

**Résumés des projets de recherche financés dans le cadre de l'appel d'offres  
2015 « AMP, DPN, DPI »**

<b>Chercheur</b>	<b>Sujet de recherche</b>	<b>Subvention allouée</b>
<b>BEAUQUIER-MACOTTA Bérengère</b>	Le couple parental et conjugal à l'épreuve de l'insémination artificielle avec donneur (IAD) : coparentage et incidences sur le développement de l'enfant	<b>26 500 €</b>
<b>JEANPIERRE Marc</b>	Optimisation du diagnostic moléculaire de la dystrophie facio-scapulo-humérale par une approche originale de NGS	<b>28 000 €</b>
<b>LE RAY Camille</b>	Fécondation in vitro et risque de morbidité maternelle sévère	<b>26 500 €</b>
<b>LEGUERN Eric</b>	Etude des mosaïques parentales dans le syndrome de Dravet	<b>26 500 €</b>
<b>LIVERA Gabriel MARTINI Emmanuelle</b>	Effet du BPA sur la stabilité génomique de l'ovocyte humain	<b>26 500 €</b>
<b>MARTIAL Agnès</b>	Infertilité féminine liée à l'âge et autoconservation sociétale des ovocytes : étude sociologique	<b>16 500 €</b>
<b>MAUREL Marie-Christine</b>	Etude de la réponse immunitaire aux gonadotrophines exogènes chez des patients traités en FIV : influence du polymorphisme du récepteur à la FSH	<b>16 500 €</b>
<b>MELKI Judith</b>	Identification des bases génétiques des malformations anévrysmales de la veine de Galien	<b>26 500 €</b>
<b>MITCHELL Valérie</b>	AKAP4 et hexokinase1 : vers de nouveaux marqueurs diagnostiques de la qualité des spermatozoïdes humains en AMP	<b>21 000 €</b>
<b>MOREL Frédéric</b>	Apports du tri cellulaire de spermatozoïdes chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure	<b>26 500 €</b>
<b>MOUTOU Céline</b>	Etude de faisabilité du DPI pour les maladies monogéniques par séquençage haut débit	<b>21 000 €</b>
<b>ROUX Christophe</b>	Amélioration des techniques de qualification fonctionnelle et sécuritaire du tissu ovarien	<b>26 500 €</b>
<b>SERMET-GAUDELUS Isabelle</b>	Exploration des nouveaux-nés présentant un diagnostic non conclu au dépistage néonatal de la mucoviscidose en vue du conseil génétique	<b>24 500 €</b>
<b>STEFFANN Julie</b>	Faisabilité du diagnostic prénatal de maladies génétiques par séquençage haut débit de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel	<b>30 000 €</b>
<b>UZBEKOVA Svetlana</b>	BestOv : identification de marqueurs de la qualité de l'ovocyte dans les cellules de cumulus par la spectrométrie de masse	<b>30 500 €</b>
<b>VINCENT Marie-Claire</b>	Evaluation du dosage relatif de mutation dans le diagnostic prénatal non invasif de la mucoviscidose par séquençage haut débit sur une plateforme MiSeq (Illumina)	<b>26 500 €</b>

**BEAUQUIER-MACOTTA Bérengère** : Le couple parental et conjugal à l'épreuve de l'insémination artificielle avec donneur (IAD) : coparentage et incidences sur le développement de l'enfant

**Introduction** : Le coparentage, défini comme le soutien que s'apportent mutuellement la mère et le père dans leurs rôles de parents, est au cœur de la transition à la parentalité. C'est un facteur qui peut expliquer les difficultés rencontrées par les couples ayant conçu par IAD.

**Hypothèse principale :** La qualité du coparentage pourrait être altérée chez les couples ayant conçu un enfant par insémination avec les spermatozoïdes d'un tiers donneur par rapport aux couples dont l'enfant n'est pas issu d'un don de gamète.

**Objectifs :**

**Objectif principal:** Comparer la qualité du coparentage chez les couples, du huitième mois de grossesse aux 18 mois de leur premier enfant conçu :

- par IAD
- par IAC (Insémination Intra-Utérine avec sperme du conjoint)
- naturellement

**Objectifs secondaires:**

1. Déterminer les facteurs pouvant influencer la qualité du coparentage :
  - Alliance ou rivalité conjugale et parentale.
  - Investissement paternel et « paternalisation » du père par la mère.
  - Place du donneur dans le discours et les représentations.
  - Dimension du secret autour de la conception.
  - Facteurs psychologiques et histoire de la stérilité
  - Caractéristiques sociodémographiques
  - Perception du tempérament de l'enfant
2. Evaluer l'impact du coparentage sur le développement psycho-affectif de l'enfant.

**Méthodologie :** Étude comparative longitudinale prospective monocentrique sur 2 ans.  
3 groupes de 55 sujets par groupe dont la 1ère grossesse en cours est obtenue:

- par IAD (avec sperme de donneur)
- par IAC (témoin insémination intra-utérine avec sperme du conjoint)
- Témoin conception naturelle (grossesse obtenue spontanément)

Analyse quantitative sur la base des seuls auto-questionnaires : 45 couples par groupe

Analyse qualitative et quantitative sur la base des auto-questionnaires et des rencontres avec l'équipe : entretiens et passage d'un Jeu triadique de Lausanne (LTP) pour 10 couples par groupe

**Critères d'évaluation**

**- Critère d'évaluation principal**

Qualité du coparentage : Echelles Mac Hale et Abidin d'alliance parentale

**- Critères d'évaluations secondaires**

1. Facteurs influençant le coparentage :

a) Alliance ou rivalité conjugale et parentale - Investissement paternel et processus de « paternalisation » du père par la mère :

Analyse qualitative : Entretiens et LTP: Family Alliance Assessment Scale FAAS

Analyse quantitative : -Relations intra-conjugales : Dyadic Adjustment Scale DAS

Ajustement parental : Parenting Stress Index PSI

b) Place faite au donneur dans le discours et les représentations.

Dimension du secret autour de la conception.

