

**Résumés des projets de recherche financés dans le cadre de l'appel d'offres
2017 « AMP, Diagnostic prénatal et diagnostic génétique »**

| Chercheur | Institution et Ville | Sujet de recherche | Thème | Subvention allouée |
|-------------------------------|---|---|-------|--------------------|
| BEZIEAU Stéphane | Institut de biologie de Nantes | Modélisation in vivo pour le diagnostic génétique des déficiences intellectuelles syndromiques | 3 | 27 000 € |
| BUFFIN-MEYER Bénédicte | INSERM U1048, CHU de Toulouse | METAPhOR : METabolome Amniotique pour la Prédiction de la fonction Rénale postnatale | 3 | 22 500 € |
| CALMELS Nadège | Diagnostic Génétique STRASBOURG | Intérêt du séquençage haut débit des ARN pour le diagnostic des maladies génétiques hétérogènes | 3 | 13 500 € |
| CHRISTIN-MAITRE Sophie | Médecine de la reprod; Hôp Saint-Antoine | Analyse en NGS des points de cassures dans des remaniements chromosomiques chez les femmes avec une insuffisance ovarienne prématurée | 3 | 10 000 € |
| COSSEE Mireille | EA 7402 Génét Mol, CHU Montpellier | Comparaison et optimisation de kits de séquençage d'exome complet pour le diagnostic des myopathies et dystrophies musculaires | 3 | 22 500 € |
| COUTTON Charles | Labo de génétique chromosomique CHU de Grenoble | Intérêt du séquençage exomique dans le diagnostic génétique des patients globozoospermiques DPY19L2 négatifs | 3 | 23 000 € |
| DURR Alexandra | ICM CNRS UMR7225 La pitié - Paris | L'information à la parentèle dans les maladies dominantes neurogénétiques et neuromusculaires. Le DPN/DPI sont-ils un enjeu dans l'information à la parentèle ? (RISQUINFO) | 1 | 27 000 € |
| FERGELOT Patricia | Labo Génét mol, PTBM CHU de Bordeaux | Diagnostic des NBIA: Analyse de l'hétérogénéité génétique et validation de marqueurs mitochondriaux de pathogénicité des variants | 3 | 18 000 € |
| GAYRARD Véronique | UMR1331 Toxalim Ecole vétérinaire de toulouse | Impact de l'exposition humaine aux bisphénols sur la fonction ovarienne et sa réponse à une stimulation | 5 | 27 000 € |
| GRANDJEAN Valérie | INSERM U 1065-C3M, Nice | Impact de la perte de poids induite par un by-pass gastrique sur la qualité des spermatozoïdes | 4 | 18 000 € |

| | | | | |
|--|---|--|---|-------------|
| LE RAY Camille | INSERM U 1153 EPOPé - La Sorbonne Port-Royal- Paris | Issues prénatales et maternelles des grossesses gémellaires selon le mode de conception | 2 | 10 000 € |
| MAY- PANLOUP Pascale | UMR CNRS 6214- INSERM 1083- Angers | Quantification de l'ADN mitochondrial des cellules folliculaires comme facteur prédictif de l'implantation embryonnaire | 3 | 13 500 € |
| MISRAHI Micheline REINER Veitia | INSERM U 1193, Institut Paris Diderot, Paris | Etude pilote de validation du diagnostic génétique des insuffisances ovariennes prématurée par séquençage d'exomes | 3 | 23 000 € |
| MITCHELL Michael | GMGF UMR 910 Marseille | Contribution des protéines BAF, BAF-L et Lamine B3 au remodelage du noyau spermatique avant et après la fécondation | 4 | 27 000 € |
| MOUTEL Grégoire | UMR 1086 Caen | Développement d'un outil d'aide à la décision en oncofertilité pour les jeunes femmes atteintes d'un cancer du sein | 5 | 18 000 € |
| PASQUIER Laurent | Pôle Pédiatrie CHU Rennes | Examen des caractéristiques génétiques d'une personne: identification et optimisation des organisations dans deux spécialités médicales | 1 | 22 500 € |
| PETERMANN Rachel | INTS - Dép immuno plaquettaire - Paris | Application de la droplet digital PCR (ddPCR) dans le diagnostic prénatal non-invasif de l'incompatibilité plaquettaire foeto-maternelle | 3 | 22 500 € |
| PITON Amélie | IGBMC Illkirch | Développement d'outils fonctionnels, génétiques et cliniques d'aide au diagnostic de la déficience intellectuelle de type MRD7 (DYRK1A) | 3 | 22 500 € |
| ROMANA Serge | Labo histo embryo cyto INSERM U1163 Institut Imagine | Diagnostic prénatal combiné des CNVs et SNV par séquençage haut débit | 3 | 22 500 € |
| ROUX Anne- Françoise | Labo de génétique mol- EA 7402 - CHU de Montpellier | Le poisson zèbre pour étudier l'impact des variants identifiés dans les pathologies neurosensorielles | 3 | 10 000 € |

BEZIEAU Stéphane:

Modélisation in vivo pour le diagnostic génétique des déficiences intellectuelles

Objectifs

La contribution des causes génétiques à l'étiologie des déficiences intellectuelles (DI) est majeure. La forte hétérogénéité génétique est cependant un obstacle à l'interprétation des résultats dans le diagnostic moléculaire de la DI. L'identification des gènes responsables de DI représente un enjeu important pour le diagnostic génétique. Le PHRC interrégional HUGODIMS a évalué l'apport

diagnostique du séquençage haut débit d'exome en trio chez 75 patients atteints de DI modérée à sévère. Des gènes associés à la DI ont été mis en évidence dans le cadre de ce travail. Des variants de gènes encore peu caractérisés ont également pu être identifiés. Pour ces derniers, une validation expérimentale est nécessaire afin de déterminer leur causalité dans la DI. La distance évolutive réduite par rapport à l'Homme, la forte conservation de voies moléculaires majeures en miroir de ses coûts d'utilisation réduits et des possibilités nombreuses de transgénése dont du zebrafish (*Danio rerio*) un outil particulièrement pertinent pour l'interprétation de variants génétiques. Afin de poursuivre l'identification des gènes liés à la DI syndromique, nous proposons de caractériser in vivo dans un modèle zebrafish les variants identifiés.

Résultats attendus

Les zebrafish seront analysés afin de rechercher des signes spécifiques des atteintes neurologiques et extra-neurologiques mis en évidence chez les patients. Des malformations cérébrales et cardiaques, des anomalies des extrémités ainsi que des anomalies squelettiques seront particulièrement recherchées. Ce projet translationnel, piloté par le service de Génétique Médicale du CHU de Nantes (Pr D. Bézieau), vise à appuyer les progrès du séquençage à haut débit en modélisant in vivo l'effet de variants candidats. Ce travail représenterait aussi une preuve de concept des stratégies de modélisation innovantes faisant suite à l'exome, répondant aux besoins de la pratique actuelle du diagnostic moléculaire en Génétique Médicale.

Méthodes

L'inactivation de six gènes candidats par édition de génome grâce à la technique CRISPR/Cas9 en parallèle d'une extinction de l'expression par morpholino seront réalisées afin d'évaluer l'effet d'une perte de fonction dans notre modèle. Une restauration du phénotype sera recherchée par injection d'ARNm sauvage ou muté. Les étapes de biologie moléculaire seront réalisées par un ingénieur au sein du service de Génétique Médicale du CHU de Nantes, équipe coordinatrice. L'injection et le phénotypage des zebrafish seront réalisés au sein de l'équipe du Dr EE. Davis et Pr N. Katsanis du Center for Human Disease Modeling (Duke University, Durham, NC, USA), à l'expertise largement reconnue dans la modélisation de pathologies génétiques humaines grâce au modèle zebrafish, dont les formes syndromiques de DI.

[Retour](#)

BUFFIN-MEYER Bénédicte:

METAPhOR : METabolome Amniotique pour la Prédiction de la fonction Rénale postnatale

Objectifs : Les malformations des reins et des voies urinaires (CAKUT) affectent 0,5% des grossesses et représentent la première cause d'insuffisance rénale chez les enfants. La prise en charge des fœtus CAKUT est extrêmement difficile du fait de notre incapacité à évaluer en période prénatale la progression des atteintes rénales. Dans ce contexte, notre projet a pour but de développer un outil pronostique, tiré de l'exploration du métabolome amniotique, pour prévoir in utero le devenir fonctionnel des reins après la naissance des fœtus avec CAKUT.

