

**Résumés des projets de recherche financés dans le cadre de l'appel d'offres 2016  
« AMP, diagnostic préimplantatoire et diagnostic génétique »**

Sujet de recherche	Chercheur	Thème	Subvention allouée
Evaluation de la sécurité et de la qualité des pratiques de diagnostic prénatal en cas de suspicion d'un retard de croissance intra-utérin	BENACHI A.	2	39 000 €
Efficacité comparée des approches de séquençage génome vs exome pour le diagnostic des dystonies	BEROUD C.	3	20 000 €
Présence de vacuoles céphaliques et épigénome des spermatozoïdes humains : description et potentiels impacts sur la décondensation du noyau spermatique et la formation du pronucléus mâle après fécondation hétérospécifique	BOITRELLE F.	4	25 000 €
La routinisation de la génétique en médecine préventive: Analyse de la diffusion des tests pour les thrombophilies non rares	BOURGAIN C.	1	15 000 €
RASopathies et morts foetales/périnatales et implications pour le diagnostic prénatal	CAPRI Y.	3	16 000 €
Le rôle du Gène à Effet Maternel BCAR4 dans la qualité de l'OVOcyte : approches in vivo et in vitro (GEMOVO)	DALBIES-TRAN R.	4	20 000 €
Approche combinée de séquençage de transcriptome (RNA seq) et d'Exome pour l'amélioration du diagnostic moléculaire de l'holoprosencéphalie	DAVID V.	3	30 000 €
GénéRHE: Génétique des reins hyperéchogènes en période anténatale	DECRAMER S.	3	20 000 €
Développement d'un test génétique pour le diagnostic des maladies neurologiques et neurodéveloppementales (neuromendéliome)	DEPIENNE C.	3	20 000 €
Obésité et qualité des spermatozoïdes humains : importance des adipocytokines ?	DUPONT J.	4	20 000 €
Culture in vitro de l'embryon : évaluation des conséquences épigénétiques de culture en milieu "one-step" ou "séquentiel"	DURANTHON V.	2	20 000 €
Altération de la réserve ovarienne: étude du rôle de l'exposition aux perturbateurs endocriniens persistants et aux solvants organiques	GARLANTEZEC R.	5	20 000 €
Bisphénol A et activation des récepteurs membranaires aux œstrogènes de l'embryon préimplantatoire de mammifères	LEANDRI R.	2	20 000 €
Séquençage de l'exome entier dans les arthrogryposes et les akinésies foetales à gène non identifié par l'exome ciblé	MELKI J.	3	15 000 €
Impact des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques sur la fécondation in vitro : des cellules parentales à la qualité embryonnaire précoce	PERRIN J.	4	20 000 €
Impact de la qualité nucléaire des spermatozoïdes murins générés in vitro sur le développement embryonnaire après ICSI	RIVES N.	5	30 000 €
Identification et caractérisation des mutations géniques chez des patients présentant une azoospermie par arrêt de maturation	VIALARD F.	1	10 000 €
Confirmation et établissement de la prévalence des mutations dans les gènes impliqués dans des infertilités humaines non-syndromique	VIVILLE S.	5	30 000 €
Influence du plastique des boîtes pétri sur la régulation de l'expression du génome au cours de l'AMP, chez la souris	WOLF JP.	2	10 000 €

**Alexandra Benachi:**

Evaluation de la sécurité et de la qualité des pratiques de diagnostic prénatal en cas de suspicion d'un retard de croissance intra-utérin

**Objectifs :**

Les objectifs de ce projet sont :

1) D'étudier la conformité des pratiques de diagnostic prénatal en cas de suspicion d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU) aux recommandations nationales de 2013 sur la prise en charge des grossesses avec RCIU

2) D'évaluer la pertinence des gestes prénataux invasifs réalisés selon les anomalies détectées, les issues obstétricales et néonatales

3) De mesurer l'apport de la CGH-array au diagnostic d'anomalies chromosomiques par rapport à la technique conventionnelle d'analyse du caryotype fœtal

**Méthodes :**

Cette étude sera rétrospective observationnelle et portera sur toutes les grossesses uniques ou multiples suspectées avec un RCIU sans malformation associée, orientées dans un des 48 centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal (CPDPN) en France.

Le critère de jugement principal sera la conformité des pratiques de diagnostic prénatal et des critères d'orientation des femmes en CPDPN aux recommandations nationales.

Les critères de jugement secondaires incluront i) les résultats de l'amniocentèse en lien avec les issues obstétricales et néonatales, ii) les complications associées aux gestes prénataux invasifs et iii) l'apport de la CGH-array pour détecter des anomalies chromosomiques par rapport à l'analyse conventionnelle du caryotype.

L'étude débutera en 2017 et sera menée de manière rétrospective sur dossiers médicaux, sur une période de deux ans. Un total d'environ 800 cas est attendu. La population des femmes adressées dans les CPDPN sera décrite puis l'analyse cherchera à comparer les femmes répondant aux critères d'orientation en CPDPN à celles adressées avec des indications non conformes. Parmi les cas de CGH-array réalisés, nous identifierons les cas pour lesquels cet examen avait été informatif par rapport à l'analyse conventionnelle du caryotype et son impact sur les issues des grossesses. Une relecture des résultats des caryotypes obtenus par CGH-array sera réalisée par deux cytogénéticiens pour évaluer l'apport fourni par sa réalisation comparativement à la technique de référence.

**Résultats attendus :**

Ce projet permettra de fournir des données sur la conformité des critères d'orientation des femmes dans les CPDPN et des pratiques de diagnostic prénatal en cas de suspicion d'un RCIU. Ces données permettront d'informer les professionnels de la périnatalité pour améliorer la prise en charge des femmes en CPDPN. De plus, nos résultats constitueront un premier état des lieux de l'utilisation de la CGH-array en France et de son apport à la détection d'anomalies chromosomiques en cas de suspicion d'un RCIU. Ces données pourront être à l'initiative de travaux de réflexion et de recherche concernant les stratégies de dépistage en cas de RCIU suspecté et en particulier, autour de l'utilisation de la CGH-array par l'étude de ses bénéfices et de son impact sur la prise en charge et le vécu des couples.

**Christophe Beroud:**

Efficacité comparée des approches de séquençage génome vs exome pour le diagnostic des dystonies

**Objectifs :**

L'objectif de ce projet est d'étudier l'impact scientifique, médical, thérapeutique, éthique et financier de l'approche pangénomique pour le diagnostic génétique des dystonies.

**Résultats attendus :**

Les résultats permettront d'évaluer :

- Le coût global de l'analyse pour chacune de ces techniques prenant en compte les analyses bioinformatique
- L'efficacité du diagnostic en termes d'identifications de mutations
- L'impact des étapes de capture sur la qualité des informations obtenues par séquençage haut débit
- Le délai de rendu de résultat par les deux techniques

L'ensemble de cette analyse nous permettra d'augmenter l'efficacité du diagnostic en termes d'identification de mutations, de coût et de délais.

**Méthodologie :**

Nous proposons de tester une trentaine de patients en appliquant sur un même prélèvement d'une part une stratégie de séquençage de tous les exons après capture (séquençage de l'exome ou « Whole Exome Sequencing » [WES] et d'autre part une approche de séquençage du génome complet i.e. sans étape de capture (séquençage du génome ou « Whole Genome Sequencing » [WGS]).