Analyse qualitative : Entretiens

c) Facteurs psychologiques et histoire de la stérilité :

Analyse qualitative : Entretiens

Analyse quantitative : Anxiété : State Trait Anxiety Inventory STAI

Dépressivité : Edinburgh Postnatal Dépression Scale EPDS

- Modalités de prise en charge si insémination
- Caractéristiques socio-démographiques
- Sexe de l'enfant

2. Impact du coparentage sur le développement de l'enfant :

Analyse qualitative : Entretiens et LTP (FAAS)

Echelle de développement Brunet-Lézine

Analyse quantitative :

-Perception du tempérament de l'enfant par les parents: l'Early et Revised Infant Temperament EITQ et R-ITQ

Développement moteur et social EDMS

**Résultats attendus :** Le coparentage influence le développement psychoaffectif de l'enfant. Si une altération du coparentage ainsi que les facteurs à l'origine de cette altération étaient identifiés, cela permettrait d'ajuster la prise en charge psychologique des couples effectuant une demande d'IAD. Un accompagnement psychologique de l'enfant pourrait également être proposé.

**JEANPIERRE Marc :** Optimisation du diagnostic moléculaire de la dystrophie facio-scapulo-humérale par une approche originale de NGS

La dystrophie facio-scapulo-humérale (FSHD) est une myopathie héréditaire transmise sur un mode autosomique dominant avec une prévalence estimée à 1/25 000 (ORPHA269). La pathologie moléculaire est restée longtemps mystérieuse et ce n'est que très récemment que le groupe de Sylvère Van Der Maarel a élucidé les mécanismes moléculaires des FSHD de type 1 et 2 qui ont en commun l'expression de la protéine DUX4 à partir des unités répétées D4Z4 portées par l'extrémité de certains chromosomes 4 dits « permissifs ». La détermination des haplotypes du chromosome 4 et l'identification de ceux dits permissifs est devenu un élément critique du diagnostic moléculaire qui a été jusqu'à présent sous-évalué, en particulier en raison des difficultés d'analyse de cette région du chromosome 4 qui est répétée, riche en GC et présente 98% de similitude avec l'extrémité du chromosome 10. D'après notre expérience personnelle (plus de 3000 familles étudiées) une proportion significative d'allèles sont atypiques, allèles hybrides 4/10 par exemple.

Notre projet consiste à reconstituer qualitativement et quantitativement les haplotypes en distinguant par analyse bioinformatique ceux du chromosome 4 et ceux du chromosome 10. Ceci sera possible via une approche NGS fondée sur un Ion Ampliseq Custom Panel spécifique de 400pb et utilisant une enzyme de séquençage de type Hi-Q. La preuve de concept de cette approche a été déjà faite à l'aide d'un premier design sur une centaine de patients atteints de FSHD de type 1 et 2. L'objectif principal de la demande consiste à améliorer le design du panel et à valider cette approche sur une série de 100 cas index FSHD1 et 2 dont les haplotypes ont été déterminés par des approches conventionnelles. L'identification des haplotypes par NGS sera validée par l'étude de leur ségrégation sur une série de 50 formes familiales. L'objectif secondaire est de déterminer l'implication des haplotypes dans le phénotype des patients FSHD1 et 2, la notion de permissivité pouvant ne pas être limitée à la présence d'un signal de polyadénylation ATTTAA.

Les retombées attendues sont de démontrer la possibilité d'identifier de façon fiable et quantitative les haplotypes permissifs du chromosome 4 et d'optimiser la stratégie de diagnostic moléculaire de la FSHD, en particulier en matière de diagnostic prénatal.

**LE RAY Camille :** Fécondation in vitro et risque de morbidité maternelle sévère

**Objectifs :** Les objectifs de ce projet sont 1) d'étudier l'association entre la fécondation in vitro (FIV autologue et don d'ovocyte) et le risque de morbidité maternelle sévère (MMS), en population, globalement et par grande cause de morbidité, 2) Evaluer le rôle des grossesses multiples dans l'association entre FIV et risque de MMS.

**Méthodes :** La population source est celle de l'étude EPIMOMS (EPIdémologie de la MORbidité Maternelle Sévère), étude prospective en population conduite dans 6 régions en France pendant 1 an (2012-2013). On effectuera une étude cas témoins au sein de cette cohorte. Les cas seront les femmes ayant eu une MMS selon la définition d'EPIMOMS (N= 2726) et les témoins seront les femmes indemnes de MMS de l'échantillon représentatif (N= 3649).

Les variables caractérisant l'exposition d'intérêt seront la FIV autologue et le don d'ovocyte.

Les autres variables considérées dans l'analyse comme co-variables d'ajustement seront les caractéristiques socio-démographiques, les antécédents médicaux et obstétricaux, les caractéristiques du déroulement de la grossesse et de l'accouchement. L'association entre FIV et MMS sera testée et quantifiée d'abord par une analyse univariée, puis par une analyse multivariée à l'aide de modèles de régression logistique permettant un ajustement sur les facteurs de confusion potentiels afin d'étudier si la FIV et en particulier la FIV avec don d'ovocyte est un facteur de risque indépendant de MMS. La grossesse multiple fera l'objet d'une considération spécifique, car elle peut agir comme facteur de confusion mais aussi comme facteur intermédiaire dans la relation entre FIV et MMS. L'association sera testée pour la MMS globale, et pour ses différentes composantes, notamment hypertensives, hémorragiques, thromboemboliques.

**Résultats attendus :** Si l'existence d'un sur-risque de MMS est étayé, et selon la nature des associations mises en évidence, ces résultats auront des implications pour la prévention globale du

risque de MMS dans un contexte de FIV : 1/ Au temps pré-conceptionnel : information des couples notamment en cas de projet de FIV avec don d'ovocyte, évaluation du risque maternel, 2/ Au temps péri-conceptionnel spécifique à la FIV : nombre d'embryon transféré, orientation précoce du suivi obstétrical, et enfin 3/ En cours de grossesse : optimisation de la surveillance obstétricale.