Résultats attendus : Cet outil multimoléculaire, basé sur l'association de plusieurs métabolites, devrait dépasser le potentiel prédictif des techniques échographiques de référence. De plus, ses performances pronostiques devraient être optimisées en combinant ces métabolites avec d'autres

niveaux omiques (peptides amniotiques) dans un modèles multidimensionnel. L'obtention de ce nouvel outil permettra ainsi i) d'atténuer l'énorme pression des parents liée à l'incertitude du bien-être de leur enfant ; ii) d'améliorer le conseil prénatal délivré aux familles pour éviter certaines interruptions de grossesse injustifiées ; iii) si la poursuite de la grossesse est décidée dans les cas de mauvais pronostic, de mieux organiser la prise en charge des nouveau-nés avec insuffisance rénale. Méthodologie : En utilisant l'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse, nous analyserons l'ensemble des métabolites présents dans le liquide amniotique de fœtus CAKUT. Cette méthode de pointe permet d'obtenir rapidement des profils moléculaires sans que l'identité des molécules n'ait besoin d'être connue. 79 patients seront testés parmi lesquels 26 ont évolué vers une insuffisance rénale sévère avant l'âge de 2 ans tandis que les 53 autres avaient une fonction rénale normale à 2 ans. Grâce au 2/3 de la cohorte, nous sélectionnerons les métabolites prédictifs de la fonctionnalité rénale postnatale. Nous combinerons ces métabolites biomarqueurs dans un modèle multimoléculaire pour obtenir l'outil prédictif. Ce modèle sera validé ainsi des fœtus sains (21), dépourvus d'anomalie rénale. Ses performances seront comparées aux outils échographiques actuellement utilisés en clinique. Nous évaluerons également si la combinaison de ces métabolites avec des biomarqueurs peptidiques du liquide amniotique (déjà identifiés au laboratoire) améliore la classification des fœtus avec CAKUT. Enfin, l'identité des métabolites d'intérêt sera recherchée via deux approches, l'une fondée sur l'interrogation des bases de données existantes et l'autre basée sur la technologie de spectrométrie de masse en tandem.

Conclusion : Ainsi, en donnant la possibilité de prédire à l'avance des enfants CAKUT à naître, ce projet relève un vrai défi de médecine prénatale.

[Retour](#)

CALMELS Nadège:

Intérêt du séquençage haut débit des ARN pour le diagnostic des maladies génétiques hétérogènes

L'avènement du séquençage de l'ADN génomique à haut débit a permis des avancées majeures pour le diagnostic des maladies génétiques d'origine hétérogène. Ainsi, notre laboratoire hospitalier a développé ces dernières années plusieurs tests diagnostiques basés sur le séquençage ciblé des séquences codantes de panels de gènes (d'une vingtaine de gènes pour les maladies de la réparation de l'ADN à près de cinq cents gènes pour la déficience intellectuelle). Ces analyses ciblées, réalisées par capture, ont ainsi résolu de 25 à 80% des cas selon les indications, sans pour autant permettre le diagnostic de la totalité des patients. Pour ces cas négatifs, la recherche de mutations dans les séquences codantes a ensuite été étendue à l'exome entier (Whole Exome Sequencing), assurant ainsi plusieurs diagnostics supplémentaires. Des patients restent malgré tout sans diagnostic après cette étude d'exome. Il pourrait s'agir de cas complexes d'origine génétique ou même non génétique, mais également de pathologies monogéniques liées à des mutations non identifiables par les analyses de séquences codantes, et touchant notamment les ARN messagers.

L'objectif du présent projet est de tester l'intérêt du séquençage de l'ARN messenger pour le diagnostic étiologique de ces patients irrésolus après séquençage des régions codantes. Après une étape de validation à partir de 6 échantillons porteurs de mutations connues affectant les ARN messagers, nous souhaitons appliquer cette technique à 30 cas irrésolus dans différents contextes

pathologiques : déficience intellectuelle, myopathies, maladies neurosensorielles et troubles de la réparation de l'ADN. Au préalable, nous avons vérifié qu'une majorité de nos gènes d'intérêt étaient suffisamment exprimés dans les tissus à notre disposition. Nous souhaitons tester deux stratégies en parallèle : le séquençage de la globalité des ARN messagers (whole RNA-seq) et le séquençage ciblé des ARN messagers en utilisant les mêmes sondes de capture que celles utilisées pour le séquençage de l'ADN génomique. Par cette dernière approche, nous espérons optimiser la couverture des gènes faiblement exprimés. L'analyse des données inclura l'analyse des jonctions exoniques, la recherche de variants (avec comparaison avec les données de séquençage obtenues sur l'ADN génomique) et la quantification des ARNm.

Nous proposons de faire réaliser les expériences de séquençage d'ARN et l'analyse bioinformatique des données sur la plateforme de séquençage de l'IGBMC (Institut de Génétique, de Biologie Moléculaire et Cellulaire) qui possède toutes les compétences requises. La formation de notre propre personnel bioinformatique au cours de ce projet devrait ainsi nous permettre d'être indépendant à l'avenir pour la réalisation et l'analyse du séquençage haut débit de l'ARN messenger, si cette technique s'avère concluante d'un point de vu diagnostic.

[Retour](#)

CHRISTIN-MAITRE Sophie:

Analyse en NGS des points de cassures dans des remaniements chromosomiques chez des femmes avec une insuffisance ovarienne prématurée

Le caryotype est l'examen de base pour la détection des remaniements chromosomiques équilibrés qui, lorsqu'ils sont associés à une pathologie donnée, posent la question de la présence d'un gène d'intérêt au niveau ou à proximité de l'un ou l'autre des points de cassures chromosomiques. Malheureusement, le niveau de résolution du caryotype, et la nature même de cet examen, ne permettent pas l'identification de ces points de cassures au niveau moléculaire. L'hybridation in situ fluorescente (FISH) ne peut être utilisée que de façon ciblée et la CGH-Array, quant à elle, ne permet pas d'analyser les remaniements chromosomiques équilibrés. L'objectif de ce projet est d'appliquer les techniques nouvelles de séquençage de l'ADN (NGS) à la détermination moléculaire des points de cassures chromosomiques dans des remaniements équilibrés du caryotype (translocations ou inversions) dans un modèle de pathologie, l'insuffisance ovarienne prématurée. Pour ce faire, il est prévu de séquencer l'ADN de six patientes, déjà identifiées, avec une insuffisance ovarienne prématurée (IOP) et porteuses soit d'une translocation X;autosome (n=4) soit d'une translocation entre deux autosomes (n=1) soit encore d'une inversion chromosomique (n=1). Le caractère équilibré de ces remaniements a été vérifié en CGH-Array sur puces SNP. Outre l'aspect innovateur de ce travail quant à la technique utilisée, le but est de déterminer si un ou plusieurs gènes, impliqués dans le fonctionnement ovarien, se situent au niveau de l'un ou l'autre des points de cassures chromosomiques ou à proximité immédiate. Une analyse de la méthylation des régions chromosomiques voisines sera également effectuée à l'aide de puces ADN de méthylation de façon à mettre en évidence un éventuel effet de position. Le service d'Endocrinologie de l'hôpital Saint Antoine et l'unité de cytogénétique de l'hôpital Armand Trousseau ont une grande expertise dans l'exploration phénotypique, biologique et génétique des femmes ayant une insuffisance ovarienne prématurée.

Le service de cytogénétique constitutionnelle du CHU de Lyon a acquis ces dernières années une très bonne expertise dans la caractérisation des points de cassures par NGS de remaniements chromosomiques apparemment équilibrés grâce à la réalisation d'un projet PRTS, le projet ANI, sur le clonage des points de cassures avec déjà plus de 50 patients recrutés. Un budget de 16000€ est demandé pour ce travail, couvrant les réactifs nécessaires au NGS ainsi que les frais d'analyse et d'interprétation des données de séquençage.

