de données scientifiques sur ces enjeux, tant auprès des professionnels de santé que des usagers paraît plus que jamais essentiel pour enrichir le débat public.

Objectifs : Dans le contexte de la révision de la loi sur la bioéthique en 2009, l'objectif de cette étude est d'explorer les attitudes de la population concernant l'utilisation, les effets secondaires et la régulation de l'accès aux techniques de procréation médicalement assistées en France ainsi qu'à la pratique de tests diagnostics sur l'embryon ou le fœtus. L'étude sera conduite par une équipe de recherche pluridisciplinaire associant épidémiologistes, démographes et sociologues.

Méthodologie : L'étude est un volet spécifique d'un dispositif de recherche plus large, le projet FECOND, dont l'objectif général est d'explorer différents enjeux en santé sexuelle et reproductive du point de vue des acteurs impliqués (les professionnels de santé, les femmes et les hommes). L'originalité de cette démarche est d'intégrer pour la première fois, l'étude des représentations et attitudes de la population générale en matière d'AMP et génétique de la reproduction, à un cadre d'analyse pluri-thématique large. Ceci permettra à la fois de confronter ces attitudes à d'autres normes en matière de procréation (âge à la parentalité, nombre idéal d'enfant, attitudes vis-à-vis de l'IVG), et de les mettre en perspective avec les expériences reproductives des individus (tel que le recours aux traitements de l'infertilité) ainsi qu'avec leurs antécédents pathologiques graves ou chroniques.

Cette étude est un module spécifique de l'enquête FECOND réalisé en population générale. Il s'agit d'une enquête socio-épidémiologique quantitative auprès d'un échantillon aléatoire représentatif de la population générale vivant en France métropolitaine. Cette enquête sera conduite par téléphone auprès de 5000 femmes et 3000 hommes âgés de 15 à 49 ans. Le volet spécifique dédié aux représentations et attitudes en matière d'AMP et génétique de la reproduction consiste en une série de 12 questions.

Retombées attendues : Cette étude a vocation à constituer une première enquête nationale de référence sur le sujet, de manière à suivre ultérieurement l'évolution de ces représentations et pratiques dans le temps. Les données contribueront à éclairer et alimenter le dialogue entre la population, les acteurs politiques et les professionnels de santé autour des questions de santé publique liées à la reproduction humaine.

Endométriose I/II traitée et fertilité

Bernard HEDON (CHU Montpellier)

Justifications:

Au sein d'un couple infertile, l'endométriose légère et modérée, une fois traitée chirurgicalement, offre deux options thérapeutiques : la fertilité spontanée ou le recours à l'AMP avec IUI.

La question est posée dans la dernière publication de J.-L. Pouly [Pouly J.-L. Stérilité par endométriose. EMC, Gynécologie, 150-A-70, 2007] sur le sujet. Il cite : « Les IUI donnent des résultats non négligeables dans cette indication, particulièrement si elles suivent de près le traitement chirurgical. Faut-il commencer immédiatement après celui-ci ou peut-on raisonnablement attendre 6 à 9 mois ? Ce sont les deux options. Aucune étude ne permet de répondre à cette interrogation. »

Les prises en charge déjà existantes et leurs limites :

Plusieurs attitudes thérapeutiques dans le traitement de l'infertilité par endométriose de stade I/II :

- traitement chirurgical coelioscopique seul puis attente de 6 à 12 mois en fertilité spontanée avant de débiter la prise en charge en AMP. Les résultats de la fertilité spontanée paraissent encore insuffisants.
- traitement chirurgical coelioscopique et IAC d'emblée. Le bénéfice de la prise en charge directement après la chirurgie n'a jamais été évalué.
- IAC d'emblée sans traitement chirurgical préalable dans le cadre d'une infertilité inexplicée. Le diagnostic d'endométriose n'est alors pas fait. Le traitement chirurgical est nécessaire pour le diagnostic mais aussi le traitement initial de la maladie. Dans notre équipe, nous procédons toujours à une coelioscopie diagnostique et thérapeutique.

Objectifs :

Evaluer si les inséminations intra-utérines directement après traitement chirurgical de l'endométriose stade I/II apportent un avantage en termes de taux de grossesse et de délai d'obtention de la grossesse.

Matériel et méthodes :

Critères d'inclusion :

- âge : 18-36 ans inclus
 - infertilité primaire ou secondaire inexplicée
 - coelioscopie diagnostique montrant une endométriose stade I/II
 - consentement éclairé signé
 - couples répondant à toutes les conditions de réglementation de l'AMP
- #### Critères d'exclusion :
- âge < 18 ans et > 36 ans
 - antécédent de traitement de l'endométriose
 - antécédent de prise en charge en AMP
 - endométriose stade III/IV
 - toute cause d'infertilité autre que l'endométriose

Enveloppes de randomisation numérotées et tirées par ordre de numérotation, faites selon des tables de permutation aléatoires de quatre éléments. 2 bras randomisés :

- 1 bras: fertilité spontanée pendant 6 mois
- 1 bras: « prise en charge en AMP » en post-opératoire immédiat, avec 3 à 4 IUI dans les 6 mois.