**Florence Boitrelle:**

Présence de vacuoles céphaliques et épigénome des spermatozoïdes humains : description et potentiels impacts sur la décondensation du noyau spermatique et la formation du pronucléus mâle après fécondation hétérospécifique

**Objectifs :**

La condensation de la chromatine spermatique est une somme d'événements épigénétiques complexes aboutissant au remplacement dans le spermatozoïde humain de la majorité des histones par les protamines. Ces événements conduisent à l'établissement spermatique de « marques épigénétiques » connues pour influencer le développement embryonnaire par l'intermédiaire d'une régulation de l'expression ou de la répression de gènes. Ceci dit en ICSI (intracytoplasmic sperm injection), lorsque l'on sélectionne un spermatozoïde de morphologie normale, rien ne garantit son statut épigénétique. D'un autre côté, dans nos précédents travaux, nous avons montré que les vacuoles céphaliques spermatiques, telles qu'on peut les observer au fort grossissement en IMSI ((intracytoplasmic morphologically selected injection) étaient en lien avec une non-condensation de la chromatine. Nous émettons donc l'hypothèse que certaines marques épigénétiques impliquées dans la structuration de la chromatine pourraient différer d'un spermatozoïde à un autre en fonction de la présence ou non de vacuoles. Pour tester cette hypothèse, nous utiliserons le modèle humain et le modèle bovin. Dans un premier temps, une dizaine de marques épigénétiques sera étudiée dans les spermatozoïdes humains en fonction de la présence ou non de vacuoles. Puis, le modèle bovin nous permettra d'étudier le devenir des marques épigénétiques après fécondation hétérospécifique, dans les ovocytes bovins fécondés hétéro-spécifiquement par les spermatozoïdes humains vacuolés ou non. Ce devenir sera évalué aux stades très précoces post-injection à savoir aux stades de la décondensation du noyau spermatique et à celui de la formation du pronucléus mâle ; deux événements se produisant tous deux avant la syngamie. Ces études de la décondensation spermatique et de formation du pronucléus mâle se feront selon le même principe que celui du hamster-test mais chez le bovin.

**Résultats attendus :**

Dans un premier temps, nous décrirons chez l'homme une dizaine de marques épigénétiques qui pourraient être différenciellement exprimées dans les noyaux spermatiques en fonction de la présence ou non de vacuoles. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à l'impact des vacuoles et donc de ces marques épigénétiques d'intérêt sur le développement de l'ovocyte issu d'une fécondation hétérospécifique (spermatozoïde humain-ovocyte bovin) jusqu'aux stades très précoces de décondensation du noyau spermatique et de formation du pronucléus mâle (avant la syngamie) par une approche de « tracking » in vivo.

Ce projet nous permettra de mieux comprendre l'impact des vacuoles et des marques épigénétiques sur le développement du pronucléus mâle, d'améliorer nos connaissances concernant la qualité du gamète humain, de mieux sélectionner le spermatozoïde comportant les marques épigénétiques donnant les meilleures chances, de (mieux) comprendre les résultats de l'IMSI chez l'humain et d'en dégager les meilleures indications, si elles existent.

**Méthodologie :**

L'analyse des marques épigénétiques dans les spermatozoïdes humains sera basée sur (1) la sélection à fort grossissement de spermatozoïdes vacuolés ou non (2) l'immuno-détection de ces marques et (3) l'analyse en microscopie 3D de leur distribution dans le noyau spermatique. Deuxièmement, si tel

que nous l'attendons, une ou plusieurs marques épigénétiques différent dans les spermatozoïdes humains en fonction de la présence de vacuoles ou non, le suivi in vivo de ces marques épigénétiques différent dans les spermatozoïdes humains en fonction de la présence de vacuoles ou non, le suivi in vivo se fera dans l'ovocyte bovin après fécondation hétérospécifique (spermatozoïde humain vacuolé ou non-ovocyte bovin). Ce suivi sera réalisé à l'aide de l'injection intra-ovocytaire d'anticorps fluorescents Fabs, repérage morphologique du pronucléus mâle et suivi de la fluorescence des Fabs au cours de la première étape post injection (décondensation spermatique et formation du pronucléus mâle) avant la syngamie. Il n'y aura ni syngamie ni développement embryonnaire.

### **Catherine Bourgain:**

La routinisation de la génétique en médecine préventive: Analyse de la diffusion des tests pour les thrombophilies non rares

Le terme de thrombophilies non-rares (TNR) désigne l'ensemble des anomalies génétiques de l'hémostase identifiées depuis 1965 comme prédisposant à une maladie thromboembolique veineuse (MTEV) récidivante. Deux mutations en particulier (facteurs V et II), relativement fréquentes, contribuent à augmenter le risque de survenue ou de récurrence de MTEV, mais de façon non déterministe. Depuis 2010, les tests génétiques pour les TNR constituent pourtant les examens de génétique moléculaire postnatale les plus courants en France (31% de tous les examens réalisés en 2014). Cette montée en puissance s'inscrit dans un mouvement plus général qui voit plusieurs tests génétiques de susceptibilité occuper les premières places des examens de génétique postnatale. Depuis 2012, l'agence de biomédecine s'étonne de façon récurrente de cette situation et appelle à « une réflexion globale sur l'intérêt de tels examens ».

Ce projet vise à analyser les conditions de la diffusion des tests de susceptibilité génétique aux maladies fréquentes dans la routine clinique, pour décrypter les enjeux qu'ils posent à la santé publique. Pour ce faire, il s'intéresse au cas des tests génétiques pour les TNR.

Cette enquête s'organisera autour de deux axes complémentaires : l'histoire de la validation scientifique et clinique des tests génétiques pour les TNR en France et de leur inscription à la nomenclature (axe 1) et l'étude de l'intégration rapide de ces tests dans la pratique médicale de routine (axe 2).

Le premier axe reposera sur une étude de la littérature scientifique et des rapports et avis émis, complétée par des entretiens avec des protagonistes. Nous analyserons les débats au sein des spécialités médicales et scientifiques ainsi que les conditions des prises de décisions institutionnelles. L'objectif sera d'en cerner les ressorts disciplinaires, organisationnels, économiques et politiques.

Le second axe reposera sur la conduite d'une enquête ethnographique effectuée en grande partie au sein du service de médecine vasculaire du CHU de Nantes. Cette enquête visera à comprendre ce qui procède des cultures médicales disciplinaires mobilisées, de l'expérience des patients et personnes concernées, et de la spécificité génétique des tests. Elle reposera sur des entretiens avec les personnels soignants et les personnes testées (patients ou apparentés sains), complétés par un travail d'observation ethnographique des consultations médicales.

Les deux démarches méthodologiques retenues et les compétences complémentaires des chercheurs impliqués, constituent une approche inédite pour aborder un tel sujet. De cette perspective interdisciplinaire pourra découler une précision dans l'analyse des dimensions spécifiques aux tests

de susceptibilité des TNR ainsi que des hypothèses étayées sur les éléments généralisables à tous les tests de susceptibilité génétique.