[Retour](#)

COSSEE Mireille:

Comparaison et optimisation de kits de séquençage d'exome complet pour le diagnostic des myopathies et dystrophies musculaires

Les myopathies et dystrophies musculaires (M-DM) sont phénotypiquement et génétiquement très hétérogènes, avec plus de 100 gènes identifiés. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) a révolutionné leur diagnostic en permettant de séquencer, en un seul temps, l'ensemble des séquences d'intérêt. Le NGS ciblé sur panels de gènes impliqués dans ces pathologies a constitué la technologie de choix pour la mise en place du NGS en pratique diagnostique. Toutefois, la nécessité de mise à jour régulière du panel avec l'identification de nouveaux gènes responsables de M-DM, et l'absence d'analyse de gènes non connus pour être impliqués dans les pathologies neuromusculaires constituent une limitation de cette approche ciblée. Le séquençage de tous les exons (et jonctions exons-introns) de tous les gènes, Whole Exome Sequencing (WES), a démontré son efficacité à identifier des mutations non seulement dans des gènes connus, mais également dans d'autres gènes non identifiés auparavant comme responsables de M-DM.

Le développement de nouvelles versions des bibliothèques de capture de WES offrant une meilleure couverture de séquençage, couplé à l'amélioration de la capacité à stocker les données et à les interpréter dans les laboratoires de diagnostic moléculaire, permettent d'envisager cette technologie pour une prise en charge diagnostique. A ce jour, les dernières versions de produits de capture pour WES sont SureSelect V6 (Agilent), SeqCap EZ MedExome (Roche NimbleGen) et TruSeq Rapid Exome (Illumina). Le kit SeqCap EZ MedExome constitue la dernière solution de préparation de bibliothèques de WES de la société Roche-NimbleGen. Elle présente la particularité d'offrir une couverture améliorée sur 4600 gènes d'intérêt médical tout en offrant une couverture exhaustive du reste de l'exome. Enfin, ces sociétés offrent la possibilité de personnaliser la capture d'exome à façon en enrichissant la densité de sondes de capture de certaines régions choisies du génome.

Nous avons mis au point en 2013 le diagnostic par NGS ciblé des exons et jonctions exon-introns de 137 gènes de M-DM. L'objectif de notre étude est d'évaluer les kits de capture de WES les plus récents proposés par les principales sociétés, afin de choisir la technologie la plus fiable en termes de couverture et de profondeur de séquençage non seulement de l'exome total, mais aussi des gènes de M-DM de notre panel ciblé. Si la couverture de séquençage au niveau des 137 gènes n'est pas satisfaisante, nous proposons d'optimiser le kit de capture de WES le plus efficace par l'adjonction de sondes au niveau des gènes de M-DM. Cette étude constituera un préliminaire à la mise en place du WES en pratique diagnostique puis à une étude visant à évaluer l'efficacité diagnostique du WES comparée au NGS ciblé sur un grand nombre de patients.

[Retour](#)

COUTTON Charles:

Intérêt du séquençage exomique dans le diagnostic génétique des patients globozoospermiques DPY19L2 négatifs

Contexte et objectifs

La globozoospermie, un phénotype rare d'infertilité masculine qui se caractérise par la présence dans l'éjaculat d'une majorité de spermatozoïdes avec une tête ronde, dépourvue d'acroosome. Une récente méta-analyse a démontré que les altérations du gène DPY19L2 sont retrouvées chez près de 2/3 des patients globozoospermiques. L'absence de mutation identifiée dans le gène DPY19L2 chez une proportion de patients globozoospermiques suppose que d'autres gènes sont impliqués dans ce phénotype. Jusqu'à présent chez l'homme, seuls trois autres gènes (PICK1, ZBP1 and SPATA 16) ont été reliés à la globozoospermie mais le niveau de preuve de leur implication et/ou leur prévalence reste extrêmement faible. La poursuite des efforts pour l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la globozoospermie est primordiale à l'amélioration de la prise en charge des patients. Par ailleurs l'amélioration de l'efficacité diagnostique permettra d'adapter les options thérapeutiques au génotype. L'objectif principal de cette étude est d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la globozoospermie complète chez des patients pour lesquels la recherche des altérations dans le gène DPY19L2 s'est avérée négative. La plupart de patients inclus dans l'étude ont déjà eu recours à la fécondation in vitro (FIV) avec injection spermatique intra-cytoplasmique (ICSI). Les résultats des ICSI chez ces patients permettront secondairement d'établir s'il existe une corrélation entre le génotype et les taux de réussite de l'ICSI chez ces patients.

Résultats attendus

L'identification de nouveaux gènes impliqués dans la globozoospermie nous permettra d'améliorer l'efficacité diagnostique et donc de limiter l'errance diagnostique. La prévalence des mutations identifiées nous aidera à préciser la meilleure stratégie diagnostique à adopter chez les patients globozoospermiques. Ces nouvelles données génétiques corrélées aux résultats d'ICSI nous permettront aussi de proposer de nouvelles recommandations sur les possibilités de prise en charge et les chances de réussite en fonction du génotype.

Méthodologie

Nous réaliserons le séquençage exomique d'une cohorte de 25 patients présentant une globozoospermie totale i.e. avec plus de 75% de spermatozoïdes globozoocéphales chez lesquels l'étude complète du gène DPY19L2 par MLPA (multiple ligation-dependant probe amplification) pour la détection de délétions et séquençage Sanger s'est avérée négative. Une analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA ou CGH-array) a déjà été aussi réalisée chez ces patients sur notre plateforme mais n'a pas permis de détecter de variations du nombre de copies (CNV) pathogènes pouvant expliquer le phénotype. Chez l'ensemble de ces patients, les résultats des ICSI ont pu être collectés auprès des centres de procréation médicalement assisté (PMA) ayant pris en charge les couples concernés. Les données d'exomes seront analysées et filtrées par un pipeline d'analyse développé au laboratoire. Les mutations ponctuelles mais aussi les petites délétions exoniques seront recherchées.

[Retour](#)

DURR Alexandra:**L'enjeu du diagnostic prénatal/préimplantatoire dans l'information de la parentèle dans les maladies dominantes neurogénétiques et neuromusculaires**

Notre expérience de plus de 20 ans en consultation de neurogénétique nous apprend que l'analyse des caractéristiques génétiques n'est pas un banal examen, il touche au patrimoine génétique et implique toute la constellation familiale. Une étude pilote au sein de familles concernées par la maladie de Huntington révélait que seulement 21% des sujets interrogés avaient été informés par leurs parents. Aujourd'hui, la mise en application de la loi de bioéthique de 2011 change la situation car elle pourrait créer l'obligation d'informer la parentèle.

Nous avons 4 objectifs:

- 1) Evaluer les particularités de l'information au sein des familles neurogénétiques et neuromusculaires dominantes;
- 2) Déterminer si l'accès au diagnostic prénatal/préimplantatoire est ou non un facteur fort de l'information de la parentèle;
- 3) Connaître les souhaits des personnes et leurs attentes concernant la diffusion de l'information sur le risque génétique;
- 4) Investiguer les répercussions de la loi sur les pratiques médicales, en particulier si le diagnostic prénatal/préimplantatoire est considéré par les cliniciens comme une « mesure préventive ».

Au total, notre projet associe 4 équipes cliniques et 5 associations de patients. Il prendra en compte le point de vue des malades, des personnes à risque, des porteurs asymptomatiques et des conjoints concernés par une des maladies dominantes suivantes: maladie de Huntington, Creutzfeld-Jacob, sclérose latérale amyotrophique, ataxies cérébelleuses et myotonie de Steinert. En plus des questionnaires et entretiens avec les personnes concernées, nous allons recueillir l'avis de 20 praticiens, sur notre site et dans 3 centres français. Nous évaluerons les différences en fonction de 5 facteurs: atteinte cognitive et/ou motrice, âge de début, pénétrance, intérêt médical d'une surveillance, existence d'un traitement, l'accès au diagnostic prénatal/préimplantatoire. Cette étude permettra de répondre à des questions majeures de santé publique: comment l'information génétique circule-t-elle dans les familles concernées? Quelles modalités les praticiens mettent-ils en place pour les aider à diffuser l'information et si l'offre d'un diagnostic prénatal/préimplantatoire constitue un facteur déterminant de l'information puisque considérés comme une « mesure préventive » par les médecins? Les résultats permettront de comprendre les besoins des familles et adapter les modalités de prise en charge.

