

APPEL D'OFFRES 2010
« AMP, diagnostic pré-implantatoire, diagnostic génétique »
PROJETS FINANCES

Chercheur	Sujet de recherche	THEME
Virginie ROZEE GOMEZ	AMP sans frontière : de Paris à Bruxelles, Barcelone et Thessalonique	1
Frédéric MOREL	Ségrégation méiotique et fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes de porteurs d'anomalie chromosomique constitutionnelle et ICSI	5
Christophe ROUX	Recherche de maladie résiduelle au niveau du tissu ovarien autoconservé en cas de pathologie néoplasique	2
Nikos KALAMPALIKIS	Le don et son récit. Paradoxes bioéthiques et enjeux psychosociaux du don de sperme	1
Stéphane VIVILLE	Recherche de gènes impliqués dans l'infertilité humaine non syndromique	4
Vanina DE LAROUZIERE	Intérêt de la stratégie de transfert au stade zygotique, en fécondation in vitro (FIV/ICSI), pour les couples présentant une fragmentation précoce massive et récurrente de leurs embryons	4
Irène NETCHINE	Etude de la méthylation de la région 11p15 au cours du développement chez l'homme : tissus fœtaux et diagnostic anténatal de Syndrome de Silver Russell ou Wiedemann-Beckwith	4
Jean-François GUERIN	Génotypage de patientes infertiles pour un nouveau facteur de survie maternel. Etude cas-témoins multicentrique	5
Tristan GAUTHIER	Allogreffe utérine chez la brebis	4
Charles PINEAU	Identification de marqueurs protéiques de la lignée germinale testiculaire dans le plasma séminal humain par une approche Omique combinatoire	5
Anu BASHAMBOO	NR5A1 et l'infertilité	4

Jean-Michel DUPONT	Diagnostic par puces à ADN des aneuploïdies fœtales à partir du sang maternel	4
Pierre SARDA	Evaluation médico-économique de 3 différentes puces à ADN dans le cadre du diagnostic prénatal	4
Déborah BOURC'HIS	Reprogrammation chromatinienne de l'embryon vue par les techniques de micro-ChIP dans le modèle murin	4
Nathalie DI CLEMENTE-RENAULD-BESSE	Amélioration de la valeur prédictive de l'hormone anti-Müllérienne (AMH) en AMP	4
Anne BAUDOT	Nouveaux systèmes pour la cryopréservation d'ovocytes par congélation ou par vitrification	2

THEMES DE RECHERCHE

- 1) Sciences humaines, économiques et sociales : étude en santé publique et / ou éthique ;**
- 2) Sécurité et qualité des pratiques, notamment dans les technologies innovantes ;**
- 3) Impact des diverses méthodes en matière de santé ;**
- 4) Amélioration des techniques et méthodes ;**
- 5) Qualité des gamètes**

AMP sans frontière : de Paris à Bruxelles, Barcelone et Thessalonique

Virginie ROZEE GOMEZ (Unité mixte INED-INSERM-Paris Sud XI)

Contexte : A la veille de la révision de la loi de bioéthique française, le recours à l'AMP et ses contournements sont plus que jamais publics et suscitent de nombreux débats et controverses. La France n'autorise pas certaines pratiques et réserve l'AMP aux couples hétérosexuels. Par ailleurs, le recours à certaines pratiques reste très limité par les contraintes d'accès. Dans ce contexte légal et médical, des hommes, des femmes et des couples français partent à l'étranger pour recourir à une AMP. Des pays tels que la Belgique, l'Espagne ou la Grèce, ont une législation plus libérale en termes d'accès à l'AMP et proposent des services certes coûteux mais plus rapides. L'espace européen offre donc un autre recours médical pour les individus et couples français infertiles et/ou exclus de la prise en charge en France.

Objectifs : Ce projet s'inscrit dans le cadre des recherches sur le recours au système de soins dans le domaine de l'AMP. En se plaçant dans un contexte européen, ce projet vise à comprendre les motivations et le parcours des Français qui partent à l'étranger pour recourir à une AMP. Cette analyse, qui s'inscrit dans le cadre des discussions actuelles autour des lois de bioéthique, mettra en regard les réflexions académiques menées dans le cadre des possibles évolutions des lois de bioéthique et les attentes des Français à cet égard.

Méthodologies : Cette recherche s'appuie sur une équipe pluridisciplinaire qui mettra en œuvre des méthodes d'étude relevant de l'épidémiologie, de la sociologie et de la psychosociologie. Une approche à trois niveaux sera développée : (1) une analyse au niveau institutionnel, (2) une approche au niveau social, (3) une approche au niveau individuel. L'étude sera menée de manière transversale dans quatre centres médicaux en France, Belgique, Espagne et Grèce. L'approche individuelle portera sur l'ensemble des Français recourant à l'AMP dans ces centres qu'il s'agisse de couples (de même sexe ou non) ou d'individus, femmes ou hommes, célibataires. Elle s'appuiera sur une approche quantitative (400 auto-questionnaires) et une approche qualitative (60 entretiens semi-directifs).