**Yline Capri:**

## RASopathies et morts foetales/périnatales et implications pour le diagnostic prénatal

Le terme RASopathies regroupe des pathologies cliniquement et biologiquement proches. Elles partagent à des degrés divers des cardiopathies/cardiomyopathies, un retard de croissance, une dysmorphie faciale, une atteinte cutané-phanérienne, des troubles des apprentissages et un risque tumoral. Il s'agit de maladies génétiques dominantes ou sporadiques causées par l'anomalie de protéines ubiquitaires appartenant à la voie de signalisation cellulaire RAS-MAPKinase. Il existe plus de 15 gènes actuellement impliqués dans ce spectre.

Le syndrome de Noonan est la plus fréquente des RASopathies, le diagnostic est le plus souvent porté dans l'enfance mais certains patients présentent une forme sévère et précoce avec des signes anténataux entraînant l'interruption médicale de grossesse ou le décès périnatal. Cette forme se manifeste souvent par des épanchements sous-cutanés ou des séreuses (hygroma colli, chylothorax, anasarque), une cardiopathie/cardiomyopathie ou une leucémie myélomonocytaire juvénile. Ces signes étant inconstants et peu spécifiques, le diagnostic est souvent rétrospectif.

Avant la description des bases moléculaires du syndrome de Noonan, la prévalence du syndrome parmi les fœtus avec clarté de nuque augmentée était estimée entre 1 et 3%. Les rares études récentes de séries prénatales comportant des signes anténataux retrouvent une fréquence des RASopathies de 6,5 à 17,3 %.

Les nouvelles techniques de séquençage haut débit offrant la possibilité d'étudier plusieurs gènes simultanément s'appliquent parfaitement aux RASopathies dont l'hétérogénéité clinique et génétique rendent très longue la confirmation diagnostique par séquençage traditionnel. Cette technologie a été mise en place dans notre laboratoire et nous souhaitons étudier les possibilités de l'appliquer en période anténatale, ce qui n'était pas envisageable jusqu'à présent.

L'objectif principal de la présente étude est de déterminer la proportion de fœtus atteints de RASopathie en analysant une série de 200 fœtus ou enfants nés vivants ayant présenté une pathologie lymphatique périnatale sévère avec décès in utero ou dans les 28 jours suivant la naissance. Les objectifs secondaires seront de mieux caractériser les signes échographiques pertinents pour poser l'indication du séquençage des gènes de RASopathie en cours de grossesse et éventuellement de dégager un profil différent entre les mutations retrouvées dans les formes foetales et/ou létales et celles connues en post-natal dans des formes non létales de RASopathie.

Cette étude permettra par ailleurs d'estimer la faisabilité, le coût, l'intérêt et les indications du séquençage haut débit des gènes de RASopathie en prénatal et pour le conseil génétique.

Nous incluons de façon prospective sur 3 ans, 200 fœtus issus des centres de fœtopathologie de l'AP-HP présentant une pathologie lymphatique périnatale sévère ou létale (augmentation de la clarté de nuque ou hygroma colli, isolé ou associé à une malformation ; un ou plusieurs épanchements des séreuses) et/ou une cardiomyopathie hypertrophique, sans anomalie chromosomique ou autre cause identifiée. Le recueil de données échographiques et autopsiques sera réalisé au travers d'un questionnaire. Le séquençage systématique de l'ensemble des gènes connus de la voie RAS sera effectué.

Le nombre attendu de fœtus avec mutation est de 20 à 30. Ces fœtus avec mutation seront comparés à la population de fœtus sans mutation.

**Rozenn Dalbès-Tran:**

Le rôle du Gène à Effet Maternel BCAR4 dans la qualité de l'OVOcyte : approches in vivo et in vitro (GEMOVO)

La qualité de l'ovocyte requiert, outre sa maturation nucléaire au stade métaphase II, la constitution d'un stock optimal d'ARN et de protéines. En effet, l'activité de transcription est minimale pendant la reprise de la méiose, la fécondation et les premières divisions de l'embryon : leur bon déroulement repose donc sur le recrutement de ces facteurs ovocytaires, jusqu'à l'activation majeure du génome embryonnaire, à un stade variable selon les espèces (2 cellules chez la souris, 4/8 cellules chez l'homme, 8/16 cellules chez le lapin ou la vache).

Notre équipe a démontré l'expression dans l'ovocyte du gène BCAR4 (Breast Cancer Anti-estrogen Resistance 4) chez la femme, la vache et la lapine (Thelie et al, 2007; Angulo et al, 2013). En revanche, le gène n'existe pas chez la souris. Chez la vache, la protéine est synthétisée dans l'ovocyte juste avant l'ovulation, devient abondante après la fécondation, et persiste jusqu'au stade morula. Son inhibition par microinjection d'ARN interférents dans l'ovocyte avant la fécondation in vitro provoque une diminution du taux de développement jusqu'aux stades morula et blastocyste. Le gène BCAR4 a été identifié récemment comme un marqueur de certaines tumeurs du sein; il pourrait agir via la protéine ou l'ARN non codant. Globalement, la phylogénie, la fenêtre temporelle d'expression, les données fonctionnelles in vitro et les propriétés pro-prolifératives dans les cellules tumorales indiquent que BCAR4 est un gène à effet maternel, impliqué dans les premières divisions de l'embryon chez les mammifères à activation embryonnaire tardive.

Pour autant, son rôle in vivo et son mécanisme d'action dans l'embryon restent inconnus, et font l'objet de ce projet.

- objectif 1 : démontrer le rôle du gène BCAR4 in vivo. Des lapines porteuses d'un gène BCAR4 inactivé seront phénotypées sur plusieurs paramètres liés à la reproduction : activité ovarienne, ovulation, fécondation et développement embryonnaire, gestation, taille de portée. Il est attendu une stérilité des femelles par arrêt prématuré du développement embryonnaire.

- objectif 2 : préciser le mécanisme moléculaire d'action de BCAR4 dans l'ovocyte et l'embryon. La seule séquence de BCAR4 ne permet pas de suggérer un rôle pour ce gène. La protéine ou le transcrit agissent probablement au sein d'un complexe avec des partenaires protéiques que nous identifierons par co-précipitation avec BCAR4 dans des extraits cellulaires, suivie d'une analyse par spectrométrie de masse.

Les résultats de ce programme intéresseront le domaine de l'assistance médicale à la procréation. En effet, en provoquant un arrêt précoce du développement embryonnaire, des mutations dans des gènes à effet maternel peuvent être à l'origine d'infertilités féminines jusqu'alors inexpliquées. Identifier chez ces patientes de telles mutations permettrait de poser un diagnostic, de leur épargner des échecs répétés de fécondation in vitro, mais aussi de réduire l'impact économique de tentatives inutiles.