[Retour](#)

FERGELOT Patricia:

Diagnostic des NBIA : analyse de l'hétérogénéité génétique et validation de marqueurs mitochondriaux de pathogénicité des variants

Les neurodégénérescences par accumulation intracérébrale de fer (NBIA) représentent un groupe hétérogène de maladies rares du système nerveux, tant sur le plan génétique que phénotypique. Le service de génétique médicale du CHU de Bordeaux est référent pour le diagnostic clinique (Pr Cyril Goizet, neurogénétique) et moléculaire (Dr Patricia Fergelot laboratoire de génétique moléculaire) de ces pathologies.

Le diagnostic est basé sur l'IRM cérébrale qui montre le dépôt anormal de fer dans les noyaux gris centraux et l'analyse génétique. Dix formes de NBIA se distinguant par le gène en cause et la présentation clinique sont reconnues actuellement. Cependant les tableaux cliniques sont parfois chevauchants et le diagnostic moléculaire peut être pris en défaut du fait de variants dits de signification inconnue dont le caractère pathogène n'est pas documenté. Environ la moitié des cas évocateur cliniquement et à l'IRM restent sans confirmation moléculaire. Les enjeux diagnostiques sont de 2 ordres : d'une part avoir une exhaustivité suffisante ce qui passe par l'analyse, en séquençage haut débit, d'un panel de gènes incluant l'ensemble des gènes décrits et pouvant évoluer au fur et à mesure de l'identification de nouveaux gènes et, d'autre part, valider par des études fonctionnelles la pathogénicité des variants géniques détectés.

Quatre grandes voies sont impliquées dans la physiopathologie de ces maladies : le métabolisme du fer, le métabolisme des lipides, l'énergétique cellulaire et l'autophagie.

La biochimie de la mitochondrie est impliquée dans ces voies et nous avons donc réalisé un 1er test sur les fibroblastes d'un patient de notre cohorte et effectué une revue de la littérature pour définir les paramètres pertinents à valider sur un groupe de patients atteints de NBIA dont l'anomalie moléculaire est connue.

A partir de la cohorte bordelaise de 70 patients 2 groupes seront étudiés :

- Un groupe de 44 patients sans diagnostic moléculaire et 6 témoins. L'analyse sera effectuée sur un panel de 16 gènes de NBIA dont 9 sont déjà étudiés en génétique moléculaire au CHU de Bordeaux, la nouveauté portant également sur l'utilisation de la capture (couverture optimisée) couplée au séquençage Ion Torrent (disponibilité sur le plateau technique du CHU, rapidité) ;
- Un groupe de 10 patients, avec variants identifiés dans les gènes déjà étudiés au laboratoire de diagnostic moléculaire du CHU, pour la mise en place de dosages, plasmatiques, sur cellules sanguines et sur fibroblastes issus de biopsie cutanée. La présente étude sera réalisée à partir de patients atteints de 2 formes de NBIA fréquentes, MPAN et PKAN, avec 5 patients pour chaque type et un groupe de 6 témoins appariés pour le sexe et si possible pour l'âge.

Notre perspective est la mise en place de ces tests génétiques et biochimiques en diagnostic avec les filières maladies rares et le réseau CARAMMEL impliqué dans le diagnostic des maladies mitochondriales.

[Retour](#)

GAYRARD Véronique:

Impact de l'exposition humaine aux bisphénols sur la fonction ovarienne et sa réponse à une stimulation gonadotrope

La forte prévalence de l'exposition à des perturbateurs endocriniens comme le bisphénol A (BPA) est un sujet de préoccupation pour la fonction reproductive humaine. Une partie des incertitudes soulevées par les agences réglementaires est liée à la difficulté d'extrapoler les données expérimentales à l'homme en raison de la controverse actuelle concernant le niveau des concentrations plasmatiques humaine de BPA. Par ailleurs, la question de la substitution du BPA est posée et de nombreux industriels y ont d'ores et déjà répondu par le bisphénol S (BPS) dont les effets de perturbateurs endocriniens restent encore très mal connus. Le projet proposé, adossé à un programme hospitalier de recherche clinique en cours, vise à développer une approche modélisatrice de type pharmacocinétique (PK) pharmacodynamique (PD) de population pour évaluer l'effet de l'exposition des femmes au BPA et au BPS sur des marqueurs de la fonction ovarienne basale et stimulée dans le cadre des protocoles d'assistance médicale à la procréation (AM P). Cette approche appliquée à un effectif important (800 patientes) permettra de quantifier l'ensemble des sources de variabilité interindividuelle, dont le niveau d'exposition au BPA et au BPS, et de prédire la relation entre les doses quotidiennes d'exposition à ces bisphénols et la fonction ovarienne, en termes de fonctionnement basal et en termes de capacité de réponse à une stimulation gonadotrope, c'est-à-dire des éléments clés influençant la fertilité féminine naturelle et induite. Parallèlement, à travers le développement de modèles PK et PD de population, cette étude aura une contribution originale et majeure à l'évaluation de l'exposition humaine au BPA et au BPS ainsi qu'à la compréhension des mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens sur la fonction reproductive.

[Retour](#)

GRANDJEAN Valérie:**Impact de la perte de poids induite par un by-pass gastrique sur la qualité des spermatozoïdes****Objectifs du projet et résultats attendus**

De nombreux facteurs influencent la qualité du spermatozoïde. C'est le cas notamment de l'obésité. En effet, de récentes analyses épidémiologiques et expérimentales indiquent que l'obésité masculine induit des modifications physiologiques et moléculaires dans les spermatozoïdes qui seraient préjudiciables à la qualité du sperme. Ces altérations auraient des répercussions à la fois sur la fertilité et également sur la santé du futur individu, en augmentant le risque chez la descendance de développer des pathologies métaboliques à l'âge adulte. Ainsi, il est très souvent demandé aux patients obèses venant consulter pour des problèmes de fertilité de maigrir avant leur prise en charge en procréation médicalement assistée. Cela repose sur l'idée que les altérations physiologiques et moléculaires induites par l'obésité sont réversibles dans les spermatozoïdes. Mais qu'en est-il réellement ? L'objectif de notre étude vise à vérifier cette réversibilité tant sur les plans physiologique que moléculaire. Ce projet nous permettra de mieux comprendre l'impact de l'obésité et de la perte de poids sur la qualité du gamète mâle.

Méthodologie

Pour répondre à ces questions, nous analyserons, chez l'homme, l'impact d'une perte de poids induite par un by-pass gastrique sur la qualité spermatique (nombre, morphologie et mobilité) et sur le transcriptome des spermatozoïdes. Ces analyses seront réalisées avec des spermatozoïdes d'homme obèses (avec un IMC $\geq 35 \text{kg/m}^2$) avant et (12 mois) après chirurgie. Nous focaliserons nos analyses moléculaires sur l'ARN spermatiques pour plusieurs raisons. Tout d'abord, même si le rôle des ARNs spermatiques n'est pas encore complètement défini, on sait néanmoins qu'ils sont le reflet d'évènements intervenus lors de la spermatogenèse, ce qui fait de leur analyse une image qualitative de la spermatogenèse. D'autre part, des analyses moléculaires et génétiques démontrent qu'ils joueraient un rôle à la fois dans le développement précoce de l'embryon et sur le phénotype des futurs individus. Ainsi, une analyse transcriptomique comparative des spermatozoïdes entre hommes non obèses et obèses avant et après chirurgie nous apparaît un critère de choix pour évaluer la qualité du sperme et la possible réversion des marques non-génétiques induites lors d'obésité importante.