Toutes les patientes bénéficieront d'un traitement chirurgical des lésions d'endométriose le plus total. L'inclusion dans l'étude se fait après cette chirurgie.

Les patientes appartenant au bras « prise en charge en AMP » seront revues 15 jours après le traitement chirurgical pour débiter un traitement par IUI couplé à une stimulation de l'ovulation selon les protocoles dans le service de médecine de la reproduction.

Tableau récapitulatif de suivi :

| | Visite 1: inclusion | Visite 2: à 1 mois 1/2 | Visite 3: à 8 mois |
|----------------------|---------------------|------------------------|--------------------|
| Consentement éclairé | X | | |
| Randomisation | X | | |
| Interrogatoire | X | X | X |
| Examen clinique | X | | |

Critères de jugement :

1. Critère principal

Obtention d'une grossesse intra-utérine objectivée à l'échographie pelvienne précoce (6-7 SA)

2. Critères secondaires

- Délai d'obtention de la grossesse
- Evaluation de la douleur
- Evolution de la grossesse
- Taux de grossesses biochimiques (dosage de BétaHCG qualitatifs > 1).
- Taux de grossesses ayant conduit à la naissance d'un enfant viable.

Nombre de sujets nécessaires :

68 patientes par groupe et 10% de pertues de vue, soit 150 personnes au total

Lieux de recherche et investigateurs :

L'étude se déroulera dans le service de gynécologie-obstétrique et médecine de la reproduction du CHRU Arnaud de Villeneuve à MONTPELLIER.

Les investigateurs ont tous les compétences requises pour inclure et traiter les patientes dans les meilleures conditions possibles.

Publication :

Foix-L'Hélias L, Grynberg M, Ducot B, Frydman N, Kerbrat V, Bouyer J, et al. Growth Development of French Children Born after In Vitro Maturation. Chavatte-Palmer P, éditeur. PLoS ONE. 26 févr 2014;9(2):e89713.

Validation finale du G-CSF Folliculaire comme biomarqueur non invasif du potentiel d'implantation embryonnaire

Nathalie LEDEE (ADR Villejuif)

Seuls 5% des ovocytes ponctionnés et 15 à 20% des embryons transférés aboutissent à la naissance d'un enfant en fécondation in vitro. La qualité ovocytaire principalement affectée par l'âge est le principal facteur limitant en reproduction humaine. Nous n'avons pourtant à l'heure actuelle aucun outil diagnostique (morphologique ou génétique) attestant de la qualité d'un ovocyte en termes de potentiel implantatoire. Basé sur les résultats de 3 études successives, le **G**ranulocyte-colony **S**timulating **F**actor (G-CSF) apparaît comme un biomarqueur immunologique du potentiel d'implantation. L'objectif de cette recherche est de savoir si la documentation du GCSF folliculaire permet effectivement d'augmenter les taux de grossesse évolutive dans une population de bon pronostic chez qui l'on souhaite limiter les risques de grossesses multiples tout en assurant une chance de succès maximale. Il est donc nécessaire (1) de valider la sensibilité et la spécificité d'un prototype ELISA pour une utilisation en routine et (2) de confirmer que le G-CSF folliculaire est un biomarqueur non invasif du potentiel d'implantation de l'ovocyte correspondant selon un mode prospectif, multicentrique, randomisé en double aveugle.

La première étape consiste à tester le prototype de dosage du G-CSF dans les centres ayant participé aux recherches préliminaires et dont le profil immunologique est déjà documenté par Luminex. En effet, le coût et la complexité de la technologie Luminex limitent son utilisation en routine. Une SME MITHRA (partenaire 3) développe un prototype adapté à l'usage en routine que le réseau clinique (partenaire 2) testera. Les résultats attendus sont de reproduire la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives positives et négatives du G – CSF, évaluées par Luminex.

La seconde étape est le protocole prospectif, multicentrique randomisé évaluant l'utilité du dosage en routine de la concentration du G-CSF folliculaire pour le choix du seul embryon à transférer pour le Single Embryo Transfer, après consentement éclairé. Pour harmoniser la méthodologie dans le réseau clinique, tous possèdent la même infrastructure informatique pour le recueil de leurs données cliniques et biologiques. Une formation validant les techniques d'utilisation du prototype Elisa sera effectuée sur chaque site. Les données anonymes sont transférées sur un serveur sécurisé pour leur interprétation à la fin de la période d'inclusion.