**Véronique David:**

Approche combinée de séquençage de transcriptome (RNA seq) et d'Exome pour l'amélioration du diagnostic moléculaire de l'holoprosencéphalie

L'holoprosencéphalie (HPE) résulte d'un défaut de clivage de la ligne médiane cérébrale et représente la plus fréquente des anomalies du développement du cerveau (1/10000 naissances, 1/250 conceptions). Elle est caractérisée par une expressivité phénotypique variable au niveau de la face et du cerveau et son étiologie est à la fois environnementale et génétique. Son mode de transmission d'abord considéré comme dominant, est maintenant établi comme multigénique. Le CHU de Rennes est le centre de référence national pour cette pathologie. Plus de 1000 échantillons de patients issus de l'ensemble du territoire français et de pays européens ont été regroupés au sein de notre CRB. Après avoir ciblé la recherche de mutations sur les gènes majeurs (SHH, ZIC2, SIX3 et TGIF), nous avons mis en place une stratégie de séquençage haut-débit sur un panel de 20 gènes mineurs et candidats, ce qui a augmenté le taux de mutations identifiées de 30% à 40%. Le séquençage d'exomes de familles consanguines et de trios nous a permis d'identifier un nouveau gène (STIL) et d'impliquer le gène DISP1 dans deux familles. L'analyse de trios a révélé aussi de nombreuses variations dans des gènes candidats. Leur validation comme mutation pathogène passe par l'observation de leur présence récurrente dans un plus grand nombre de familles, mais aussi par des investigations supplémentaires telles que des tests fonctionnels ou l'évaluation de leur répercussion sur le transcriptome. L'analyse exomique sera donc complétée par une approche de séquençage haut-débit de transcriptome (RNA seq) sur tissu cérébral de fœtus qui nous permettra d'évaluer l'impact de mutations rares sur le transcriptome et particulièrement l'épissage alternatif des gènes correspondants. Cette approche est aujourd'hui rendue possible par la réalisation d'un séquençage d'ARN extrait d'échantillons fixés et inclus en paraffine (FFPE, formaldehyde fixed paraffin embedded) et conservés par le foetopathologiste après l'autopsie.

L'objectif est de mener une étude rétrospective, portant sur la comparaison de séquences d'exomes, et du transcriptome obtenu à partir d'échantillons FFPE de tissu cérébral obtenu après interruption médicale de grossesse (IMG). Cette étude a pour but :

1/ de valider les mutations neutres responsables d'altération du transcriptome (épissage d'alternatif particulièrement)

2/ d'augmenter le nombre d'exomes réalisés chez des fœtus atteints d'HPE, permettant de valider certains gènes déjà considérés comme candidats.

**Méthodes :**

Séquençage d'ARN couplé au séquençage d'exome sur 20 individus pour lesquels nous disposons à la fois de lames FFPE de tissus cérébraux et d'ADN de sang total.

Résultats attendus: Validation de mutations dans de nouveaux gènes responsables de l'holoprosencéphalie ; amélioration du diagnostic et du conseil génétique et du diagnostic prénatal de cette pathologie ; contribution à une meilleure connaissance de la physiopathologie de cette maladie complexe du développement cérébral.

**Stéphane Decramer:****GénéRHE: Génétique des reins hyperéchogènes en période anténatale**

L'identification d'une hyperéchogénicité rénale en période anténatale (isolée ou associée à des kystes rénaux) est une situation fréquente mais dont la prise en charge et le conseil génétique à apporter demeurent difficiles. Des mutations du gène HNF1B sont identifiées chez environ 40 à 50 % des fœtus avec des reins hyperéchogènes (RHE) de taille normale ou discrètement diminuée ou augmentée, tandis qu'une mutation dans un des gènes associés à la polykystose dominante (PKD1/PKD2) ou dans le gène PKHD1 de la Polykystose Hépatorenale Autosomique Récessive (PKAR), est classiquement identifiée chez les fœtus avec des reins de grande taille. Dans plus de 40% des cas, aucun diagnostic moléculaire ne peut être posé. Cette absence de diagnostic s'accompagne d'une évaluation incertaine du pronostic rénal à court terme, d'une méconnaissance des risques de pathologies extra-rénales surajoutées et donc d'un suivi non adapté aux risques réels encourus en période post-natale, dans l'enfance et à l'âge adulte.

Dans une première étude utilisant la technique d'exome sequencing, nous avons pu identifier 8 gènes candidats chez des individus présentant des reins hyperéchogènes de taille normale ou diminuée, mais sans mutation d'HNF1B. Les objectifs du projet faisant l'objet de la demande de financement auprès de l'ABM sont de confirmer l'implication de ces 8 gènes dans une large cohorte de 96 patients avec des RHE, d'identifier de nouveaux gènes associés aux RHE parmi un panel de 150 gènes candidats issus de la littérature, et de préciser les corrélations génotype – phénotype (fonction rénale à moyen et long terme, symptômes extra-rénaux, aspects échographiques). Pour cela, une approche par séquençage haut débit ciblant les régions génomiques d'intérêt (8 gènes candidats précédemment identifiés, gènes candidats de la littérature) sera réalisée dans la cohorte des 96 patients (échantillons déjà disponibles). L'implication des gènes identifiés sera validée in vitro dans un modèle cellulaire présentant une invalidation d'HNF1B ou une invalidation du gène candidat. Ce travail s'adosse à un projet de recherche plus large visant à caractériser de nouveaux biomarqueurs, identifiés dans le liquide amniotique ou l'urine fœtale, permettant de prédire la fonction rénale à long terme de fœtus présentant des anomalies du développement rénal (PHRC BIOMAN 2010, Klein et al. Science Transl Medicine 2013). A terme, ce projet devrait permettre de mieux caractériser les anomalies génétiques à l'origine de l'apparition de reins hyperéchogènes isolés ou associés à des kystes rénaux, et donc à améliorer la prise en charge des enfants atteints de ces pathologies et le conseil génétique délivré aux familles d'enfants atteints de RHE

**Christel Depienne**

## Développement d'un test génétique pour le diagnostic des maladies neurologiques et neurodéveloppementales (neuromendéliome)

Les maladies neurodéveloppementales constituent un ensemble cliniquement hétérogène dont la cause est génétique dans de multiples cas. Ces pathologies représentent de 1 à 5% des naissances et constituent un problème majeur de santé publique. Des mutations dans ~2500 gènes ont été associées en 2015 à un syndrome génétique dont l'atteinte est cérébrale ou associée à un signe neurologique. Actuellement, les capacités de diagnostic génétique des maladies neurodéveloppementales sont limitées en France comparé à d'autres pays européens comme les Pays-Bas, et aucun test diagnostique n'est proposé lorsque des malformations cérébrales sont identifiées en prénatal. Par exemple, la découverte d'une agénésie du corps calleux isolée chez un fœtus sera associée dans 70% des cas à un développement cognitif normal et dans 30% des cas à une évolution défavorable vers une déficience intellectuelle. En l'absence de test génétique permettant d'identifier la cause de cette malformation, le conseil génétique reste basé sur ces statistiques.

L'objectif de ce projet est de développer un test génétique unique et évolutif (neuromendéliome) pour le diagnostic des maladies neurodéveloppementales représentant une alternative rationnelle au séquençage d'exome, qui reste encore cher en pratique clinique et présente des inconvénients comme la possibilité d'identifier des mutations avec répercussion clinique sans rapport avec l'indication de départ (incidental findings). Ce test est basé sur le séquençage haut-débit, après capture, des régions codantes de ~3500 gènes (15 Mb) dont 2500 sont responsables de syndromes génétiques reconnus avec une atteinte cérébrale et 1000 sont des gènes candidats sur la base de leur fonction ou de leur expression cérébrale préférentielle. Cette liste de gènes sera révisée tous les 6 mois.