Ce travail est rendu possible grâce à la mutualisation de compétences de trois équipes toutes localisées à Nice qui possèdent une expertise reconnue internationalement dans leur domaine respectif. Il s'agit de l'équipe Recherche intitulée "Control of gene expression" localisée à Nice Unité INSERM U1065 (Dr Valérie Grandjean, Partenaire 1), du Service d'Endocrinologie et Reproduction au CHU l'Archet II de Nice (Dr Mohamed Benhamed, Partenaire 2) et du Service de Chirurgie Digestive et du Centre de Transplantation Hépatique du CHU de Nice (Pr Jean Gugenheim, Partenaire 3).

[Retour](#)

LE RAY Camille:

Issues périnatales et maternelles des grossesses gémellaires selon le mode de conception

Objectif : Le recours à l'AMP (assistance médicale à la procréation) est en augmentation, en particulier le recours à la FIV et au don d'ovocytes. La FIV est associée à une augmentation du risque de complications périnatales et maternelles, mais ce sur-risque est en grande partie lié au risque de la gémellité. On peut donc se demander si, au sein des grossesses gémellaires, le mode de conception est en lui-même un facteur de risque de complications périnatales et maternelles. La littérature actuelle ne permet pas de savoir si, au sein des grossesses gémellaires, le fait d'avoir obtenu la grossesse par AMP et en particulier par FIV avec don d'ovocytes augmente de façon indépendante les risques périnataux et maternels comparativement aux grossesses gémellaires obtenues par d'autres techniques d'AMP ou naturellement. L'objectif de cette étude est de comparer les issues périnatales et maternelles des grossesses gémellaires selon leur mode de conception, en tenant compte de l'âge maternel, facteur de risque connu et important de complications périnatales et maternelles.

Source de données : Nos données sont issues de l'étude JUMODA. Ont été incluses toutes les grossesses gémellaires ≥ 22 SA ayant accouché entre le 10 février 2014 et le 1er mars 2015. Les données sont donc disponibles pour 8823 patientes soit 75% des grossesses gémellaires françaises annuelles et près de 18000 enfants.

Méthodologie : Il s'agit d'une étude exposés / non exposés dans une cohorte prospective nationale incluant uniquement des grossesses gémellaires. Les patientes exposées sont les femmes ayant obtenu une grossesse par AMP, soit 2822 femmes. Le groupe exposé sera catégorisé selon la technique d'AMP utilisée (spontané / stimulation / insémination / FIV / ICSI / don d'ovocytes). Les patientes non exposées sont les femmes ayant une grossesse obtenue spontanément c'est-à-dire sans l'aide de l'AMP, soit 6001 femmes.

Les issues périnatales et maternelles étudiées seront : 1/ les complications maternelles et fœtales lors de la grossesse, 2/ le mode d'accouchement, 3/ l'hémorragie du postpartum, 4/ les complications néonatales, 5/ les complications maternelles du postpartum. Toutes ces données ont été recueillies prospectivement dans l'étude JUMODA ainsi que les caractéristiques des femmes, le déroulement de la grossesse et de l'accouchement.

Résultats attendus : L'étude JUMODA offre une opportunité unique pour étudier l'association entre mode de conception et risques périnataux et maternels spécifiquement chez les grossesses gémellaires. Les résultats de ces analyses constitueront une base scientifique pour optimiser l'organisation et les recommandations de soins au travers de :

- L'amélioration des connaissances scientifiques à la fois pour les spécialistes de la fertilité, pour les obstétriciens et pour les usagers
- La possibilité d'améliorer le conseil pré-conceptionnel aux couples envisageant une AMP
- La modification des pratiques de l'AMP si des risques particuliers étaient identifiés
- L'adaptation de la surveillance obstétricale prénatale et postpartum des femmes

[Retour](#)

MAY-PANLOUP Pascale:**Quantification de l'ADN mitochondrial des cellules folliculaires comme facteur prédictif de l'implantation embryonnaire**

En dépit des progrès de l'Assistance Médicale à la Procréation (AMP), le taux global de succès en fécondation in vitro (FIV) reste relativement faible. Le choix de l'embryon à transférer devrait permettre la sélection de l'embryon avec le meilleur potentiel évolutif de manière à augmenter les chances de grossesse tout en limitant les risques de grossesse multiple. Cependant malgré les récentes tentatives de standardisation et l'affinement des critères de sélection embryonnaire, les taux de grossesse restent relativement bas, montrant les limites de l'informativité de ces critères. L'un des challenges de notre activité est de définir des marqueurs non invasifs et fiable de la viabilité embryonnaire.

Les mitochondries constituent la force motrice des cellules, produisant l'énergie sous forme d'ATP. Elles sont également essentielles à divers processus cellulaires et voies de signalisation. Il a été montré que la qualité ovocytaire était liée à la teneur en ADN mitochondrial de l'ovocyte (ADNmt) chez l'homme et d'autres espèces animales. Parallèlement il a été mis en évidence que le nombre de copies de l'ADNmt de l'ovocyte était corrélé à celui des cellules folliculaires (CFs) qui l'entourent. La quantification de l'ADNmt des CFs a ainsi été reliée à la qualité de l'embryon évaluée par des critères morphologiques.

Nous proposons une étude observationnelle sur 100 complexes cumulo-ovocytaires provenant de patientes bénéficiant d'une FIV avec micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) au centre d'AMP du CHU d'Angers, sur une période de 3 ans.

Au cours du processus d'ICSI, tous les cumulus seront collectés individuellement et ceux qui correspondent à un embryon transféré dans l'utérus maternel seront conservés. La teneur moyenne en ADNmt des CFs de chaque cumulus sera ensuite évaluée en utilisant une technique de PCR quantitative en temps réel. Nous comparerons la teneur moyenne en ADNmt des CFs des ovocytes menant à un embryon implanté, à ceux des ovocytes conduisant à l'embryon transféré mais non implanté. La relation entre la teneur en ADNmt dans les CFs et les chances d'implantation sera étudiée en utilisant des modèles généralisés univariés et multivariés incluant des paramètres morpho-cinétiques classiques habituellement utilisés pour la sélection embryonnaire dans un laboratoire de FIV.

Le but de cette étude est d'évaluer l'intérêt de la quantification de l'ADNmt dans les CFs en tant que biomarqueur de la compétence des ovocytes. Nous cherchons à savoir si le contenu moyen en ADNmt des CFs pourrait, seul ou en combinaison avec la méthode d'évaluation morpho-cinétique classique, offrir un critère supplémentaire de sélection de l'embryon à transférer.

[Retour](#)

MISRAHI Micheline; REINER Veitia:

Etude pilote de validation du diagnostic génétique des insuffisances ovariennes prématurée par séquençage d'exomes

Objectifs : L'insuffisance ovarienne prématurée (IOP) est un syndrome observé chez la femme <40 ans (1% des femmes) aboutissant le plus souvent à une infertilité définitive, conduisant les femmes au don d'ovocyte ou à l'adoption. Il existe cependant des IOP fluctuantes avec fonction ovarienne réversible. Il peut donc persister un capital folliculaire méconnu. L'appréciation du capital folliculaire résiduel est un élément essentiel du pronostic et doit conduire à un conseil génétique et thérapeutique approprié. Les étiologies des IOP restent inconnues dans plus de 80% des cas. Les causes génétiques sont alors suspectées, estimées à ~ 30%.

Les équipes coordonnatrices de ce projet ont identifié des causes génétiques d'IOP, qu'il s'agisse de gènes impliqués dans la maturation folliculaire ou dans la méiose.

Il existe une très grande hétérogénéité génétique des IOP avec des progrès majeurs dans l'identification de nouveaux gènes responsables dus au séquençage nouvelle génération. Ceci permet actuellement de proposer un diagnostic génétique par l'analyse conjointe de tous les gènes connus, ~ 50 gènes. Toutefois le nombre de gènes impliqués ne cesse d'augmenter. Il n'existe pourtant aucun arbre décisionnel ni stratégie diagnostique établie.

Trois grands mécanismes peuvent être identifiés : une anomalie de l'établissement du capital folliculaire, augmentation de l'atrésie ou altération de la croissance folliculaire. Dans ce dernier cas l'identification de la cause pourrait permettre d'établir un pronostic pour la fertilité.