Publications :

1. Lédée N, Munaut C, Sérazin V, d'Hauterive SP, Lombardelli L, Logiodice F, et al. Performance evaluation of microbead and ELISA assays for follicular G-CSF: a non-invasive biomarker of oocyte developmental competence for embryo implantation. *Journal of Reproductive Immunology*. nov 2010;86(2):126-32.
2. Ledee N, Gridelet V, Ravet S, Jouan C, Gaspard O, Wenders F, et al. Impact of follicular G-CSF quantification on subsequent embryo transfer decisions: a proof of concept study. *Human Reproduction*. 1 févr 2013;28(2):406-13.

Le G-CSF Folliculaire est-il un biomarqueur prospectif non invasif du potentiel d'implantation embryonnaire ?

Nathalie Lédée MD, PhD

Equipe INSERM UMRS 782: « Implantation et Dialogue Cytokinique Mère-Conceptus », Hopital Antoine Béchère clamart



Introduction

La qualité ovocytaire reste un facteur majeur limitant le succès des traitements de procréation médicalement assistée (PMA). Seuls 5% des ovocytes collectés en PMA et 20 à 25% des embryons transférés conduiront à une naissance. L'analyse de la morphologie ovocytaire est faiblement discriminante et permet principalement une sélection négative. L'observation morphologique séquentielle des embryons, bien qu'efficace, reste peu discriminative du potentiel d'implantation. Parvenir à documenter la qualité et la compétence des ovocytes dont ils sont issus est donc requise pour améliorer le choix des embryons à transférer est donc un enjeu majeur. Dans le cadre de recherche sur les mécanismes de l'implantation embryonnaire, nous avons découvert que la mesure du Granulocyte-Colony Stimulating Factor dans des fluides folliculaires individualisés (FF G-CSF) permettait de documenter la compétence ovocytaire aussi bien en cycles naturels et stimulés. Les concentrations du FF G-CSF évalué en microbilles (Luminex Map Technology, Bio-Rad) prédisent significativement le potentiel d'implantation de l'embryon correspondant et ceci indépendamment de la morphologie embryonnaire. L'objectif de cette nouvelle étude est d'évaluer l'impact potentiel du dosage individuel du G-CSF sur la politique de transfert d'embryons- à savoir si cette information modifierait le choix de l'embryologiste de transférer en frais, congeler ou détruire les embryons correspondants.

Matériels et méthodes- résultats

Au CPMA de l'Université de Liège, entre mai 2008 et mai 2010, les traitements réalisés pour ICSI chez 78 patientes ont permis d'analyser 523 FF individuels d'ovocytes ayant donné 116 embryons transférés frais, 278 embryons congelés dont 80 seront secondairement transférés, et 131 embryons détruits et donc non transférés. Nous confirmons que le FF G-CSF est prédictif de la survenue d'une implantation: l'aire sous la courbe ROC évaluant le pouvoir discriminant du FF G-CSF à prédire une grossesse évolutive, après analyse multivariée atteint 0.77 ([0.69-0.83]- $p < 0.001$) alors qu'elle atteint seulement 0.66 ([0.58-0.73] $p = 0.01$) pour l'observation morphologique des embryons. Afin d'évaluer l'impact combiné du FF G-CSF et du score morphologique de l'embryon, nous avons catégorisé le FF G-CSF en 3 classes : 1 si > 30 pg/ml (la plus haute valeur prédictive positive pour l'implantation), 2 si < 30 pg/ml et $> 18,4$ pg/ml, et 3 si $< 18,4$ pg/ml (la plus grande valeur prédictive négative pour l'implantation) et ABC pour la morphologie.

Les embryons issus d'ovocytes de classe 1 pour le FF G-CSF ont un taux d'implantation de 36% alors qu'il décroît à 16% pour les classes II et 6% pour les classes III. De manière cohérente, les embryons de classe I pour le G-CSF et de qualité morphologique optimale atteignent des taux d'implantation de 54% ($p < 0.001$) alors qu'un embryon de même morphologie mais Classe III pour le G-CSF restera à 8% de taux d'implantation (fig.1). La moitié des grossesses gémeillaires sont survenues grâce au transfert de 2 embryons A pour la morphologie- Classe I pour le G-CSF. Ces grossesses gémeillaires auraient donc pu être prévenues.

Un choix non optimal a été réalisé chez 24% (24/78) des patientes aboutissant à une diminution des taux de grossesses de 38% à 12% ($p = 0.02$) entre les patientes avec choix optimal versus non optimal si l'on tient compte du FF G-CSF.