Ce panel sera testé dans le cadre de ce projet sur deux cohortes différentes déjà recrutées (ADN des patients et parents disponible) :

1) une cohorte post-natale constituée de 50 patients avec DI, encéphalopathie épileptique ou trouble du développement sans diagnostic étiologique et

2) une cohorte "prénatale", constituée de 30 fœtus interrompus pour malformation cérébrale ou patients nés après un diagnostic prénatal de malformation cérébrale (par exemple une agénésie du corps calleux).

Les patients seront analysés avec (n=55 trios) ou sans (n=25 solos) leur parents. L'enrichissement en régions cibles sera effectuée avec la technologie SeqCap EZ choice Library (Roche) et le séquençage sera réalisé sur HiSeq 2500 (Illumina) à la plate-forme de l'IGBMC (Strasbourg). Le test diagnostique développé sera ensuite transféré au laboratoire de diagnostic génétique (Hôpitaux universitaires de Strasbourg).

Le développement du panel neuromendéliome permettra de compléter l'offre des panels diagnostique déjà existant et de proposer un diagnostic génétique aux patients sans diagnostic étiologique et/ou pour lesquels aucune analyse n'est actuellement disponible en France. Il sera en outre utilisé comme test diagnostique en périodes prénatale et néonatale pour établir des diagnostics précoces chez des fœtus ou des nouveau-nés pour lesquels il n'existe actuellement aucun test adapté

malgré l'urgence dans ces situations de prédire le pronostic cognitif et de définir parfois une prise en charge adaptée à l'anomalie génétique.

**Joëlle Dupont:**

**Obésité et qualité des spermatozoïdes humains : importance des adipocytokines ?**

Comme dans de nombreux pays, l'obésité en France est en augmentation significative depuis ces dernières années. En plus d'être associée au diabète de type 2, aux maladies cardiovasculaires et aux cancers, l'obésité a un impact sur la fertilité chez la femme et chez l'homme. Chez l'homme, contrairement à la femme, les études sur la relation entre indice de masse corporelle (IMC) et paramètres spermatiques sont plus rares et relativement récentes. L'obésité se définissant par un excès de tissu adipeux, une des hypothèses est que les molécules produites et secrétées par le tissu adipeux blanc, appelées adipocytokines, pourraient affecter les fonctions gonadiques. Parmi ces adipocytokines, l'adiponectine (Adipo), la résistine (Res), la visfatine (Visf), la chemerine (Chem) et l'omentine (Omen) ont été récemment étudiées par notre laboratoire dans les cellules de l'ovaire chez la femme. Les résultats montrent que ces hormones sont capables de moduler *in vitro* la production de stéroïdes. Ces adipocytokines n'ont cependant pas encore été beaucoup étudiées au niveau du sperme humain.

Chez l'homme, les objectifs de notre projet sont :

1. de caractériser en collaboration avec le service de la reproduction de Tours (Partenaire 2) la présence des adipocytokines (Adipo, Res, Visf, Chem et Omen) dans le liquide séminal et de leur récepteur au niveau des cellules testiculaires chez des patients fertiles (ne présentant aucune anomalie dans leur spermogramme)
2. d'évaluer en collaboration avec le Laboratoire Biologie de la Reproduction Hôpital Tenon/Inserm UMR S938 (Partenaire 3) les relations entre ces nouvelles adipocytokines présentes dans le sérum et le plasma séminal avec d'une part les paramètres spermatiques et d'autre part avec les résultats des cycles d'AMP (Aide Médicale à la Procréation). Ce travail sera réalisé sur une cohorte de patients partenaires de couples infertiles avec différents IMC et perturbations métaboliques pris en charge en AMP et inclus dans le protocole de recherche clinique METASPERME
3. de déterminer les effets *in vitro* de ces adipocytokines sur la fonctionnalité des spermatozoïdes chez des patients témoins en collaboration avec le partenaire 2.

Les résultats de cette étude permettront d'identifier des bio-marqueurs innovants de la qualité du spermatozoïde et apporteront de nouveaux concepts qui serviront à améliorer la qualité des gamètes humains. Ils permettront aussi d'émettre l'hypothèse d'une perturbation de la sensibilité à l'insuline, et des adipocytokines au niveau du sperme de patients présentant un syndrome métabolique.

**Véronique Duranthon:**

Culture in vitro de l'embryon : évaluation des conséquences épigénétiques de culture en milieu "one-step" ou "séquentiel"

En AMP, l'objectif de transfert d'un embryon unique incite à recourir à la culture embryonnaire jusqu'au stade blastocyste pour mieux sélectionner l'embryon à transférer. Deux stratégies de culture sont alors possibles : l'utilisation d'un milieu unique ou d'un milieu séquentiel. A ce jour, les critères objectifs de choix entre ces stratégies manquent encore. L'objectif de ce projet est d'évaluer si l'une ou l'autre de ces stratégies est plus proche des conditions de développement in vivo quant à l'évolution de l'épigénome des conceptus et de leur placenta et à la croissance fœtale.

A cette fin nous utiliserons deux milieux de culture très couramment utilisés en France : le milieu Global (Life Global) et la séquence G1+G2+ (Vitrolife). En utilisant l'embryon de lapin comme modèle plus proche de l'embryon humain que ne l'est la souris, nous avons montré grâce à un financement ABM que chacune de ces deux conditions de culture aboutit à des perturbations spécifiques des cinétiques de déméthylation du génome embryonnaire au cours des clivages. Aucune des dynamiques observées ne ressemble à celle d'embryons développés in vivo. Il est donc nécessaire de poursuivre l'évaluation de ces deux procédures en analysant le méthylome des individus obtenus à deux stades clefs ultérieurs: juste après la reméthylation qui a lieu en période péri-implantatoire, susceptible d'effacer, maintenir ou amplifier les anomalies précoces de méthylation, et en période périnatale. Ces stades n'étant pas accessibles chez l'homme nous poursuivrons l'analyse sur des conceptus de lapin à Jour 6 et 28 respectivement. L'évolution des méthylomes dépendant des feuillettes embryonnaires nous distinguerons à Jour 6 l'épiblaste, précurseur des tissus fœtaux dont le foie qui sera analysé à Jour 28, l'hypoblaste, précurseur de la vésicule vitelline et le trophoblaste précurseur du placenta analysé à Jour 28. Les méthylomes correspondants seront analysés à l'échelle du génome entier par Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS). Nous identifierons des Régions Différentiellement Méthylées (DMRs) en fonction des conditions de développement (Global/ G1+G2+/ in vivo) et des feuillettes et organes. Ces DMRs seront localisées sur le génome, celles situées dans des régions régulatrices de gènes importants pour la fonction des feuillettes ou organes analysés seront confirmées par traitement bisulfite et pyroséquençage, leur influence éventuelle sur l'expression génique sera analysée par RT-qPCR. L'analyse de données Echo-Doppler relevées à Jour 14, 21 et 28 sur les conceptus étudiés mettra en évidence d'éventuelles anomalies de croissance. Par comparaison avec l'embryon développé in vivo, ce projet aboutira donc à une évaluation de l'innocuité de chacune de ces deux conditions de culture longue en matière d'épigénome et de croissance fœtale. Les DMRs identifiées pourront être ensuite utilisées comme un panel de biomarqueurs pour valider d'autres conditions de culture.