Résultats attendus : A l'heure du débat sur les lois de bioéthique françaises, le recours à l'AMP des Français à l'étranger reste très peu étudié. A partir d'une triple approche (institutionnelle / sociologique / individuelle), cette étude permettra d'appréhender le recours à l'AMP et sa prise en charge dans quatre pays européens. Elle permettra de mettre en regard les motivations individuelles, ainsi que la réflexion politique et sociale autour de l'AMP. Cette recherche permettra de mieux comprendre les enjeux sociaux et politiques du recours à l'AMP et d'éclairer le débat politique actuel.

Ségrégation méiotique et fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes de porteurs d'anomalie chromosomique constitutionnelle et ICSI

Frédéric MOREL (INSERM U613 - CHU BREST)

Les objectifs de ce projet sont de déterminer pour chaque homme porteur d'une anomalie chromosomique de structure le pourcentage de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés et celui avec un ADN fragmenté dans l'éjaculat total et dans les spermatozoïdes sélectionnés en vue d'une ICSI, de rechercher l'incidence de ces fréquences de spermatozoïdes déséquilibrés et fragmentés sur les résultats de l'ICSI, et de déterminer si les gamètes chromosomiquement déséquilibrés ont un ADN plus fragmenté que ceux dont l'équipement chromosomique est normal ou équilibré. Dans cette étude nous allons inclure environ 60 patients porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle. L'équipement chromosomique des spermatozoïdes est évalué par FISH et la fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling assay). L'ICSI est réalisée selon les protocoles classiques. Les embryons sont classés d'après la classification de Puissant associée à la classification du Blefco. Les évaluations de l'équipement chromosomique et de l'ADN fragmenté réalisées sur éjaculat total et sur spermatozoïdes sélectionnés en vue d'une ICSI, chez un même patient permettront de voir s'il existe des variations de la fréquence des spermatozoïdes déséquilibrés et / ou fragmentés, notion jusqu'à présent jamais abordée dans la littérature. S'il existe de telles variations, la stratégie de préparation des spermatozoïdes permettant d'obtenir les pourcentages de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés et fragmentés les moins élevés sera utilisée au laboratoire pour effectuer les ICSI. L'étude multi-variée effectuée afin de corréler les résultats issus de la FISH et du TUNEL aux résultats après tentatives d'ICSI permettra peut-être de déterminer la fréquence de spermatozoïdes chromosomiquement déséquilibrés ou fragmentés à partir de laquelle les chances de succès d'ICSI sont minimales ou nulles, notion jusqu'à présent très peu étudiée et très controversée.

Enfin, concernant l'éventuelle relation entre le taux de fragmentation de l'ADN spermatique et l'équipement chromosomique des gamètes, chez deux patients porteurs d'une anomalie chromosomique constitutionnelle, nous avons montré, pour la première fois, que les spermatozoïdes avec un ADN fragmenté sont majoritairement ceux dont l'équipement est déséquilibré. De plus, il apparaît lié au type de déséquilibre, dépendant du mode de ségrégation. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus sont très prometteurs et permettront peut-être de contribuer à la compréhension des origines de la fragmentation.

Recherche de maladie résiduelle au niveau du tissu ovarien autoconservé en cas de pathologie néoplasique

Christophe ROUX (Service de génétique, histologie, biologie du développement et de la reproduction - centre d'AMP, CHU Saint Jacques)

L'autoconservation de tissu ovarien est proposée à des fillettes ou des femmes âgées de moins de 35 ans, devant subir un traitement gonadotoxique stérilisant, dans le but de préserver leur fertilité. Actuellement et en l'absence d'autres techniques (maturation in vitro, greffe de follicules ovarien isolés...), l'autogreffe de ce tissu autoconservé est la seule technique permettant de restaurer la fertilité. L'autogreffe est possible si l'indication de la cryoconservation d'ovaire est une pathologie non néoplasique ou une pathologie maligne à faible risque de localisation métastatique ovarienne. Dans les autres cas de pathologies néoplasiques, le tissu ne peut pour l'instant pas être réutilisé du fait de l'absence de technique codifiée pour évaluer la maladie résiduelle.

L'objectif principal de ce projet sera de développer et de valider des outils pour s'assurer de l'absence de cellules néoplasiques résiduelles au niveau du tissu ovarien autoconservé en cas de pathologie néoplasique. Les hémopathies malignes seront les premières pathologies étudiées car l'UMR645 dispose d'outils sensibles (cytométrie « multi-couleur », biologie moléculaire) et d'un savoir-faire pour détecter cette maladie résiduelle au niveau sanguin, médullaire ou ganglionnaire.

La mise à disposition de techniques et d'outils attestant de l'absence de maladie résiduelle dans les tissus ovariens ajoutera une dimension sécuritaire carcinologique aux dimensions microbiologique et fonctionnelle des contrôles pré-greffes mis en œuvre en prévision de la réutilisation du tissu cryoconservé par technique d'autogreffe.