L'hypothèse est que l'on observerait une augmentation relative de 35% de taux de grossesse par un choix éclairé par la connaissance du FF G-CSF en ce qui concerne l'embryon à transférer.

Pour les embryons congelés, seuls 35% des embryons congelés viennent d'un follicule de Classe I et 15% de classe III. Les taux d'implantation observés pour les embryons congelés au décours de leur décongélation étaient de 35 % pour les Classe I, 9 % pour les Classe II et 3 % pour les Classes III (Fig.2).

En ce qui concerne les embryons détruits, 10% d'entre-eux étaient de Classe I pour le G-CSF malgré une morphologie mauvaise.

Pour 5 patientes (6%), l'embryon au plus haut potentiel a été détruit et ne

l'aurait sans pas été.

Fig 1: Répartition des embryons en fonction de leur concentration de G-CSF et leurs taux implantatoires correspondants

| FF G-CSF (pg/ml) category | Nombre D'embryons | Taux d'implantation rate (12 SA) | FF G-CSF (A-B-C) Et type d' Embryon (A-B-C) | Nombre D'embryons | Taux d'implantation rate (12 SA) |
|---------------------------|-------------------|----------------------------------|---|-------------------|----------------------------------|
| I > 30 pg/ml | 59 | 36.4%** | IA | 27 | 53.7%** |
| | | | IB | 14 | 28.5 % |
| | | | IC | 18 | 16.6 % |
| II 18-30 pg/ml | 105 | 16.8 % | IIA | 36 | 19.4 % |
| | | | IIB | 28 | 16 % |
| | | | IIC | 41 | 14% |
| III < 18 pg/ml | 31 | 6% | IIIA | 15 | 6% |
| | | | IIIB | 6 | 8% |
| | | | IIIC | 10 | 3% |

** $p < 0.001$ entre les catégories I versus II and III

Fig.2: Taux d'implantation des embryons congelés- décongelés et transférés en fonction de leur concentration de G-CSF folliculaire

| FF G-CSF des embryons congelés- décongelés et transférés | Nombre d'échantillons Analysés | Taux d'implantation (12 SA) |
|--|--------------------------------|-----------------------------|
| Catégorie I > 30 pg/ml | 21 | 35.7% *** |
| Catégorie II 18-30 pg/ml | 45 | 8.6% |
| Catégorie III < 18 pg/ml | 14 | 3% |

$P < 0.0001$ between Category I versus Category II and III

Conclusion

La mesure du FF G-CSF pourrait, en améliorant la connaissance de la potentialité des embryons générés

(1) augmenter de 35% les taux d'implantation au premier transfert d'embryon frais en PMA,

(2) permettre un meilleur contrôle des grossesses multiples dont les impacts sur la morbidité maternelle et foetale sont démontrés

(3) réduire le nombre d'embryons cryopréservés à ceux conservant une potentialité tout en sauvegardant certains embryons destinés à la destruction selon leur simple morphologie.

L'utilisation clinique d'un tel biomarqueur pourrait réduire le temps nécessaire à l'obtention d'une grossesse, et permettre dès lors l'économie à la fois d'énergie, et de

coûts, engendrés par des cycles inutiles.

Défauts de fermeture du tube neural et molécules donneur de méthyle : approche biochimique et moléculaire

Bénédicte GERARD (hôpital Robert Debré)

Les défauts de fermeture du tube neural (DFTN) regroupent le spina bifida, l'encéphalocèle et l'anencéphalie. Ils constituent la plus fréquente des malformations fœtales après les malformations cardiaques, touchant 1 fœtus sur 1000 et jusqu'à 1 % des conceptus. De rares cas de transmissions monogéniques sont à l'origine de ces DFTN. D'autres causes impliquant à la fois des facteurs de prédisposition génétique et des carences nutritionnelles (notamment en acide folique et en choline) seraient à l'origine de la plupart de ces cas non familiaux. Le mécanisme moléculaire à l'origine des DFTN reste aujourd'hui largement inconnu. En particulier, aucun lien n'a été à ce jour recherché entre DFTN et anomalie de méthylation de l'ADN.

Nous proposons de tester l'hypothèse suivante : ces malformations pourraient être liées à la présence d'un stock ovocytaire insuffisant en molécules donneur de méthyle et notamment en Sadenosylméthionine (SAM). Ce défaut de stock initial, constitué avant la conception du zygote, pourrait être responsable d'une hypométhylation de l'ADN, de protéines (notamment des histones) et de lipides au cours des premières divisions cellulaires et donc d'un défaut de la mise en place de la régulation épigénétique de gènes impliqués dans l'embryogenèse précoce. En effet, les premiers stades de développement embryonnaire se déroulent avant la mise en place d'un placenta et d'une circulation embryonnaire fonctionnelle : la vague de reméthylation de l'ADN à partir du 8^{ème} jour de développement puiserait donc directement dans le stock de S adénosyl méthionine disponible dans les cellules fœtales. L'hypométhylation de l'ADN et/ou des histones perturberait alors le processus de différenciation cellulaire et pourrait ainsi expliquer la genèse des DFTN.