#### **LEGUERN Eric** : Etude des mosaïques parentales dans le syndrome de Dravet

Le syndrome de Dravet, ou encéphalopathie myoclonique sévère du nourrisson, est une pathologie développementale caractérisée par une épilepsie pharmaco-résistante, sensible à la fièvre, débutant dans la première année de vie, d'évolution sévère. Les principaux gènes responsables de cette pathologie sont *SCN1A* et *PCDH19*, tous deux étudiés dans notre laboratoire depuis respectivement 2003 et 2009. Dans la plupart des cas, les patients atteints sont des cas sporadiques et les mutations identifiées dans ces gènes surviennent *de novo*, i.e. sont présentes chez l'enfant atteint et absentes chez les parents. En raison de la sévérité de cette pathologie et de la possibilité d'une mosaïque germinale, les couples demandent souvent la réalisation d'un diagnostic prénatal (DPN) pour les grossesses ultérieures. La fréquence des mosaïques parentales n'a jamais été évaluée dans une grande cohorte ; en effet, les précédents travaux de notre équipe ont montré que des mosaïques parentales étaient visibles lors du séquençage Sanger dans 7% des cas, cependant, en cas de mosaïque faible, celle-ci n'est pas visible par la technique de Sanger, nous sous-estimons donc probablement la fréquence des mosaïques parentales.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la fréquence des mosaïques parentales par séquençage profond à partir d'une grande cohorte de patients porteurs de mutations de *SCN1A* ou *PCDH19* considérées jusqu'à présent comme *de novo*.

Pour répondre à cet objectif, nous étudierons par séquençage de nouvelle génération (GS Junior - Roche) les ADN des 310 enfants porteurs de mutations *de novo* de *SCN1A* et des 27 enfants porteurs de mutations *de novo* de *PCDH19* ainsi que ceux de leurs parents sains identifiées dans notre laboratoire. La profondeur de lecture attendue (2000 lectures) permettra de mettre en évidence des mosaïques très faibles, impossible à détecter par séquençage Sanger. Les mosaïques faibles (<2%) seront confirmées par un séquençage plus profond (>5000 lectures) et par PCR quantitative allèle-spécifique. Lorsque des mosaïques seront identifiées dans le sang, nous proposerons d'évaluer le taux de celles-ci dans d'autres tissus, à partir de prélèvements de salive, d'urine et/ou de peau.

La réalisation de ce projet permettra d'évaluer précisément la fréquence et le taux de mosaïque sanguine chez les parents d'enfants ayant un syndrome de Dravet lié à des mutations a priori *de novo* de *SCN1A* ou *PCDH19*. Il se base sur l'expérience du laboratoire dans le diagnostic moléculaire du syndrome de Dravet par le séquençage Sanger, et plus récemment, par le séquençage de nouvelle génération. L'ensemble des ADN nécessaire à cette étude est déjà disponible, et nous bénéficierons de l'équipement du laboratoire de diagnostic ainsi que de la plateforme de génotypage et séquençage de l'ICM pour la réalisation des expériences. Les résultats attendus comportent un bénéfice direct pour les familles en termes de conseil génétique puisqu'ils permettront de mieux discriminer les parents porteurs d'une mosaïque sanguine, même faible, donc à risque d'être porteurs d'une mosaïque germinale et donc d'avoir un deuxième enfant atteint.

#### **LIVERA Gabriel / MARTINI Emmanuelle** : Effet du BPA sur la stabilité génomique de l'ovocyte humain

Au cours des dernières décennies plusieurs pathologies liées à la fonction de reproduction ont vu leur incidence augmenter dans l'espèce humaine. Une fenêtre d'exposition particulièrement sensible aux perturbateurs endocriniens causant ces altérations se situe pendant le développement des gonades fœtales. Ainsi, nos travaux ont montré que de nombreuses substances chimiques peuvent altérer le développement des gonades murines ou humaines. En particulier le BPA, une des substances reprotoxiques à activité endocrine, a été largement incriminé dans des altérations de fonctions de reproduction. Chez la femelle, le BPA perturbe le développement ovarien de nombreuses espèces avec une altération de la folliculogenèse et des premières étapes de la méiose pouvant aboutir à des aneuploïdies. La mesure et la prise en compte de ce risque est critique car certaines pathologies liées au développement de la gonade peuvent ne se révéler que plusieurs décennies après une exposition *in utero*. Afin de mieux comprendre l'effet du BPA sur l'intégrité ovarienne, des études menées chez plusieurs organismes pendant la vie fœtale ont révélé qu'une exposition au BPA peut perturber la progression normale de la méiose. Cependant les études menées jusqu'à présent ne permettent pas

d'estimer le réel potentiel toxique du BPA dans la méiose femelle humaine. Au cours de ce projet nous proposons de déterminer les effets du BPA sur le développement de l'ovaire humain en nous axant plus particulièrement sur les effets que peut avoir ce perturbateur sur l'intégrité des chromosomes méiotiques essentielle au maintien du génome et à la qualité des gamètes. Grâce à la mise en place d'un modèle original de Xénogreffe, basé sur l'implantation d'ovaires fœtaux humains dans une souris immunodéficiente, nous pourrions suivre pour la première fois l'effet d'une exposition contrôlée du BPA pendant une période essentielle à l'intégrité des gamètes allant de l'entrée en méiose à la formation du follicule. L'utilisation de marqueurs spécifiques des différentes étapes de la progression méiotique nous permettra de caractériser l'impact du BPA sur l'intégrité des chromosomes et le risque de survenue d'aneuploïdie ovocytaire. L'étude détaillée des effets du BPA lors du développement de l'ovaire humain, qui diffère en de nombreux points de celui des organismes modèles, doit permettre d'infirmer ou de confirmer le risque d'une altération du processus méiotique qui conditionne en partie la qualité de l'ovocyte adulte.

**MARTIAL Agnès** : Infertilité féminine liée à l'âge et autoconservation sociétale des ovocytes : étude sociologique

**Objectifs** : Construire une analyse sociologique : 1) du phénomène social qu'est l'augmentation des demandes de prise en charge en AMP pour infertilité féminine liée à l'âge, du fait d'une diminution physiologique de la réserve ovarienne ; 2) du débat concernant la possibilité ou non pour les jeunes femmes d'autoconserver leurs ovocytes afin de pouvoir reculer l'âge de leur maternité. Notre objectif est d'étudier les représentations sociales de ces deux problématiques, ainsi que les interrogations, attentes, préoccupations du corps médical et des femmes.