Méthodologie :

- Recruter de façon prospective 40 patientes avec IOP isolée idiopathique, venant de 15 centres d'AMP, services de gynécologie ou d'endocrinologie en France.
- Effectuer un phénotypage complet des patientes avec bilan clinique, biologique et échographique ou IRM pelvienne. Eliminer les causes connues.
- Analyser des gènes responsables d'IOP par séquençage d'exomes suivie d'une analyse bioinformatique ciblée en deux temps : 1) étude de gènes validés comme responsable d'IOP avec incrémentation au fil du temps. La rapidité actuelle de découverte de nouveaux gènes responsables explique la méthodologie d'étude pan-génomique choisie, permettant une analyse de nouveaux gènes candidats sélectionnés (90 gènes au total). La mise au point de la validation bioinformatique des résultats sera réalisée.

Résultats attendus :

- Préciser la proportion de patientes pouvant bénéficier d'un diagnostic génétique étiologique. (attendue > à 1/3 patientes). Ceci conduira au conseil génétique et à une prise en charge.
- Identifier de nouveaux gènes responsables d'IOP.
- Si des mutations sont identifiées, établir des corrélations génotype-phénotype pour réaliser une stratification en fonction de l'atteinte prédite de la réserve ovarienne.
- Effectuer des tests diagnostiques et un conseil génétique dans les familles.
- Proposer un arbre décisionnel et des recommandations pour l'étude génétique des IOP qui n'existent pas à l'heure actuelle.
- Estimer la proportion de patientes avec une cause génétique laissant suspecter la persistance d'une réserve ovarienne. Ceci conduirait à un conseil thérapeutique en définissant une sous population

susceptible de bénéficier dans l'avenir d'un protocole de recherche thérapeutique pour préservation de la fertilité. En effet très récemment une activation in vitro de l'entrée en croissance du pool folliculaire a été obtenue pour des IOP.

[Retour](#)

MITCHELL Michael:

Contribution des protéines BAF, BAF-L et lamine B3 au remodelage du noyau spermatique avant et après la fécondation

Les études soutiennent que la lamina nucléaire (LN) joue un rôle central dans le remodelage du noyau de spermatozoïde au cours de la spermiogénèse et constitue donc un déterminant important de la qualité des gamètes. Notre étude de la LN dans les spermatides au cours de la spermiogénèse humaine montre qu'elle est composée des lamines B1, B2 et un isoforme B3 spécifique aux spermatides, B1 et B3 étant retenues dans les spermatozoïdes éjaculés. Nous avons montré que la lamine B3 est capable de déformer l'enveloppe nucléaire, propriété qui pourrait être vitale pour le remodelage des spermatides (Elkhatib et al., 2015). L'évacuation de la LN du noyau de la spermatide dans le sens antéro-postérieur est coordonnée avec l'étalement de l'acrosome et l'élimination des histones. Dans les cellules somatiques, la LN forme des liaisons avec la chromatine par l'intermédiaire de protéines à domaine-LEM qui interagissent avec la protéine de chromatine BAF. BAF est nécessaire pour le réassemblage de la membrane nucléaire, et a un paralogue spécifique aux spermatides BAF-L. Nous avons trouvé BAF et BAF-L dans des spermatides allongées et des spermatozoïdes éjaculés, ce qui suggère qu'ils pourraient jouer un rôle clé dans le remodelage du noyau spermatique avant et après la fécondation. Notre objectif global est d'étudier la contribution de BAF, BAF-L et lamine B3 au remodelage du spermatozoïde au cours de la spermiogénèse et dans le cytoplasme ovocytaire après la fécondation, et à évaluer leur utilisation comme biomarqueurs de la qualité des gamètes. Nous étudierons les effets de l'absence de BAF-L et de lamine B3 en créant des souris knock-out par CRISPR-Cas9. Nous anticipons un phénotype limité à la spermiogénèse, basé sur l'expression prédominante dans les spermatides de BAF-L et de lamine B3. Nous définirons la fertilité, la spermiogénèse et la qualité des gamètes (morphologie, chromatine, motilité, marqueurs LN) chez la souris sans lamine B3 ou BAF-L. Des gamètes produits seront testés par fécondation in vitro, ou microinjection dans les ovocytes, pour leur capacité à donner un pronucléus mâle. Nous définirons également des protéines qui interagissent avec BAF-L et BAF dans les spermatozoïdes, par co-IP avec des protéines candidates identifier lors de nos études préliminaires. Enfin, par immunofluorescence, western blot et RT-PCR, nous étudierons les variations d'expression de ces biomarqueurs potentiels (persistance, augmentation ou diminution) entre les spermatozoïdes non sélectionnés et sélectionnés chez les hommes normospermiques (n = 25). Ces résultats seront analysés pour évaluer la relation entre chaque marqueur et la qualité des gamètes. Ainsi nous définirons les rôles de BAF, BAF-L et lamine B3 à travers la caractérisation de complexes protéiques, ce qui permettra d'identifier de nouveaux facteurs déterminants pour la fonction du spermatozoïde.

[Retour](#)

MOUTEL Grégoire:**Développement d'un outil d'aide à la décision en oncofertilité pour les jeunes femmes atteintes d'un cancer du sein**

La fertilité représente un enjeu majeur pour de nombreuses jeunes femmes atteintes de cancer du sein. Dans cette situation, il est admis que la mise en différé du projet de grossesse, durant laquelle le vieillissement ovarien physiologique se poursuit, et associée aux effets de la chimiothérapie peuvent avoir un impact négatif sur la fertilité future. La consultation d'oncofertilité doit être organisée idéalement avant l'initiation d'un traitement potentiellement gonadotoxique, et donc rapidement après le diagnostic de cancer. Les patientes doivent donc prendre une décision urgente et complexe ; la difficulté pour elles étant de se projeter dans un désir d'enfant immédiatement après l'annonce d'une maladie potentiellement mortelle.

Ce projet vise à développer un outil d'aide à la décision en ligne pour la préservation de la fertilité (PF) et à évaluer son efficacité lorsqu'il est intégré dans le parcours de soins du cancer, au moment du diagnostic et de la planification du traitement.

Cette étude multicentrique sera menée grâce à la collaboration d'un département de Médecine de la Reproduction, de 5 cliniques d'oncologie et d'une équipe spécialisée sur les questions d'éthique en santé et les questions de santé publique en cancérologie.

Elle a pour objectifs :

1. Une évaluation des besoins d'information sur la fertilité future de ces jeunes femmes =>

Construction de 2 « focus groups » :

- Un « focus group » de 5 patientes ayant préservé leur fertilité dans un contexte de cancer du sein,
- Un « focus group » de 5 spécialistes de la fertilité.

2. Le développement d'un outil d'aide à la décision sur une plateforme numérique à partir des besoins des patientes identifiées précédemment.

3. La mesure de l'efficacité de cet outil à l'aide d'une étude prospective randomisée, multicentrique. Cent cinquante jeunes femmes atteintes de cancer du sein, âgées de 18 à 40 ans seront randomisées en 2 groupe : accès à l'outil d'aide à la décision en ligne versus information écrite standard. L'objectif de cette étape est d'évaluer l'impact des modalités de diffusion de l'information sur les critères suivants : acceptation de la prise en charge, niveau de conflit décisionnel, mesure des connaissances et de l'anxiété.

Nous pensons que l'outil d'aide à la décision améliorera le processus de prise de décision en :

- réduisant le nombre de jeunes femmes qui ne savent pas quoi faire,
- accroissant les connaissances de ces jeunes femmes au sujet de l'infertilité, des options de PF et des résultats,
- réduisant les conflits de décision et les facteurs contribuant aux conflits décisionnels,
- augmentant la participation des jeunes femmes à la prise de décision sans nuire à l'anxiété.

Les résultats de ce projet de recherche permettront donc aux spécialistes de la fertilité et aux professionnels du cancer d'optimiser la prise en charge globale de ces jeunes femmes en leur proposant un outil d'aide à la décision de qualité, pour les guider dans les choix possibles concernant la PF.