Objectifs : Etude du lien entre DFTN et carence ovocytaire en SAM

Méthodologie : Nous souhaitons évaluer, par méthodes biochimiques et génétiques, le stock de donneur de méthyle présent dans les tissus de 20 couples mère/fœtus présentant un DFTN, comparativement à des couples mère/fœtus contrôles. Le dosage biochimique de différentes molécules (SAM, phosphatidylcholine, bétaine, choline, créatine ...) et vitamines (ac folique, vit B12) impliquées dans les processus de méthylation sera effectué sur les prélèvements maternels et fœtaux réalisés au moment de l'IMG. L'hypométhylation de l'ADN sera recherchée par des méthodes basées sur le traitement au bisulfite de l'ADN : une étude globale de l'état de méthylation des promoteurs de 27.000 gènes sera réalisée sur puce à ADN et la méthylation des CpG des promoteurs de gènes de développement, connus pour être inactivés précocement sera étudiée par séquençage.

La compréhension du mécanisme moléculaire impliquée dans la genèse de ces malformations permettra de mieux cibler les femmes potentiellement à risque pour de telles malformations et donc pourra permettre à terme de réduire l'incidence des DFTN par une prévention mieux adaptée.

Diagnostic prénatal non invasif de l'achondroplasie

Jean-Marc COSTA (Laboratoire Pasteur Cerba)

Objectifs :

Développement et validation clinique d'un test de génétique moléculaire non invasif pour le diagnostic prénatal de l'achondroplasie à partir du sang maternel par analyse et l'ADN fœtal circulant.

Ce test reposera sur :

- Une méthode d'enrichissement de l'ADN fœtal plasmatique déjà évaluée
- Une méthode fiable et sécurisée (automatisée) de l'extraction des acides nucléiques déjà évaluée
- Une méthode de détection fiable et sensible de mutations ponctuelles par PCR en temps réel (complétée si nécessaire par la validation et identification de la mutation détectée par une méthode de mini-séquençage) incluant le contrôle de la présence d'ADN fœtal dans l'échantillon analysé.

La méthode proposée s'inspire des tests développées par notre laboratoire dans le cadre de la recherche de mutations « somatiques » (gènes *KRAS* et *JAK2*) et dont le niveau de sensibilité habituel (de l'ordre de 1 à 2 % d'allèles mutés au sein d'un génome « normal ») est compatible avec les caractéristiques de l'ADN fœtal circulant, représentant environ 3 à 5 % de l'ADN circulant.

Résultats attendus

Définition de la sensibilité et de la spécificité du test après étude comparative des résultats obtenus à partir d'un tissu de référence. Le diagnostic prénatal de l'achondroplasie est essentiellement échographique. Toutefois, la preuve formelle de ce diagnostic est génétique. De l'ADN fœtal circulant dans le sang des femmes enceintes, il devrait être envisageable de mettre en évidence l'anomalie moléculaire quasi-unique du gène *FGFR3* à des fins de confirmation biologique du diagnostic évoqué évitant ainsi le recours à un geste invasif.

Méthodologie

Etude multicentrique nationale non interventionnelle

Dépistage génétique des dysfonctions de la jonction neuromusculaire dans les syndromes d'akinésie fœtale

Damien STERNBERG

Objectifs :

Récemment, des anomalies de gènes de la voie du récepteur musculaire à l'acétylcholine (RAch) ont été identifiées dans des séquences d'akinésie fœtale létale (Syndrome léthal des ptérygiums multiples) et non létale (Syndrome d'Escobar). A ce jour, des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites ont été rapportées dans les gènes CHRNA, CHRND, CHRNG et RAPSN, dans des akinésies fœtales. Les atteintes génétiques de la jonction neuromusculaire sont décrites depuis plus longtemps chez l'enfant et l'adulte où elles occasionnent des syndromes myasthéniques congénitaux. Elles sont dues à des mutations des gènes des sous-unités du récepteur ou de protéines impliquées dans la régulation des récepteurs (rapsyne, musk, dok7), ou encore pour certaines à des mutations affectant des constituants synaptiques ou présynaptiques (COLQ, CHAT). Les séquences d'akinésie fœtales représentent 1 grossesse sur 5000 environ, dont une majorité de formes sans diagnostic précis compatibles avec une cause neurogène ou myogène. 30 % des formes sans diagnostic précis seraient plutôt de type myopathiques, mais 70 % sont compatibles avec une atteinte nerveuse ou de la jonction neuromusculaire. Notre étude a pour but de préciser la contribution des atteintes génétiques des gènes du récepteur nicotinique musculaire et de sa voie de régulation à ces formes sans diagnostic précis, et de fournir ainsi un diagnostic et un conseil génétique à un certain nombre de couples concernés.