**Résultats attendus** :

- 1) Rendre compte des problèmes concrets que pose l'infertilité féminine liée à l'âge dans la pratique des médecins. Etudier leurs arguments « pour et contre » concernant l'autoconservation sociétale des ovocytes et mesurer ainsi les enjeux d'une telle possibilité.
- 2) Réaliser une typologie approfondie des parcours biographiques des femmes de plus de 40 ans en parcours de FIV ; rendre compte de leurs représentations de l'âge et du temps ; expliciter comment elles se représentent une maternité obtenue par FIV à la frontière du biologiquement possible et socialement permis. L'étude de leurs arguments concernant l'autoconservation sociétale des ovocytes permettra là encore de mesurer les enjeux d'une telle possibilité, mais cette fois-ci du point de vue des patientes.
- 3) Evaluer de façon quantitative les connaissances de jeunes étudiantes en Sciences Sociales dans le domaine de la fertilité féminine et étudier la décision qu'elles penseraient prendre si elles avaient la possibilité d'autoconserver leurs ovocytes pour les utiliser ultérieurement.

**Méthodologie** :

- 1<sup>ère</sup> partie du projet :

Des interrogatoires semi-dirigés seront menés auprès des médecins de la reproduction et auprès de patientes infertiles en parcours de FIV âgées de plus de 40 ans.

Les entretiens auprès des médecins comporteront un volet sur les prises en charge de FIV des femmes des plus de 40 ans. Ils seront interrogés sur les profils de ces patientes et sur les réponses que la médecine peut leur apporter. Le second volet portera sur l'autoconservation sociétale des ovocytes.

Les entretiens auprès des patientes comporteront quatre parties : 1) leur histoire personnelle et conjugale, 2) leur parcours d'infertilité, 3) le vécu de leur âge, 4) des questions d'opinions sur l'autoconservation sociétale des ovocytes.

- 2<sup>ème</sup> partie du projet :

Une enquête par autoquestionnaire sera réalisée auprès d'étudiantes en sociologie. Le questionnaire sera composé de trois parties : 1) des questions destinées à recueillir des informations sur la population étudiée ; 2) des questions visant à tester les connaissances concernant la fertilité féminine et la réserve ovarienne ; 3) des questions visant à connaître les décisions qu'elles penseraient prendre si elles avaient la possibilité d'autoconserver leurs ovocytes pour les utiliser ultérieurement.

**MAUREL Marie-Christine** : Etude de la réponse immunitaire aux gonadotrophines exogènes chez des patients traités en FIV : influence du polymorphisme du récepteur à la FSH

Dans les sociétés industrialisées les problèmes de fertilité humaine sont de plus en plus fréquents. Environ 1 couple sur 7 consulte pour infertilité. Pour pallier à ce problème de santé publique, des traitements hormonaux sont utilisés dans le cadre de la procréation médicalement assistée (PMA). En 2008, plus de 530 000 traitements ont ainsi été administrés en Europe. Ils représentent un marché mondial considérable. Cependant, ces traitements ont une efficacité variable en fonction des patientes : certaines répondent très fortement même à des doses faibles de FSH (hyperstimulation ovarienne) alors que d'autres sont moins sensibles et des doses élevées d'hormones doivent être injectées à ces patientes.

Parmi les facteurs pouvant influencer la réponse des patientes aux traitements de FIV figure le polymorphisme 680 du récepteur FSH (R-FSH) : les patientes porteuses de l'allèle S680 sont moins sensibles à la FSH et nécessitent des doses plus élevées lors de cycle d'AMP. Chez les animaux, l'autre facteur majeur de la réponse in vivo aux hormones est la réponse immunitaire développée vis-à-vis des hormones exogènes injectées. Ces anticorps peuvent être inhibiteurs ou facilitateurs de l'action de l'hormone. Le but du projet que nous présentons est de rechercher les anticorps anti-FSH chez les patientes prises en charge au CECOS de Tours sur la période janvier 2015- janvier 2017 et de le corréliser avec le polymorphisme du R-FSH. Les anticorps des patientes présentant une réponse immunitaire seront purifiés et serviront à stimuler les cellules de la granulosa issues de la ponction ovarienne de chacune des patientes afin de voir si les anticorps sont neutres, inhibiteurs ou au contraire facilitateurs. Cette étude permettra de mettre en évidence un nouveau facteur à prendre en compte chez les patientes pour ajuster les doses de FSH à utiliser en PMA.

**MELKI Judith** : Identification des bases génétiques des malformations anévrysmales de la veine de Galien

**Introduction** : les shunts vasculaires cérébraux observés chez l'enfant peuvent être divisés en malformation anévrysmale de la veine de Galien (MAVG), les malformations artérioveineuses piales et les malformations des sinus durs. Les MAVG sont les malformations vasculaires cérébrales les plus fréquemment observées chez le nouveau-né et le nourrisson. La classification de Lasjaunias distingue deux groupes de MAVG : le type I ou choroidien et le type II ou mural. Les principaux symptômes associés à cette malformation sont une insuffisance cardiaque à haut débit en période néonatale, une hydrocéphalie survenant en général dans les mois suivants la naissance, ou un retard de développement psychomoteur. Ces malformations peuvent être diagnostiquées en période anténatale par échographie et IRM. L'embolisation endovasculaire transartérielle, en période néonatale en cas d'insuffisance cardiaque non contrôlée, ou vers l'âge de 4-5 mois en l'absence de symptômes décompensés est le traitement de choix. Il s'agit d'une affection sporadique sans cause génétique identifiée à ce jour quel que soit le type de MAVG.

**Objectif** : Notre projet de recherche a pour objectif l'identification des bases génétiques des MAVG de type I et II. Ce projet bénéficie du recrutement exceptionnel du Centre de Référence des Pathologies Neurovasculaires Malformatives (Dr G Saliou, Dr A Ozanne, Hôpital Bicêtre). Les MAVG sont dans la majorité des cas sporadiques suggérant la survenue de mutation dominante *de novo*. Néanmoins, nous avons identifié quelques familles avec deux sujets atteints et des patients nés de parents consanguins pouvant aussi évoquer un mode de transmission autosomique récessif. A ce jour un total de 15 patients porteurs de MAVG a été inclus dans cette étude génétique. Notre objectif est d'inclure au moins 10 patients de chaque type (I et II).