**Ronan Garlandézec:**

Altération de la réserve ovarienne: étude du rôle de l'exposition aux perturbateurs endocriniens persistants et aux solvants organiques

L'objectif du projet est d'étudier la relation entre l'exposition à des polluants persistants de type perturbateurs endocriniens et aux solvants organiques et l'altération de la réserve ovarienne chez des femmes en âge de procréer.

**Résultats attendus :**

projet permettra d'améliorer les connaissances sur l'étiologie de l'altération de la réserve ovarienne. Il s'agit à notre connaissance de la première étude de ce type concernant les expositions d'intérêt. Compte tenu des conséquences de cette pathologie (infertilité féminine) et de la fréquence des expositions concernées, l'impact des résultats en termes de santé publique pourrait être important (certaines des expositions ciblées dans le projet pouvant être prévenues).

**Méthodologie :**

Les cas et les témoins seront inclus parmi les nouveaux couples consultant pour infertilité (dans 4 centres d'aide médicale à la procréation (AMP) dans la région Bretagne Pays de Loire. Les cas seront des femmes présentant au moins une caractéristique d'altération de la réserve ovarienne : un nombre de follicules antraux inférieur à 7 et/ou un niveau sanguin d'hormone anti-müllérienne (AMH) inférieur ou égal à 1,1 ng/ml. Pour chaque cas, deux témoins seront sélectionnés par centre et par classes d'âge de 5 ans parmi les femmes consultant pour infertilité du couple dont le bilan d'infertilité est strictement normal et dont le bilan du partenaire est considéré comme anormal. Les critères d'exclusion seront : un âge supérieur à 40 ans, une endométriose ovarienne, un syndrome des ovaires polykystiques, un antécédent de chirurgie annexielle, de cancer avec chimiothérapie ou radiothérapie, une obésité morbide ( $IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$ ). A l'inclusion, les cas et les témoins renseigneront un auto-questionnaire comportant des informations sur leurs antécédents médicaux, leurs caractéristiques sociodémographiques, leurs consommations de tabac et d'alcool, leurs professions et les produits manipulés au travail. Des prélèvements de sang (en vue du dosage de polluants organiques persistants et des métaux lourds) et d'urine (en vue de dosage de métabolites d'éthers de glycol) seront effectués à l'inclusion. Les expositions professionnelles aux solvants seront définies par des matrices emplois expositions. Le risque de diminution de la réserve ovarienne sera étudié en utilisant des régressions logistiques pour chacune des expositions d'intérêt en ajustant sur des facteurs de confusion potentiels.

Un premier financement 161 700 euros permet la mise en place de l'étude, le recueil des données et d'initier une partie des dosages de polluants organiques persistants. Le financement demandé à l'agence de la biomédecine permettra de finaliser les dosages de polluants organiques persistants. D'autres demandes sont actuellement en cours pour permettre le dosage métaux lourds et des métabolites d'éthers de glycol.

**Roger Léandri:**

## Bisphénol A et activation des récepteurs membranaires aux œstrogènes de l'embryon préimplantatoire de mammifères

Nous avons récemment mise en évidence que certains consommables plastiques utilisés en routine en AMP exposent les ovocytes et embryons humains à du bisphénol A (BPA) à des concentrations au moins dix fois supérieures à celles retrouvées dans le sérum ou le liquide folliculaire humain. En routine, ce contact ne dure que quelques dizaines de secondes mais peut se répéter au cours des manipulations successives des embryons. Les effets d'un tel contact sont absolument inconnus. Le BPA est un xénoestrogène connu pour pouvoir exercer des effets dit non-génomiques rapides et puissants par contact avec les formes membranaires des récepteurs aux estrogènes. Parmi elles, le récepteur aux estrogènes couplé aux protéines G appelé GPER semble, compte tenu des données de la littérature, pouvoir être impliqué au niveau embryonnaire.

Le but de ce projet est de mimer les conditions de laboratoire d'AMP pour exposer des embryons de souris à ce type de matériel et en analyser les conséquences sur le développement embryonnaire (cinétique de développement, taux de blastocystes et qualité des blastocystes, distribution cellulaire entre masse cellulaire interne et trophoctoderme) et sur l'expression génique (analyse transcriptomique) et la méthylation de gènes clés. En parallèle, le travail cherche à démontrer formellement l'implication du BPA dans ces observations et à mettre en évidence l'implication de GPER via l'utilisation d'antagoniste spécifique de GPER.

Ce travail expérimental chez l'animal se base donc sur une observation réalisée dans les pratiques de routines en AMP afin d'en évaluer la sécurité.

**Judith Melki:**

Séquençage de l'exome entier dans les arthrogryposes et les akinésies fœtales à gène non identifié par l'exome ciblé

**Introduction :**

Les arthrogryposes multiples congénitales (AMC) et les akinésies fœtales représentent un groupe hétérogène de maladies fréquentes (incidence : 1 sur 3000 naissances). Dans environ 70% des cas, le diagnostic génétique n'est pas posé. Dans une étude préalable (PHRC2010), le séquençage nouvelle génération exome entier (WES) appliqué à 72 familles puis de l'exome ciblé à l'ensemble des gènes connus ou récemment identifiés (TES, 70 gènes) et appliqué à 93 familles a permis d'identifier la cause génétique dans 52% des cas incluant l'identification de 7 nouveaux gènes. Nous avons réalisé le WES chez 12 patients dont le TES s'était révélé négatif. Cette étude préliminaire a permis d'identifier la cause génétique chez 7 patients : il s'agissait soit de nouveaux gènes (n=2), de gènes connus mais dont les mutations n'avaient pas été rapportées associées à ce phénotype (n=2) ou de gènes non inclus dans le premier panel TES (n=3).

**Objectif :**

Notre projet a pour but d'identifier le/les gènes dont les mutations sont responsables d'AMC ou d'AF chez 38 patients sans cause génétique retrouvée par le TES. Le WES devrait permettre d'identifier de nouveaux gènes ou d'identifier des gènes connus mais dont les mutations n'étaient pas connues pour être responsables d'AMC ou d'AF. Une analyse morphologique approfondie en microscopie électronique à partir de biopsie neuromusculaire sera effectuée en parallèle pour caractériser le phénotype neuromusculaire précis des patients.

**Méthodologie :**

Un total de 38 patients non apparentés et atteints d'AMC ou d'AF non syndromiques seront inclus dans ce projet. Les données cliniques ont été rassemblées et le TES déjà réalisé. Le WES et l'analyse bioinformatique des données seront effectuées. Nous croiserons les données issues du WES des patients afin d'identifier les gènes porteurs de mutations possiblement pathogéniques et partagés par au moins 2 patients de la cohorte présentée (n=38) ainsi que les patients qui ont déjà eu, dans le cadre du projet PHRC, un WES sans gène causal retrouvé (n=27) soit un total de 65 WES. Cette approche sera aidée par l'analyse morphologique du système neuromusculaire qui permettra de définir des sous-groupes de patients à phénotype morphologique similaire. Les variants candidats seront validés par séquençage Sanger et leur ségrégation intrafamiliale établie.