Résultats attendus :

Un nombre variable de ces syndromes d'akinésie fœtale sans diagnostic se révéleront probablement être dus à des atteintes précoces, génétiquement déterminées, récessives, ou dominante de novo, de la jonction neuromusculaire.

Un conseil génétique basé sur des données moléculaires interprétables pourra être fourni à un certain nombre de couples.

Méthodologie :

Les cas d'akinésie fœtale seront analysés méthodiquement documentés à la recherche des différentes étiologies. Les cas demeurant sans diagnostic et compatibles avec une atteinte de la jonction neuromusculaire seront étudiés à la recherche de mutations des gènes du récepteur nicotinique musculaire et de sa voie de régulation.

Les gènes analysés seront les gènes du récepteur à l'acétylcholine et de sa voie de régulation.

Les anomalies recherchées seront de type mutation ponctuelle, détectable par PCR-séquençage. Le séquençage sera direct, bidirectionnel, et concernera de produits d'amplification couvrant les régions codantes, les jonctions intron-exon et le promoteur des gènes.

L'interprétation des variations de séquence ponctuelles retrouvées se fera selon le type de variant ponctuel retrouvés et l'analyse de ségrégation. Certains seront clairement pathogènes et pourront être informatives pour un conseil génétique ; d'autres feront l'objet d'études supplémentaires (étude ARN, étude dans des systèmes d'expression) afin de statuer sur leur rôle physiopathologique.

Poster

Arthrogryposis Multiplex Congenita and Fetal Akinesia Deformation Sequence : 5 Cases with Mutations in Acetylcholine Receptor and Neuromuscular Junction Genes



Travail coordonné par : Laboratoire de Cardiogénétique et Myogénétique, APHP (P. Richard)
Travail effectué en lien avec : Fédération des Centres de Référence des Anomalies du Développement (FECLAD)
Société Française de Foetopathologie (SOFFOET)

S. Whalen (1) M. Gonzales (2,3) A. Laquerrière (4,5) S. Quijano-Roy (6) A.L. Delezoide (7,8) F. Giuliano (9), P. Richard (10) A. Le Bail (10) B. Hainque (10,11) A. Chevallier (12) E. Bieth (13), D. Avila-Smirnov (6) D. Héron (1) D. Sternberg (10)

(1) Département de Génétique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, France, (2) Unité de Pathologie Foetale et Placentaire, Service de Génétique et d'Embryologie Médicales, Hôpital Armand Trousseau, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, France, (3) UFR de Médecine, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, (4) Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpital Charles Nicolle, CHU Rouen, (5) UFR de Médecine et de Pharmacie, Université de Rouen, France, (6) Service de Pédiatrie, Réanimation et Réhabilitation Infantiles, Hôpital Raymond Poincaré, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, France, (7) Unité de Foetopathologie, Service de Biologie du Développement, Hôpital Robert Debré, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, France, (8) UFR de Médecine, Université Denis Diderot, Paris, France, (9) Service de Génétique Médicale, Centre de Référence des Anomalies du Développement et Syndromes Malformatifs, CHU de Nice, France, (10) Service de Biochimie Métabolique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, France, (11) Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université René Descartes, Paris (12) Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU de Nice, France, (13) Service de Génétique Médicale, Hôpitaux de Toulouse, France

Introduction

Antenatal NMJ defects may cause arthrogryposis multiplex congenita (AMC) and fetal akinesia deformation sequence (FADS). Neuromuscular junction (NMJ) and acetylcholine receptors (AChR) are functional as early as 5 weeks of pregnancy (wp). AChRs contain a specific antenatal gamma subunit encoded by *CHRNA1* gene (gamma-epsilon switch). Other components of NMJ and AChRs are expressed in antenatal as well as in postnatal period. *CHRNA1* mutations are responsible for non-lethal (Escobar) or lethal multiple pterygium syndrome (MPS), which is a variety of AMC. Severe mutations in other NMJ genes (*CHRNA1*, *CHRNA2*, *RAPSN*, *DOK7*) are responsible for lethal fetal akinesia (FA) or multiple pterygium syndrome (LMPS).

Patients and Methods

We analysed samples from 61 independent cases with arthrogryposis or FADS with no definite cause at clinical or foetopathological examination. We categorized cases according to age and severity.