[Retour](#)

PASQUIER Laurent:

Examen des caractéristiques génétiques d'une personne : identification et optimisation des organisations dans deux spécialités médicales

Faisant le constat d'une prescription massive d'un examen des caractéristiques génétiques d'une personne (ECGP) dans toutes les disciplines médicales et à tous les âges de la vie, la génétique est devenue une étape courante et indispensable de la prise en charge des patients. Pourtant, ces pratiques sont caractérisées par une incertitude entre l'essor technologique de la connaissance du génome (étude globale de l'ADN maintenant utilisée en pratique comme la puce à ADN ou l'exome) et les applications pour le diagnostic, les soins, et la prévention.

Par ailleurs, de par ses spécificités en termes d'interprétations, de risque héréditaire (tests diagnostiques) ou de tests présymptomatiques, l'ECGP fait l'objet d'un encadrement juridique contraignant (loi du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique et ses décrets d'application) ainsi que de recommandations de bonnes pratiques. Cet essor de données réglementaires autour des droits des personnes (notamment en termes d'information individuelle et à la parentèle, de formalisation du consentement et de protection de la personne) et un décalage avec les pratiques caractérisent également ce domaine médical.

Si les médecins généticiens sont sensibilisés aux spécificités de l'ECGP, il apparaît indispensable d'explorer ces pratiques auprès des médecins non généticiens, qui sont et deviendront de plus en plus premiers acteurs de cette prescription. En effet des questions majeures vont accompagner la prescription et le retour de résultats dans les années à venir et les équipes n'ont pas à ce jour de réponses ni de référentiels forcément clairs : contenu de l'information initiale à délivrer, modalités de retour des résultats et interprétation de leurs limites, obligation et conditions d'information de la parentèle. Ces situations peuvent générer de grandes incertitudes et disparité de pratiques. Un travail apparaît essentiel pour comprendre les conditions de réalisation d'un ECGP actuellement et envisager les évolutions nécessaires pour répondre à ces nouvelles questions.

Pour cela il conviendra d'explorer d'une part les circonstances selon lesquels un ECGP est proposé et d'autre part les modalités de réalisation de cet examen en termes de relation et d'information avec les patients. L'hypothèse de notre recherche est que les attentes de procédures et besoins de formation des professionnels seront les plus importants sur ces deux volets.

L'intérêt de cette recherche transdisciplinaire est d'explorer les facteurs médicaux, sociologiques et juridiques qui sont au cœur de ces pratiques professionnelles, d'en explorer les incertitudes et envisager les évolutions nécessaires pour l'avenir. Pour s'assurer de la faisabilité, le champ d'études sera restreint à une région administrative, la Normandie, et à deux disciplines médicales complémentaires et emblématiques de l'utilisation courante des examens des caractéristiques génétiques chez une personne : la neurologie et l'oncologie. La neurologie est notamment caractérisée par le diagnostic et la prise en charge de maladies neurodégénératives rares pour lesquelles il n'existe pas de moyens de prévention ou de traitement. A l'opposé, l'oncologie est caractérisée par des maladies relativement fréquentes (cancers du sein, prostate,...) parfois d'origine génétique, pour lesquelles il existe des outils efficaces de dépistages ou de traitements précoces.

L'identification de ces facteurs pourrait conduire à adapter les outils de formation initiale et continue vers l'ensemble des médecins prescripteurs de tests génétiques, ainsi que les procédures internes aux services, pour une optimisation médicale de cet acte particulier.

[Retour](#)

PETERMANN Rachel:

Application de la droplet digital PCR (ddPCR) dans le diagnostic prénatal non-invasif de l'incompatibilité plaquettaire foeto-maternelle

L'allo-immunisation plaquettaire foeto-maternelle résulte d'une incompatibilité parentale dans le système antigénique plaquettaire. Cette pathologie touche environ 1 naissance vivante sur 1000 chez les caucasiens et se traduit par la destruction des plaquettes du fœtus par les alloanticorps maternels dirigés contre un ou plusieurs antigènes plaquettaires du père, exprimés chez le fœtus et absents chez la mère. Il en résulte une thrombopénie foetale ou néonatale (TNN) dont les conséquences peuvent être très graves. En effet, les thrombopénies sévères sont parfois à l'origine d'hémorragies intracrâniennes (HIC) qui survient chez 10 à 30% des cas. Actuellement, le génotypage plaquettaire foetal est réalisé à partir de cellules amniotiques. Néanmoins, cette méthode s'appuie sur un gest invasif avec un risque d'hémorragie et de perte de fœtus estimé à environ 1%.

L'objectif de ce projet est de valider, sur une grande cohorte, la preuve de concept de l'utilisation de la PCR digitale en microgouttelettes (ddPCR : droplet digital PCR) pour le génotypage plaquettaire foetal dans le cadre du diagnostic prénatal non-invasif de l'incompatibilité plaquettaire foeto-maternelle. Cette technique est largement appliquée en clinique, elle permet entre autre, de caractériser l'ADN libre tumoral circulant chez des patients atteints de cancer avec une sensibilité allant jusqu'à 0,001%. Dans le cadre de ce projet, les régions spécifiques porteuses de polymorphismes des systèmes antigéniques plaquettaires HPA-1, -3, -5 et -15 seront amplifiées et quantifiées à partir de l'ADN libre dans la circulation maternelle puis comparées d'une part avec les résultats de génotypage obtenus à partir de l'ADN génomique des parents et d'autre part à partir de l'ADN foetal obtenu à partir du liquide amniotique ou après sa naissance. Ces systèmes sont responsables de plus de 95% des TNN. La ddPCR permettra également de vérifier, de manière sensible et fiable, la présence de l'ADN foetal dans le plasma maternel. La différence de méthylation du promoteur du gène RASSF1A entre les cellules maternelles et le placenta (foetus) nous permet de contrôler la présence d'ADN foetal par digestion enzymatique du plasma maternel.

Cette méthode pertinente et non-invasive de génotypage plaquettaire foetal permettrait de diagnostiquer une éventuelle incompatibilité plaquettaire foeto-maternelle et d'adapter la prise en charge biologique et thérapeutique des patientes.

[Retour](#)

PITON Amélie:**Développement d'outils fonctionnels, génétiques et cliniques d'aide au diagnostic de la déficience intellectuelle de type MRD7 (DYRK1A)**

Des mutations du gène DYRK1A causent une forme de déficience intellectuelle (DI) syndromique assez fréquente (MRD7, pour mental retardation autosomal dominant 7). Le gène DYRK1A code une protéine sérine/thréonine kinase, exprimée tout le long de la vie, et impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires. Une cinquantaine de variations potentiellement pathogènes ont été identifiées dans ce gène, par séquence haut-débit d'exome, de panels de gènes, ou par séquençage Sanger des régions codantes de DYRK1A. Parmi celles-ci, un tiers sont des variations faux-sens, pour lesquelles l'interprétation reste difficile et incertaine. Nous proposons dans ce projet de développer des outils pour l'interprétation de la pathogénicité des variants faux-sens de signification inconnue identifiés dans ce gène. Par ailleurs, nous souhaitons mieux définir le spectre clinique associé à une altération de DYRK1A et identifier des mutations de ce gène (ou de ses partenaires) qui échapperaient au séquençage classique des séquences codantes (Sanger ou haut-débit).

- Evaluation de l'effet fonctionnel de variants faux-sens dans le gène DYRK1A : Nous surexprimerons la protéine DYRK1A sauvage ou mutée et testerons son expression, localisation et activité kinase. Nous caractériserons également le phénotype engendré par une inactivation partielle de *dyrk1aa* chez le poisson zèbre (microcéphalie, etc) et réaliserons des tests de rescue avec de l'ARN de DYRK1A sauvage ou porteur de variations faux-sens.