**Conclusions et perspectives :**

Cette étude permettra d'établir la proportion de cas où le WES aura permis d'établir la cause génétique de cette affection et d'analyser les causes d'échec du TES : nouveaux gènes ou gènes de maladies neuromusculaires mais non reconnus pour être responsables d'AMC ou d'AF élargissant le spectre clinique de ces affections ; ou encore une mauvaise couverture de certains exons ou jonctions intron-exon dans les gènes inclus dans le TES. Ces travaux devraient permettre d'améliorer le diagnostic génétique de ces affections par la mise au point d'un nouveau kit TES incluant les nouveaux gènes. Ceci permettra d'améliorer l'information génétique des familles en leur donnant une évaluation correcte du risque de récurrence et les options possibles de tests prénataux (diagnostic anténatal ou préimplantatoire). Ces travaux devraient permettre l'identification de nouveaux gènes point de départ vers la caractérisation de nouvelles protéines essentielles au développement du système neuromusculaire chez l'Homme.

**Jeanne Perrin:**

Impact des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques sur la fécondation in vitro : des cellules parentales à la qualité embryonnaire précoce

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants ubiquitaires persistants désignés par les organismes américains et européens de la protection de l'environnement comme polluants prioritaires à surveiller. Le Benzo[a]pyrène (BaP) est le plus toxique et le plus étudié, classé cancérigène, mutagène et reprotoxique. Les populations sont exposées à des mélanges complexes d'HAP par des voies d'exposition multiples (inhalation, alimentation, contact). Une proportion très importante de la population générale y est exposée. Dans notre population de couples infertiles, nous avons montré que plus de la moitié des hommes y sont exposés (52% par le tabagisme et 28% par leur profession). La question de la transmission à l'embryon des lésions génotoxiques induites par les HAP dans les cellules germinales et de leur impact sur la qualité embryonnaire et l'implantation n'est pas élucidée. A notre connaissance la seule étude s'intéressant à cette question chez l'homme ne s'est attachée qu'à la transmission paternelle.

**Objectifs :**

Nous proposons de déterminer les effets génotoxiques de l'exposition aux HAP sur les gamètes parentaux et la qualité embryonnaire. Les objectifs sont : 1) la caractérisation de l'exposition aux HAP par le biais de questionnaires et de dosage de biomarqueurs d'exposition. 2) l'établissement de la relation entre exposition et lésions génotoxiques induites dans les cellules folliculaires et les spermatozoïdes. 3) l'identification de l'effet de ces lésions sur la qualité embryonnaire et le taux de grossesse évolutives en Fécondation In Vitro (FIV).

**Méthodologie :**

Dans ce but, nous proposons de réaliser une étude pilote, prospective, mono centrée, exposé-non exposé. Les groupes seront définis en fonction du taux urinaire de 1-hydroxypyrene, biomarqueur le plus sensible de l'exposition aux HAP. Un questionnaire standardisé sur l'exposition aux toxiques environnementaux sera rempli par les couples au début de la prise en charge. La quantification des biomarqueurs d'effet des HAP sur les cellules folliculaires n'a encore jamais été réalisée dans l'espèce humaine. Dans notre projet, nous détecterons et quantifierons les adduits Benzo(a)pyrene-diol epoxyde (BPDE) et les dommages à l'ADN dans les cellules folliculaires et les spermatozoïdes. Nous évaluerons les indicateurs biologiques de qualité en FIV (taux de fécondation, de clivage, paramètres de qualité embryonnaire, taux de grossesse clinique).

**Résultats et retombées attendus :**

Notre projet représenterait la première étude à ce jour sur la question de l'effet génotoxique des HAP sur les gamètes, la fécondation, le développement préimplantatoire et les grossesses évolutives. Les biomarqueurs pertinents déterminés grâce à nos résultats pourraient être utilisés pour évaluer les expositions environnementales des couples et la qualité des gamètes avant une tentative de FIV. Les résultats de cette étude devraient permettre de personnaliser la prise en charge des patients et d'évaluer l'efficacité des mesures préventives mise en place durant le parcours d'AMP. Ce projet s'inscrit non seulement dans le cadre des plans nationaux santé environnement mais il répond également aux récentes recommandations de la Fédération Internationale des Gynécologues Obstétriciens (FIGO) concernant la prise en compte de l'environnement pour la santé reproductive.

**Nathalie Rives:**

Impact de la qualité nucléaire des spermatozoïdes murins générés in vitro sur le développement embryonnaire après ICSI

Les cellules germinales souches sont les cibles de thérapeutiques toxiques, comme la chimiothérapie ou la radiothérapie. Leur préservation peut s'effectuer par congélation du tissu testiculaire proposée chez le garçon pré-pubère. Le tissu testiculaire décongelé pourra subir une maturation in vitro afin d'obtenir des spermatozoïdes. La congélation lente et la vitrification du tissu testiculaire pré-pubère de souris ont été développées au sein de notre équipe et des conditions optimales de culture ont été identifiées afin de générer in vitro des spermatozoïdes à partir de ce tissu décongelé. Il apparaît indispensable de vérifier que ces spermatozoïdes obtenus in vitro ont une qualité nucléaire comparable à celle observée in vivo et sont capables, après fécondation in vitro par microinjection, de féconder des ovocytes, d'assurer un développement embryonnaire normal et d'obtenir des nouveaux nés normaux et fertiles à l'âge adulte.

Les objectifs de cette thèse sont d'analyser :

- (i) le taux d'anomalies chromosomiques par FISH, le nombre et la longueur relative des télomères, la fragmentation de l'ADN des noyaux spermatiques, la condensation de l'ADN ;
- (ii) les taux de fécondation, de développement embryonnaire, la qualité des embryons obtenus, le taux d'implantation des embryons, le nombre de nouveaux nés obtenus en ICSI avec le système piezzo par utilisation de spermatozoïdes issus de la maturation in vitro à partir du tissu testiculaire pré-pubère frais ou décongelé. Les souris ainsi obtenues seront évaluées également sur la présence ou non de malformations et leur fertilité. Les résultats seront comparés à ceux obtenus à partir de spermatozoïdes issus d'une spermatogenèse in vivo dans les conditions physiologiques.

Mots clés : Congélation du tissu testiculaire/ ICSI / Noyau spermatique / Spermatogenèse in vitro

**François Vialard:**

Identification et caractérisation des mutations géniques chez des patients présentant une azoospermie par arrêt de maturation

La stérilité est un problème de santé mondial qui reste idiopathique dans un grand nombre de cas. De meilleurs niveaux de connaissances fondamentales sont nécessaires pour améliorer les soins cliniques.

**Objectifs :**

Notre objectif est de réaliser une analyse de l'exome chez des patients azoospermes ayant un phénotype testiculaire caractéristique, celui de l'arrêt de la spermatogénèse avec blocage au stade spermatocyte ou spermatide. De tels blocages sont supposés comme ayant une forte composante génétique. L'objectif à terme est d'améliorer notre connaissance des bases génétiques du mécanisme de la gamétogénèse et d'identifier une thérapie qui permettrait de contourner l'arrêt de maturation.