- 12 living patients were aged more than 3 years, they had AMC but no evidence of active myasthenia and no need for vital support (group 1)
- 12 patients were alive but younger than 3 years or still needing vital support (group 2)
- 6 patients were born with AMC and possibly myasthenia but needed vital support and deceased at a young age (group 3)
- 31 foetuses were diagnosed with FADS leading to termination of pregnancy (TOP) or death *in utero* (group 4)

We sequenced *CHRNA1* in group 1 patients with no evidence of active myasthenia. We sequenced *CHRNA1*, *CHRNA2*, *CHRNA3*, *CHRNA4*, *CHRNA5*, *CHRNA6*, *CHRNA7* and *MUSK* genes in groups 2, 3 and 4.

In group 1, two living patients with AMC were diagnosed with *CHRNA1*-related Escobar syndrome (biallelic *CHRNA1* mutations). In group 4, three foetuses had clearly pathogenic mutations in NMJ genes (*CHRNA1* : 1 ; *DOK7* : 1 ; *CHRNA2* : 1)

Figure 1 : Two Children with AMC and *CHRNA1* mutations

***CHRNA1* mutations
(compound heterozygotes) :**

- c.631C>T (p.Arg189X)
/ c.753-754delCT (p.Pro229Profs45X)
- c.459dupA / IVS8-24/-17 del 8 nt



- 12 year old girl
- 18 year old boy

Both present with :

- Arthrogryposis multiplex
- Multiple pterygiums
- Kyphoscoliosis
- Facial dysmorphism
- Short stature

In addition, the girl had cleft palate

Figure 2 : Three Foetuses with FADS (one with *CHRNA1*, one with *CHRNA2* and one with *DOK7* mutations)

| <i>CHRNA1</i> mutations (compound heterozygote) : c.459dupA homozygote | <i>DOK7</i> mutation (heterozygous) : c. 1124_1127dup (p.Ala378SerfsX30) | <i>CHRNA2</i> mutation (homozygous) : c.270 G>A p.Trp90X |
|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Male foetus • TOP at 16 WG • Cystic Hygroma • Arthrogryposis • Multiple Pterygiums • Hypotrophy • Facial dysmorphism • Pleural effusion | <ul style="list-style-type: none"> • Female foetus • TOP at 24 WG • Arthrogryposis • Multiple Pterygiums • Hypotrophy • Micrognathia • Pulmonary hypoplasia • Median cleft palate • Hydramnios | <ul style="list-style-type: none"> • Female foetus • Death in utero at 25 WG • Giant Cystic Hygroma • Hydrops Fetalis • Arthrogryposis • Multiple Pterygiums • Hypotrophy • Facial dysmorphism • Pleural effusion |

Table 1 : Frequency of Involvement of NMJ and AChR genes in FADS and AMC with Undefined Cause

| Nr of cases studied | German study (Michalk, Hoffmann, Mundlos...) | English study (Morgan, Vogt, Maher...) | Our study | Synthesis of the three studies | | |
|----------------------|---|---|-----------|--------------------------------|-------|-------|
| | 70 | 21 | | 152 | | |
| Nr of positive cases | <i>CHRNA1</i> | 10 | 6 | 3 | 19 | 11,9% |
| | <i>RAPSN</i> | 1 | 1 | 0 | 2 | 1,3% |
| | <i>CHRNA2</i> | 2 | 0 | 0 | 2 | 1,3% |
| | <i>CHRNA3</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 0,6% |
| | <i>CHRNA4</i> | 2 | 0 | 0 | 2 | 1,3% |
| | <i>DOK7</i> | nd | 1 | 1 | 2 | 1,3% |
| All NMJ genes | 15 | 8 | 5 | 28 | 17,5% | |

Conclusion

- AChR and other NMJ genes account for a small but significant number of AMC and FADS cases without definite cause
- At first analysis, no specific feature orientate towards an AChR or NMJ genetic dysfunction that can be searched for in the absence of elements that orientate towards other defined cause (e.g. central or peripheral nervous system, myopathy, etc...)
- A French Clinical Research Hospital Project (PHRC) is under way to identify other genetic causes for AMC and FADS and refine their diagnostic algorithm (Pr Judith Melki)

Contact and further information :

- Inclusion of patients in PHRC : Judith Melki (judith.melki@inserm.fr)
- Genetic counselling : Sandra Whalen (sandra.whelen@psl.aphp.fr)
- Clinical and therapeutic issues : Pierre-Simon Jouk (psjouk@chu-grenoble.fr)
- Foetopathologic expertise : Annie Laquerrière (annie.laquerriere@univ-rouen.fr) – Marie Gonzales (marie.gonzales@trs.ap-hop-paris.fr)
- Molecular Genetics Diagnosis for NMJ genes : Damien Sternberg (damien.sternberg@psl.aphp.fr)