- Identification de gènes cibles de DYRK1A et développement d'un test fonctionnel rapide et peu coûteux : Cette étude s'inscrit dans un projet plus global portant sur l'étude des conséquences moléculaires et cellulaires d'une haploinsuffisance de DYRK1A ou de mutations pathogènes affectant ce gène dans différents modèles, in vitro (précurseurs neuraux humains) et in vivo (zébrafish) dont le but est de mieux comprendre les mécanismes pathophysiologiques liés aux mutations du gène DYRK1A. Les conséquences moléculaires sur l'expression des gènes et leur épissage d'une altération du gène DYRK1A seront analysées dans des fibroblastes de patients porteurs de variants certainement pathogènes (RNAseq, qPCR). Les résultats obtenus seront comparés aux données générées dans les précurseurs neuronaux (étude en cours). Les gènes cibles dont l'expression ou l'épissage seront affectés par les mutations de DYRK1A dans les deux types cellulaires seront validés sur des ARN extraits de sang de patients. Une fois le test fonctionnel validé, nous entreprendrons d'étudier ces altérations sur des prélèvements (sang et/ou fibroblastes) de patients porteurs de faux-sens de signification inconnue.

- Meilleure caractérisation des signes cliniques associés à des mutations du gène DYRK1A : En parallèle de ces études fonctionnelles, nous chercherons à mieux définir le spectre clinique et connaître l'histoire naturelle des individus avec mutations dans le gène DYRK1A. Nous développerons un système de scoring clinique pour cette forme de DI (MRD7) et menerons des investigations fonctionnelles et génétiques chez les patients les plus cliniquement évocateurs sans mutation identifiée dans les séquences codantes du gène. Au final, ces études fonctionnelles, génétiques et cliniques nous permettront de mieux comprendre, de mieux diagnostiquer et de mieux prendre en charge les individus présentant une DI causée par une mutation dans le gène DYRK1A.

[Retour](#)

ROMANA Serge:

Diagnostic prénatal combiné des CNVs et SNVs par séquençage haut débit

Contexte : Les malformations congénitales sont détectées chez 3% des nouveau-nés. L'amélioration de l'imagerie anténatale permet leur détection en cours de grossesse dans le cadre du suivi échographique de routine. Cependant, les explorations génétiques réalisées lors de la découverte en anténatal d'une malformation se limitent le plus souvent à la recherche d'une anomalie chromosomique par caryotype ou par ACPA (Analyse Chromosomique sur Puce à ADN). En plus des aneuploïdies classiques (trisomie 21, 18 et 13) et des anomalies de structure visibles sur le caryotype, un CNV (Copy Number Variant) cryptique est retrouvé dans environ 6.5% des cas. Actuellement, une analyse de génétique moléculaire est rarement proposée, même lors d'une suspicion d'une pathologie connue, en raison de la lourdeur de la technique de séquençage Sanger. De plus, il existe souvent une hétérogénéité génétique qui ne permet pas d'obtenir un résultat dans les délais impartis de la grossesse car une analyse séquentielle des gènes par séquençage Sanger n'est actuellement pas réalisable en routine. Récemment, l'émergence de nouveaux outils de séquençage haut débit permettant le diagnostic simultané des anomalies chromosomiques et géniques ouvre de nouvelles perspectives.

Cependant, en prénatal, la mise en évidence de variants et/ou CNVs qui ne sont en rapport avec le phénotype du fœtus ou de signification inconnue (VOUS, variant of uncertain significance) pose de réels problèmes de conseil génétique. Concernant l'ACPA, nous avons élaboré une puce avec un "design à façon" afin d'éviter la détection des CNVs fréquents à pénétrance incomplète et/ou expressivité variable et des CNVs incluant des gènes impliqués dans des pathologies cancéreuses (puce PreCytoNEM). Le seuil de détection d'un CNV a été fixé à 1.5 Mb pour diminuer la détection des VOUS. En génétique moléculaire, la stratégie s'oriente vers un séquençage ciblé de gènes connus pour être impliqués dans des pathologies du développement.

Objectif : L'objectif de ce projet est de permettre le diagnostic prénatal des anomalies génomiques de structure et des SNVs (Single Nucleotide Variants) par une approche combinée en une seule expérience et adaptée à la situation du diagnostic prénatal en utilisant la technologie OneSeq proposée par la société AGILENT. Ainsi, un conseil génétique plus précis pourra être donné aux couples lors de la grossesse ce qui l'aidera à prendre une décision d'interruption de grossesse ou non.

Méthodologie : La société AGILENT propose le dispositif OneSeq qui permet la détection des CNVs avec une résolution de 300 kb et la détection de SNVs au niveau de 6500 gènes. En partenariat avec la société Agilent, nous avons adapté ce dispositif au diagnostic anténatal en choisissant des panels de gènes impliqués dans des pathologies du développement et qui sont responsables de malformations congénitales détectables à l'échographie et en utilisant une stratégie similaire à la puce PreCytoNEM pour la détection des CNVs.

Nous souhaitons analyser 90 individus comprenant 50 témoins pour lesquels une anomalie chromosomique ou génique a été mise en évidence.

Résultats attendus : la comparaison des résultats obtenus par l'outil OneSeq et ceux obtenus par l'ACPA et le séquençage ciblé de panels de gènes permettra de déterminer la fiabilité et la reproductibilité de ce nouveau dispositif avant de l'utiliser en prénatal.

Critères d'évaluation : le nombre de résultats concordants entre les techniques de référence (ACPA et panels de gènes ciblés) et OneSeq . [Retour](#)

ROUX Anne-Françoise:

Le poisson zèbre pour étudier l'impact des variants identifiés dans les pathologies neurosensorielles

Dans le cadre de notre activité diagnostique des pathologies neurosensorielles, nous identifions un nombre croissant de variants de signification clinique incertaine. Ce nombre a particulièrement explosé avec la mise en place d'un panel de gènes analysés par séquençage haut débit. Nos rendus de diagnostic se font à ce jour sur un panel de 121 gènes comprenant 61 gènes impliqués dans les surdités isolées, 38 gènes impliqués dans les rétinites pigmentaires autosomiques récessives, et les 10 gènes impliqués dans le syndrome de Usher (forme syndromique associant surdité et rétinite pigmentaire). Par ailleurs, une dizaine de gènes « candidats » sont également inclus dans ce panel. L'utilisation d'outils de prédiction en parallèle de la consultation des bases de données ne permet pas dans tous les cas d'aboutir à une classification du variant, rendant impossible un diagnostic de certitude d'implication du gène et un conseil génétique approprié. A cela s'ajoute une variabilité phénotypique associée à certains variants considérés comme pathogènes qui peut être difficile à expliquer et qui rend difficile le pronostic d'évolution des signes cliniques.

Une analyse fonctionnelle des altérations identifiées représente une approche de choix pour définir l'impact d'un variant, néanmoins, elle n'est pas toujours possible. Nous avons dans cette démarche mis en place des analyses fonctionnelles pour analyser l'effet des variants sur l'épissage de l'ARN pré-messager. Parce que l'analyse des transcrits peut s'avérer compliquée, voire impossible, nous utilisons une approche ex vivo par minigènes dans la majorité des cas. Cette approche est maintenant utilisée en routine dans notre activité diagnostique mais ne répond qu'à une hypothèse d'un impact sur l'épissage. A ce jour nous ne disposons pas d'outils fonctionnels pour évaluer les conséquences d'un variant au niveau protéique.

En continuité de notre démarche de diagnostic d'expertise, nous souhaitons mettre en place une plateforme d'analyse chez le modèle poisson zèbre pour déterminer non seulement si un variant identifié chez homme aura un impact mais aussi pour déterminer la gravité et l'évolution du phénotype. Le modèle poisson zèbre a déjà été utilisé avec succès pour l'analyse nombreuses pathologies dont les surdités, rétinites pigmentaires et syndrome de Usher.

Ce projet se fait en étroite collaboration avec « la plateforme poisson zèbre » de Montpellier. Il s'agit dans un premier temps d'analyser deux variants du gène USH1C, touchant la même position nucléotidique mais associés à des phénotypes très différents. Afin d'établir si la variabilité phénotypique est due à la nature de la mutation, plusieurs modèles de poissons zèbres seront créés. L'étude des organes impliqués se fera par analyse comportementale (testant aussi bien la fonction auditive que visuelle), par histologie et par immunohistochimie. Les résultats permettront non seulement de conclure à l'impact des variants USH1C mais aussi de valider la mise en place des protocoles de phénotypage. Cette approche novatrice d'étude fonctionnelle des variants sera alors appliquée aux autres gènes étudiés dans le secteur neurosensoriel.

[Retour](#)