**Méthodologie** : Deux approches seront entreprises en parallèle : Une cartographie physique haute résolution des altérations génomiques (CNV, résolution 25kb) et le séquençage de l'exome entier. Nous croiserons les données filtrées issues du séquençage de l'exome entier et de la cartographie des CNV non répertoriés des patients afin d'identifier les gènes partagés par au moins 3 patients de la cohorte. Le type de MAVG (type I et II) sera pris en compte dans l'analyse des données dans l'hypothèse d'une possible hétérogénéité génétique. Les variants candidats validés seront testés sur une plus grande cohorte de patients pour évaluer leur prévalence (n=40). L'identification de mutations du même gène chez plusieurs patients permettra de confirmer l'implication de ce nouveau gène.

**Conclusions et perspectives** : La classification de Lasjaunias a permis la distinction des MAVG de type I et II. L'identification des bases génétiques des MAVG permettra de déterminer si les types I et II sont alléliques ou non. De plus, le pronostic de ces 2 groupes apparaît différent. Si ces deux groupes sont le fait de mutation de gènes différents, préciser la cause génétique devrait permettre d'optimiser la prise en charge des patients et proposer une information génétique éclairée aux familles. Si la fonction du gène n'est pas connue, une recherche physiopathologique pourra alors être entreprise

pour élucider le rôle de la protéine codée par ce gène dans le développement et/ou la différenciation du réseau vasculaire cérébral.

**MITCHELL Valérie** : AKAP4 et hexokinase1 : vers de nouveaux marqueurs diagnostiques de la qualité des spermatozoïdes humains en AMP

**Objectifs** : Notre projet propose d'évaluer deux nouveaux biomarqueurs protéomiques identifiés de la qualité spermatique chez des partenaires masculins de couples inscrits dans le parcours d'AMP de manière systématique au spermogramme-spermocytogramme. Une première étape consistera à établir une relation entre le profil protéomique des marqueurs du sperme et les paramètres spermatiques ; l'étape suivante consistera à associer les données précédemment obtenues avec l'état de succès de la fécondation *in vitro* afin de valider l'intérêt de ces marqueurs sur l'AMP.

**Contexte** : Nos travaux préliminaires, à partir de l'analyse du protéome global du spermatozoïde humain de plusieurs dizaines d'éjaculats d'hommes, ont permis d'identifier 2 marqueurs : l'AKAP4 et l'hexokinase1 dont l'intégrité est corrélée à la mobilité spermatique. Paramètre de fécondance, la mobilité est un critère essentiel dans l'arbre décisionnel d'orientation de la technique d'AMP. Nos travaux et leurs applications ont fait l'objet d'un dépôt de brevet à l'international.

**Résultats attendus** : Nous espérons apporter un test innovant de la qualité du sperme dans la prise en charge de l'infertilité et ainsi améliorer l'offre de soins apportée aux couples en AMP. Cette étude nous permettra d'avoir une meilleure analyse du potentiel de nos 2 biomarqueurs de la qualité du sperme dans le cadre de l'AMP.

Nos biomarqueurs pourront à terme être des outils précieux d'aide à la décision dans le parcours de soins de l'AMP. Ils devraient permettre de mieux appréhender l'infertilité idiopathique et d'augmenter le taux de succès.

**Méthodologie** : Nous réaliserons une étude prospective, monocentrique, de soins courants, sur résidus de soins du sperme collecté au moment du spermogramme. Nous prévoyons d'enrichir l'étude du protéome global du spermatozoïde humain et du profil protéomique de l'AKAP4 et de l'hexokinase1 sur une série de 10 donneurs fertiles, 50 patients à sperme normal et 50 patients à paramètres de sperme altérés, échantillons suffisants pour observer des différences significatives compte-tenu des analyses préliminaires. Nous étudierons l'impact de ces biomarqueurs sur les résultats en AMP : taux de fécondation, d'implantation, qualité embryonnaire et issues de grossesses.

**Retombées potentielles** : L'utilisation de ces biomarqueurs dans cette recherche translationnelle pourrait permettre :

- 1) d'enrichir le spermogramme-spermocytogramme de nouveaux paramètres protéomiques diagnostiques ;
- 2) d'aider au choix d'orientation des techniques d'AMP ;
- 4) d'améliorer les résultats en AMP.

Nos biomarqueurs permettront pour la première fois de proposer aux praticiens d'établir un diagnostic de la qualité des spermatozoïdes humains, conjointement au spermogramme et sur la base d'une analyse simple réalisable dans l'ensemble des centres de procréation en France par son format simple et non invasif. Nos biomarqueurs seront des outils précieux 1) comme indicateur de l'infertilité masculine idiopathique, 2) pour orienter le parcours de prise en charge des couples, et notamment pour la femme qui s'engage dans le parcours thérapeutique lourd psychologiquement, médicalement et économiquement de l'AMP, 3) pour l'amélioration de l'offre de soin vers une médecine personnalisée, et également 4) pour l'évaluation de la qualité du sperme avant et après traitement stérilisant

**MOREL Frédéric** : Apports du tri cellulaire de spermatozoïdes chez des hommes porteurs d'une anomalie chromosomique de structure

### **Objectifs**

Dans ce projet, nous séparerons des spermatozoïdes d'hommes porteurs d'un remaniement chromosomique en deux populations annexine V+ et annexine V- par tri cellulaire à l'aide de microbilles magnétiques conjuguées à l'annexine V.

Nous étudierons la fragmentation de l'ADN et la ségrégation méiotique avec des sondes spécifiques chevauchant les points de cassure du réarrangement sur éjaculat total et sur spermatozoïdes sélectionnés, chez un même patient. Ces évaluations permettront de voir s'il existe des variations de la fréquence des spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés et / ou fragmentés.

A notre connaissance, aucune étude n'a comparé les taux de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés des deux populations annexine V+ et annexine V- à celui observé dans l'éjaculat total. De plus, ce projet novateur permettra de déterminer la ou les origine(s) de la fragmentation chez ces hommes porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle.