**Résultats attendus :**

Notre stratégie consiste à cribler une famille consanguine et une cohorte de patients classés en fonction de leurs caractéristiques cliniques, biologiques et histologiques comme ayant un arrêt de maturation. Le choix d'une famille consanguine avec 3 frères ayant le même phénotype testiculaire renforce de façon importante nos chances d'identifier une mutation sur un gène de la spermatogénèse. L'analyse en parallèle d'autres patients permettra d'obtenir de façon rapide, soit la confirmation de l'existence de mutation récurrente sur le même gène, soit l'identification d'autres anomalies touchant d'autres gènes.

**Méthodologie :**

Pour la mise en place de ce projet, différentes stratégies seront utilisées. L'analyse de l'exome chez les patients afin d'identifier des variants génomiques. Pour confirmer l'impact des variants identifiés sur la spermatogénèse, nous allons également étudier une cohorte de sujets contrôles et une cohorte de patients atteints de diverses atteintes spermatiques les gènes identifiés afin de savoir s'il existe d'autres variants susceptibles de modifier la spermatogénèse. Enfin, une analyse immunohistochimique sera réalisée sur les prélèvements à partir de tissus obtenus au décours de la biopsie testiculaire réalisée dans le cadre de la prise en charge de leur infertilité.

**Stéphane Viville:**

Confirmation et établissement de la prévalence des mutations dans les gènes impliqués dans des infertilités humaines non-syndromique

L'infertilité est un problème mondial de santé qui affecte de façon égale les hommes et les femmes. Malgré près de quatre décennies de pratique de la FIV, un nombre considérable de cas (25 à 30%) restent idiopathiques chez les couples infertiles. La plupart des traitements proposés sont souvent empiriques et peu a été réalisé afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la fertilité humaine. On estime qu'environ 50% des cas idiopathiques pourrait être expliqué par un défaut génétique.

La recherche est passée de simples études de mutation génique à l'analyse pan génomique. Au cours de la dernière décennie, suite à l'étude de cas familiaux d'infertilité ou de groupes de patients infertiles, la liste des gènes humains impliqués dans l'infertilité a cru très rapidement. Il y a, actuellement, 16 gènes pour lesquels des données sont suffisantes pour les considérer comme responsable d'un phénotype d'infertilité non syndromique chez l'homme lorsqu'ils sont mutés. Notre objectif est de réaliser une recherche de mutations pour ces 16 gènes dans une cohorte de 125 patients français avec un phénotype d'infertilité bien défini et de déterminer la prévalence de chacune des mutations dans cette population. Tous les patients seront diagnostiqués par un bilan complet d'infertilité et un échantillon de salive sera recueilli après qu'un formulaire de consentement ait été signé. L'ADN extrait sera analysé par séquençage ciblé en utilisant la technologie Ion AmpliSeq TM. Les résultats seront confirmés par séquençage de Sanger et des patients fertiles seront analysés en tant que groupe contrôle.

La technologie Ion AmpliSeq TM offre une construction simple et rapide de bibliothèque pour un séquençage ciblé de groupes de gènes spécifiques et / ou régions génomiques. Elle exige aussi peu que 10 ng d'ADN, les variants peuvent être identifiés en un seul jour à l'aide de la technologie Ion-AmpliSeq TM. Le test de diagnostic mis au point est basé sur l'expertise du laboratoire de diagnostic génétique des HUS. Elle comporte le séquençage de l'ASN ciblée des loci d'intérêts en utilisant la technologie Ion Torrent, suivie d'une analyse bio-informatique pour identifier les modifications d'intérêts.

Cette étude mettra en évidence les mutations génétiques qui ont un impact significatif sur des phénotypes d'infertilité spécifiques sur une cohorte restreinte de patients, ces résultats conduiront par la suite à un autre projet avec un groupe plus important de patients.

La valeur ajoutée du projet proposé repose dans la collaboration étroite entre la recherche fondamentale et les partenaires cliniques. Cette coopération permettra un continuum direct entre l'obtention des résultats et l'application clinique, permettant ainsi la mise en place efficace de nouveaux protocoles cliniques pour traiter l'infertilité humaine, ce qui fait partie des intérêts de notre laboratoire.

**Jean-Philippe Wolf:**

Influence du plastique des boîtes pétri sur la régulation de l'expression du génome au cours de l'AMP, chez la souris

L'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) permet à des couples infertiles d'avoir des enfants. Parmi ceux-ci, on observe une légère augmentation du pourcentage des anomalies majeures chez les nouveaux-nés et une augmentation de la fréquence de maladies liées à des anomalies épigénétiques telles les syndromes de Beckwith-Wiedemann et de Silver-Russel. En outre les enfants issus d'AMP ont un risque accru 2.6 fois de petits poids de naissance à terme identique. Pour expliquer l'ensemble de ces anomalies, sont incriminés l'infertilité du couple, la stimulation ovarienne, la fécondation in vitro mais aucun élément décisif de causalité n'a été mis en évidence.

Dans la pratique, les gamètes et les embryons sont maintenus in vitro dans des boîtes de pétri en plastique, jusqu'à 5 jours pour les cultures prolongées. Les perturbations épigénétiques causées par des composés entrant dans la fabrication des plastiques sont connues dans d'autres contextes, et ont entraîné l'interdiction de l'usage de certains d'entre eux. Il se trouve que les consommables utilisés en AMP n'ont été testés dans le meilleurs des cas que sur des tests de survie des spermatozoïdes ou de développement de blastocystes de souris. A aucun moment d'éventuelles perturbations épigénétiques susceptibles d'être induites n'ont été évaluées alors qu'elles représentent un facteur de risque majeur. Le principe de précaution implique donc que ces effets potentiels soient recherchés. Nous avons mis en évidence chez la souris la perturbation de l'expression des gènes placentaires soumis à empreinte sur des embryons obtenus in vitro comparés à d'autres qui avait été conçus in vivo (Fauque et al. 2010).

Nous proposons de mener une étude chez la souris pour (1) identifier d'éventuelles dérégulation épigénétiques et (2) comparer l'expression de gènes dans deux organes cibles, le foie et le placenta, en particulier les gènes soumis à empreinte parentale, qui sont fondamentaux dans la régulation de la fonction d'échange de l'interface foeto-maternelle, en comparant des embryons conçus in vivo et qui seront incubés soit dans des boîtes en plastiques habituelles, soit dans des boîtes en verre et avec des embryons conçus et gardés in utéro. Les boîtes en verre sont choisies pour les contrôles car dans un rapport de l'Inserm et de l'Agence de la Biomédecine sur les perturbateurs endocriniens le verre n'est cité aucune fois contrairement au plastique dont le rapport est l'objet.

Si des différences d'expression entre les deux supports sont retrouvées, cela conduira ultérieurement à reproduire l'étude sur des embryons humains donnés pour la recherche.

L'impact d'une telle étude apparaît essentiel. Elle pourrait mettre en évidence des anomalies liées aux consommables et amener à changer ces derniers pour des composés moins, voire non toxiques