Extension de validation clinique d'une méthode non invasive de DPN de l'amyotrophie spinale

Patrizia PATERLINI-BRECHOT (Institut Necker)

L'objectif principal de ce projet est une étude de validation clinique de phase 3, en analogie avec les protocoles de validation clinique thérapeutiques (1), d'une méthode non invasive de diagnostic prénatal de l'amyotrophie spinale (SMA) par analyse des cellules fœtales circulantes, après sa validation clinique déjà réalisée avec succès en novembre 2007 (2). Il s'agit d'une application de la méthode contrôlée à 33 couples à risque d'avoir un enfant atteint de la maladie, en collaboration avec le laboratoire de génétique médicale. Le sang des femmes incluses dans cette étude, et ayant donné leur consentement éclairé, sera prélevé (20 ml) et envoyé à notre laboratoire (INSERM Unité 807/Laboratoire de Biochimie A Hôpital Necker, Paris). Nous allons ensuite isoler les cellules susceptibles d'être des cellules fœtales circulantes, analyser leur génome pour vérifier leur nature fœtale (par leur génotypage à l'aide de marqueurs microsatellites) et effectuer l'analyse génétique par étude indépendante de au moins dix cellules fœtales circulantes par mère, appliquant la méthode précédemment décrite (2). Le Laboratoire de Génétique Médicale effectuera le diagnostic prénatal. L'ouverture de l'aveugle permettra de comparer les résultats de la méthode non invasive avec ceux de la méthode invasive (par biopsie des villosités choriales).

Préservation de la fertilité : évaluation de 2 protocoles congélation lente et vitrification d'ovaires humains entiers

Bruno SALLE (INSERM ADR LYON)

L'objectif de cette recherche est de transposer nos acquis en cryobiologie ovarienne chez l'animal à l'espèce humaine. Des ovaires de femmes jeunes seront prélevés au cours de coelioscopies avec leurs pédicules lombo-ovariens sur une longueur de 10 cm, ces jeunes femmes doivent être opérées pour une chirurgie de transsexualisme et leurs ovaires sont considérés comme des déchets opératoires.

Méthodologie : Pour chaque femme deux ovaires seront prélevés. Un sera immédiatement fixé pour les analyses histologiques ultérieures. L'autre sera soit congelé à l'aide d'un protocole de congélation lente, soit vitrifié grâce à la solution de vitrification de Fahy (VM3). Les ovaires seront immédiatement lavés avec une solution de sérum physiologique et de l'héparine. Puis perfusés à travers l'artère avec la solution de cryoprotecteurs (DMSO 2M et BM1, plus 10 % de sérum de veau fœtal). Pour la vitrification la solution est une solution croissante du cryoprotecteur (VM3, solution vendue par Fahy et qui contient des molécules appelées super ice cooling molecules). Les perfusions au cours des deux protocoles sont réalisées grâce une pompe péristaltique (Watson Marlow) à la vitesse de 0,35 ml/mn durant 10 mn. Puis l'ovaire dans le protocole lent est congelé grâce à un protocole de congélation lente (Seeding semi automatique à - 7°C). Dans le p rotocol de vitrification l'ovaire sera immédiatement plongé dans l'azote liquide. Un mois après la congélation les ovaires seront réchauffés et décongelés puis fixés pour les analyses histologiques, des tests de viabilité de bleu trypan, dosage de la LDH et recherche de la fragmentation de l'ADN des follicules primordiaux par la méthode Tunel. Nous évaluerons la fonctionnalité des follicules par un système de culture tissulaire du cortex ovarien et l'immunomarquage de l'AMH et du GDF9 dans les follicules.

Résultats attendus : L'objectif final de ce travail est de transposer les résultats obtenus chez l'animal à l'espèce humaine. Nous voulons évaluer la toxicité des cryoprotecteurs et des protocoles de cryopréservation en termes de survie des follicules primordiaux. La conservation de l'organe entier et de son pédicule vasculaire permettra, dans le cadre de protocole de préservation de la fonction ovarienne, de stocker un maximum de follicules primordiaux. Elle permettra aussi lors des transplantations futures de restaurer immédiatement la vascularisation évitant la période d'ischémie au cours de laquelle nous savons qu'a lieu le maximum de perte folliculaire.

Publications :

1. Torre A, Brahim FB, Popowski T, Boudjenah R, Salle B, Lornage J. Factors related to unstained areas in whole ewe ovaries perfused with a metabolic marker. Hum Reprod. 2 janv 2013;28(2):423-9.
2. Torre A, Momier M, Mazoyer C, Selva J, Salle B, Lornage J. Validation of a new metabolic marker to assess the vascular viability of vitrified whole sheep ovaries. Human Reproduction. 1 juin 2012;27(6):1811-21.