### **Résultats attendus**

Dans de précédents travaux, nous avons émis l'hypothèse qu'une apoptose testiculaire initiée et avortée pourrait expliquer la présence de spermatozoïdes vivants à l'ADN fragmenté et chromosomiquement déséquilibrés dans l'éjaculat de ces hommes porteurs d'un remaniement chromosomique (Perrin et coll. 2011 ; Perrin et coll. 2013).

Par conséquent, lors du tri cellulaire à l'aide de microbilles magnétiques conjuguées à l'annexine V, si réellement les spermatozoïdes vivants à l'ADN fragmenté et chromosomiquement déséquilibrés sont issus d'une apoptose abortive, ils seront retenus sur la colonne. Ainsi, nous devrions obtenir des fréquences de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés significativement diminuées dans la population annexine V- chez ces hommes.

Récemment, Rouen et coll. (2013) ont corroboré nos résultats. Toutefois, selon les auteurs, la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés chez ces hommes serait induite durant le transit dans les voies génitales, contrairement à notre hypothèse.

Si tel est le cas, nous devrions obtenir une diminution non seulement du nombre de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés mais aussi du nombre de spermatozoïdes porteurs du remaniement (équilibrés) dans la population annexine V-.

### **Méthodologie**

Après obtention du culot cytogénétique à partir du prélèvement de sang, une FISH avec des BACs (bacterial artificial chromosomes) et/ou des sondes commerciales sera réalisée afin de déterminer précisément les points de cassure du remaniement.

La séparation des spermatozoïdes d'hommes porteurs d'un remaniement chromosomique en deux populations annexine V+ et annexine V- s'effectuera par tri cellulaire à l'aide de microbilles magnétiques conjuguées à l'annexine V.

Nous effectuerons sur l'éjaculat et les deux populations de spermatozoïdes sélectionnés :

- une FISH avec les sondes spécifiques chevauchant les points de cassure du remaniement afin d'étudier la ségrégation méiotique
- une technique TUNEL pour évaluer la fragmentation.

### **MOUTOU Céline** : Etude de faisabilité du DPI pour les maladies monogéniques par séquençage haut débit

Le Diagnostic Préimplantatoire (DPI) peut être proposé à des couples à risque de transmettre une maladie génétique grave à sa descendance. Les difficultés techniques majeures du DPI résident dans le peu de matériel disponible pour réaliser l'analyse génétique (cellule unique), et le délai restreint pour en rendre les résultats (24 à 48h). Pour les DPI pour maladies monogéniques, la PCR multiplex est utilisée et combine si possible la recherche de(s) la mutation(s) en cause à une analyse familiale à l'aide de marqueurs microsatellites. Il est nécessaire pour chaque couple faisant une demande de DPI, de trouver plusieurs microsatellites informatifs entourant le locus d'intérêt et, si aucun test existant n'est adapté, de développer un test multiplex sur cellule unique. Ces développements demandent un temps et un savoir-faire considérables et sont très coûteux. Ils peuvent rallonger le délai d'attente des couples.

Nous proposons de tester et éventuellement valider cliniquement une approche par séquençage haut-débit (NGS) ciblé pour les DPI des maladies monogéniques. Cette technique utilisera la méthode de « karyomapping », ou haplotypage à l'aide de SNPs informatifs combinée au séquençage des exons codants du gène d'intérêt. Pour cette étude, le panel ciblant les régions à amplifier permettra le séquençage des exons du gène CFTR (impliqué dans la mucoviscidose) ainsi que des SNPs communs inclus dans la région du gène. Cela permettra en théorie la prise en charge de la quasi-totalité des couples, sans mise au point préalable nécessaire en dehors d'une étude familiale utilisant la même technique. Une telle application nécessite une étape préliminaire d'amplification génome entier puisque la quantité d'ADN recueillie à partir d'une seule cellule est insuffisante pour l'analyse de plusieurs centaines d'amplicons. Ce type d'amplification augmente le taux d'allele drop-out ou ADO, phénomène se produisant lors de l'amplification sur cellule unique et menant à l'absence d'amplification d'un des deux allèles, pouvant faire apparaître des locus hétérozygotes comme homozygotes. Une première phase d'optimisation de la technique sur cellules témoin sera nécessaire pour s'assurer de la faisabilité du NGS sur une ou deux cellules (mimant une biopsie de blastomères

au stade J3 des embryons) et sur 5 à 10 cellules (mimant une biopsie de trophoctoderme au stade J5) et estimer le taux d'ADO. La procédure sera ensuite optimisée de façon à permettre un délai de rendu de résultat compatible avec un transfert embryonnaire frais si la biopsie se fait au 3ème jour. La validation clinique se fera grâce à la réanalyse d'embryons non transférables issus de DPI pour mucoviscidose, avec le consentement des couples, à l'aide de la technique de NGS. La concordance des résultats avec ceux du DPI sera vérifiée. Si la technique est validée, nous envisagerons une application aux futurs DPI pour mucoviscidose.

**ROUX Christophe** : Amélioration des techniques de qualification fonctionnelle et sécuritaire du tissu ovarien

L'autoconservation de cortex ovarien est proposée à des fillettes ou des femmes jeunes, avant traitement hautement gonadotoxique, comme technique de préservation de la fertilité. Ce tissu ovarien est actuellement réutilisé par technique d'autogreffe. La réussite de la greffe, attestée par une reprise de la fonction ovarienne, dépend de la qualité des greffons et de leur revascularisation après greffe. L'autogreffe de tissu ovarien n'est possible que si l'indication de la cryoconservation de tissu ovarien était une pathologie non néoplasique ou néoplasique avec un risque carcinologique maîtrisé. Notre équipe s'est attachée, à développer et valider des techniques de qualification du tissu ovarien et de recherche de la maladie résiduelle (en cas de leucémies aiguës) au niveau du cortex ovarien cryoconservé. L'équipe est investigateur principal d'une étude multicentrique (PERIDATOR/DATOR) qui a pour but de constituer une cohorte de patientes ayant bénéficié d'une congélation de tissu ovarien, en insuffisance ovarienne prématurée, et potentiellement candidates à l'autogreffe (PERIDATOR). L'autogreffe de tissu ovarien est réalisée en cas de projet parental s'il n'y a pas de contre-indications à la greffe (DATOR).

L'objectif principal de cette étude est de développer et proposer des techniques de qualification du tissu ovarien cryoconservé : Qualification fonctionnelle par la recherche de follicules ovariens vivants et de progéniteurs endothéliaux par immunocytologie et cytométrie en flux (CD45neg, CD34+...), et si nécessaire qualification sécuritaire carcinologique par la recherche de cellules néoplasiques en cytométrie en flux et biologie moléculaire (si des marqueurs moléculaires sont disponibles). L'objectif secondaire est de codifier une ou des techniques de préparation du cortex ovarien qui permettront ces qualifications ainsi que le conditionnement du cortex pour les techniques de biothérapie alternatives à l'autogreffe que sont la folliculogénèse in vitro ou l'injection de follicules ovariens isolés.

Cette étude translationnelle multidisciplinaire nécessite des savoirs faire et des plateaux techniques présents sur le site de Besançon. L'analyse des résultats devrait permettre d'identifier des facteurs prédictifs de réussite de la greffe en terme de reprise de la fonction ovarienne, d'améliorer la sécurité de la pratique de l'autogreffe de cortex ovarien et ainsi de favoriser la réutilisation de ce tissu autoconservé par technique d'autogreffe. De plus ce travail participera à l'amélioration des méthodes et techniques de conditionnement du tissu ovarien cryoconservé en vue de sa réutilisation.

**SERMET-GAUDELUS Isabelle** : Exploration des nouveaux-nés présentant un diagnostic non conclu au dépistage néonatal de la mucoviscidose en vue du conseil génétique

#### **Objectifs:**

En France, depuis la mise en place du dépistage systématique pour la mucoviscidose, 277 enfants présentent un diagnostic non conclu. Ces enfants de diagnostic incertain sont habituellement asymptomatiques mais constituent une population à risque qui peut secondairement développer une forme typique de mucoviscidose ou une atteinte modérée et retardée, d'autres enfin resteront asymptomatiques. Cette incertitude diagnostique génère des demandes de conseil anténatal et de procréation médicale assistée auxquels on ne peut pas répondre actuellement faute de certitude diagnostique. Ceci est particulièrement problématique dans le cadre législatif français qui restreint le diagnostic prénatal ou le diagnostic préimplantatoire aux mutations du gène CFTR d'une particulière gravité. L'objectif principal de cette étude est de clarifier le diagnostic de ces patients et ainsi d'adapter la stratégie de conseil génétique délivrée aux familles en cas de grossesse ultérieure.

#### **Méthodologie:**

Nous utiliserons une investigation couplée fonctionnelle et génétique particulièrement novatrice, car elle permet de valider les variants du gène CFTR dont l'interprétation est délicate en détectant leurs conséquences physiopathologiques chez le cas index lui-même. En effet, les patients dont les épithélia révèlent une dysfonction de la protéine CFTR, sont à risque de développer des signes cliniques de mucoviscidose. L'exploration fonctionnelle de CFTR sera réalisée in ou ex vivo sur

l'épithélium nasal (différence de potentiel nasal), rectal (courant de court circuit sur biopsie rectale) et sudoral (test de la sueur) et permettra d'étudier le transport trans-épithélial actif des ions chlorure (Cl-) et sodium (Na+).

Les epithelia des patients atteints de mucoviscidose ont une sécrétion de Cl- diminuée et une absorption excessive de Na+. La détection de ces anomalies fonctionnelles permettra de cibler les patients présentant une anomalie génétique pathogène et à risque de développer une atteinte clinique.

L'ADN de ces patients sera ensuite étudié par les techniques de séquençage haut débit permettant une étude complète du gène CFTR (soit la totalité des introns/exons et les séquences régulatrices, en plus de la séquence codante). Cette étude constitue un projet pilote destiné à investiguer les 40 cas repérés dans la base génétique CFTR France.

**Résultats attendus:**

Ces deux stratégies, fonctionnelle et génétique, n'ont encore jamais été couplées alors que seule leur association valide le diagnostic de mucoviscidose dans ce cadre diagnostique complexe. Cette approche permettra d'économiser des explorations génétiques lourdes et coûteuses. Surtout, elle apportera des conclusions valides dans le cadre de l'aide à la prise en charge d'un diagnostic prénatal ou d'un diagnostic préimplantatoire.

**STEFFANN Julie** : Faisabilité du diagnostic prénatal de maladies génétiques par séquençage haut débit de l'ADN foetal circulant dans le sang maternel

Les nouvelles techniques de séquençage haut débit sont en train de modifier profondément le dépistage prénatal des anomalies chromosomiques. Quelques études récentes semblent montrer que ces techniques pourraient ouvrir la possibilité de réaliser de façon précoce, et non-invasive le diagnostic prénatal (DPN) de maladies monogéniques.

Impliqués depuis de nombreuses années dans le diagnostic prénatal de maladies monogéniques, nous souhaitons réaliser une étude de faisabilité du diagnostic prénatal par séquençage haut-débit de l'ADN circulant dans la sang maternel.

Cette étude consiste à comparer les haplotypes foetaux reconstitués à partir de l'étude de l'ADN foetal circulant dans le sang maternel, avec les haplotypes foetaux reconstitués à partir de l'étude d'un prélèvement foetal (villosités choriales, amniocytes) au locus CFTR. Pour cela nous préleverons une cinquantaine de patientes enceintes à risque élevé de transmettre une maladie génétique monogénique, quelle qu'en soit la nature, et souhaitant bénéficier d'un DPN dans notre centre, ainsi que leur conjoint et leur foetus. L'étude sera centrée sur le locus CFTR et consistera à analyser la ségrégation de 9 SNP, dont 5 intragéniques dans chaque trio. Les résultats issus du prélèvement sanguin maternel et ceux issus du prélèvement foetal seront comparés pour déterminer les performances diagnostiques de cette approche, le nombre de SNP nécessaires, et la profondeur de lecture minimale requise. Si la fiabilité diagnostique de cette approche s'avérait correcte, l'évaluation de son coût, et de son délai de réalisation permettra de déterminer si cette procédure est compatible avec les contraintes du DPN de routine.

Dans l'affirmative, elle pourrait alors être appliquée au DPN non invasif de la quasi totalité des maladies monogéniques, évitant ainsi aux patientes l'inconfort et le risque d'interruption de grossesse induits par les procédures invasives actuellement en vigueur.

**UZBEKOVA Svetlana** : BestOv : identification de marqueurs de la qualité de l'ovocyte dans les cellules de cumulus par la spectrométrie de masse

Les techniques d'AMP incitent au développement d'outils prédictifs non-invasifs de la compétence de l'ovocyte à soutenir le développement embryonnaire. Le couplage métabolique entre l'ovocyte et les cellules de cumulus (CC) est indispensable pour acquérir cette compétence. Des analyses des transcrits, des protéines et des lipides de CC, reflétant la qualité de l'ovocyte, ont déjà été engagées pour développer des tests prédictifs de grossesse dans le cadre de l'AMP. Cependant, les analyses qui nécessitent de nombreuses étapes de préparation d'échantillons s'avèrent lourdes pour un diagnostic hospitalier. En revanche, l'analyse de CC par spectrométrie de masse (SM) peut devenir une alternative concrète, grâce à l'approche d'ICM-MS (Intact Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry). Celle-ci est simple et rapide et peu coûteuse en fonctionnement.

L'ICM-MS consiste à analyser directement les cellules entières, sans extraction protéique ou lipidique préalable. Nous avons démontré la faisabilité de cette technique sur les cumulus individuels humains et bovins.

L'analyse différentielle des profils spectraux de CC humaines comparant les CC issues d'ovocytes individuels immatures vs matures et de ceux développés en blastocystes après l'ICSI vs arrêtés avant ce stade, a déjà permis de caractériser certains marqueurs protéiques. Les outils de SM à haute résolution dont nous disposons (MALDI-TOF-TOF UltraFlex et LTQ Velos Orbitrap) permettent a) de réaliser et comparer les profils protéiques et lipidiques de CC par ICM-MS, et b) par une approche ciblée top-down, la caractérisation structurale des espèces protéiques (séquence et modifications post-traductionnelles) et lipidiques observés par ICM-MS.

L'objectif de ce projet est de caractériser les marqueurs potentiels de CC humaines, notamment les espèces moléculaires observées par ICM-MS (à la fois protéiques et lipidiques), et de construire un modèle d'implication de ces marqueurs dans la maturation ovocytaire et l'acquisition de sa compétence au développement embryonnaire. Ceci a pour but ultime de développer un test diagnostique non-invasif et rapide de la qualité ovocytaire, en utilisant les CC éliminées lors des procédures d'ICSI.

1. Les analyses différentielles et quantitatives par ICM-MS des CC issues d'ovocytes individuels humains, aptes ou pas au développement embryonnaire après ICSI, seront réalisées sur un grand nombre d'échantillons et couplées à des analyses statistiques afin de révéler (et/ou confirmer) des pics marqueurs potentiels.

2. Une analyse (top-down) par SM à haute résolution après micro-purification de protéines <30 kDa permettra l'identification des espèces protéiques observées par ICM-MS.

3. Une analyse (top-down) par chromatographie liquide et SM à ultra-haute résolution (Q-Exactive, Profiling, CEA) permettra l'identification des espèces lipidiques observées par ICM-MS.

4. L'analyse statistique de données ICM-MS de CC avec celles du développement d'embryons et de patientes permettra, par la modélisation, d'estimer les valeurs prédictives de ces marqueurs.

**VINCENT Marie-Claire** : Evaluation du dosage relatif de mutation dans le diagnostic prénatal non invasif de la mucoviscidose par séquençage haut débit sur une plateforme MiSeq (Illumina)

#### **Objectifs :**

Nous avons développé un test de DPNNI de la mucoviscidose à partir de sang maternel par l'analyse de l'ADN foetal libre circulant (cff-DNA, cell-free foetal DNA) en recherchant la mutation paternelle dans les familles présentant une hétérozygotie composite au niveau du gène CFTR. L'objectif de cette étude est de compléter notre offre de diagnostic non invasif de la mucoviscidose (CF) par dosage relatif de mutation par séquençage haut débit chez les couples à risque de CF dont chaque membre est porteur du même variant. Malgré les progrès technologiques, la complexité des analyses bioinformatiques reste encore à résoudre avant de proposer ces tests en routine.

#### **Résultats attendus :**

Automatisation et simplification du diagnostic prénatal non invasif de la mucoviscidose par NGS : diagnostic direct et indirect à l'aide d'outils informatiques adaptés, en particulier un algorithme de calcul spécifique pour :

- La détermination de la proportion de cffDNA de l'échantillon plasmatique
- Le dosage relatif du SNV familial : séquence mutée par rapport à la séquence sauvage
- Le diagnostic indirect par étude de transmission de blocs de SNPs (définissant les haplotypes morbide/sain)

#### **Matériels et Méthodes :**

L'étude conduite est rétrospective ; elle est réalisée chez 12 couples à priori à risque de mucoviscidose. L'analyse en trio inclura 24 ADN génomiques parentaux et 12 plasmas de femmes enceintes soigneusement sélectionnées sur la base des génotypes parentaux et du résultat du DPN invasif.

L'étude sera réalisée par séquençage haut débit sur un appareil MiSeq (Illumina) à partir de bibliothèques de séquençage obtenues par capture. L'étude s'articulera en deux temps :

- une phase de validation analytique :
  - sélection des marqueurs polymorphes informatifs du gène CFTR au sein de notre population
  - génération d'un set de données brutes de NGS du gène CFTR pour des échantillons témoins chimères créés artificiellement et mimant les trois types de plasmas maternels susceptibles d'être analysés en DPN,
  - création à partir de ces données de l'algorithme de calcul pour le dosage relatif des haplotypes parentaux transmis et le dosage relatif de l'allèle muté

- une phase de validation diagnostique :
  - évaluation et validation de l'algorithme défini sur les 12 plasmas de femme enceintes à risque de CF.