Les objectifs méthodologiques seront les suivants : (i) codifier les techniques de préparation du tissu ovarien (dissociation mécanique, enzymatique,..) pour l'obtention de préparations tissulaires et/ou des populations cellulaires analysables (ii) développer et/ou adapter des techniques de détection des cellules néoplasiques, en déterminant leur sensibilité et leur spécificité. Les techniques mises en œuvre feront appel à l'identification de marqueurs de malignité par cytométrie en flux ou encore à l'amplification de transcrits anormaux par PCR sur les extraits tissulaires ou sur cellules isolées.

Une modélisation préalable consistera à ajouter différentes dilutions de cellules leucémiques « étrangères » (lignées cellulaires commercialisées) parfaitement caractérisables.

Un modèle de xénogreffes de tissu ovarien humain chez la souris immunodéficiente pourra parallèlement être mis au point pour tenter d'obtenir une phase d'amplification de la maladie résiduelle in vivo et accroître la sensibilité de la technique pendant la phase de mise au point.

La mise au point des techniques de qualification fera appel à du matériel humain - fragments de corticale ovarienne obtenus au cours de résection percoelioscopique chez des patientes présentant un syndrome des ovaires polykystiques (matériel de référence du tissu ovarien sain), - matériel provenant d'autopsies scientifiques documentées, - matériel d'autoconservation de tissu ovarien provenant de patientes chez lesquelles une autoconservation a été effectuée et qui sont décédées, ces patientes ayant préalablement donné leur accord pour de telles études lors du recueil de leur consentement avant l'autoconservation du tissu ovarien.

Le don et son récit. Paradoxes bioéthiques et enjeux psychosociaux du don de sperme

Nikos KALAMPALIKIS (Groupe de Recherche en Psychologie Sociale (GRePS – EA 4163 - Institut de Psychologie – Université Lyon 2)

Objectifs

Ce projet s'intéresse à une technique de procréation spécifique, l'insémination avec donneur de sperme (IAD). Il se focalise sur un sujet d'une importance capitale, le devenir du récit de conception proposé aux enfants nés par don de sperme. Ce type de recherches, rarissimes à ce jour en France, pourrait contribuer de manière solide à mettre en évidence le vécu et les paradoxes de ces enjeux bioéthiques. Il compte approfondir les acquis d'outils validés (questionnaire national, guides d'entretiens, analyse législative), de partenariats établis (Fédération française des Cecos), de connaissance fine des populations sensibles impliquées (donneurs, couples), pour investiguer de manière ciblée de nouvelles pistes de recherche. Les partenariats nationaux et européens envisagés donneront une nécessaire dimension internationale à l'étude.

Méthodologies

Nous opterons pour la construction d'un échantillon de couples demandeurs de don basé sur trois variables : (i) le genre du membre du couple, (ii) le fait d'être dans une démarche initiale de demande de don ou de la renouveler, (iii) l'âge de l'enfant (temporalité de la première démarche). Le questionnaire, l'entretien individuel et l'entretien collectif (focus group) sont les trois techniques préconisées dans un esprit de triangulation méthodologique.

Résultats

1. une connaissance plus approfondie des systèmes de représentations et pratiques mis en jeu dans les positions adoptées vis-à-vis de l'IAD par une population directement impliquée et peu étudiée en France.
2. une compréhension des écarts observés dans la littérature scientifique internationale entre les possibilités offertes par les cadres législatifs, les intentions parentales et le devenir effectif du récit de conception proposé.
3. une toute première étude des préconisations des Etats généraux de bioéthique en matière de dons de gamètes.

Recherche de gènes impliqués dans l'infertilité humaine non syndromique

Stéphane VIVILLE (IGBMC, Strasbourg)

Un nombre croissant de couples fait appel à l'assistance médicale à la procréation et 1 à 3.6 % des grossesses dans les pays occidentaux sont obtenues grâce à ces techniques d'AMP ¹. Pour plus de la moitié de ces couples, la cause des dysfonctionnements à l'origine de l'infertilité reste inconnue et la FIV est souvent proposée de façon systématique sans connaître l'étiologie de cette infertilité, ce qui n'est pas satisfaisant. Nous proposons donc dans cette étude d'identifier et de caractériser des gènes impliqués dans des cas supposés génétiques d'infertilité humaine permettant ainsi une meilleure prise en charge des couples en AMP.

L'objectif de cette étude est de sélectionner dans le génome d'hommes et de femmes infertiles issus de familles infertiles consanguines ou originaires d'une même région géographique, une région d'homozygotie. L'origine géographique commune des patients nous laisse espérer qu'un même évènement génétique ancestral est responsable du phénotype observé (effet fondateur). Le fait que plusieurs individus atteints soient issus de germains plaide en faveur d'une transmission sur un mode autosomique récessif, les individus atteints auraient hérité de chacun de leurs parents d'une même copie de l'allèle morbide arrière-grand paternel ou maternel. Les individus atteints présenteront donc une région d'homozygotie au locus morbide. Une étude *in silico* des gènes présents dans cette région nous permettra de sélectionner des gènes candidats : en priorité des gènes impliqués dans la méiose et exprimés préférentiellement dans les gonades. Les étapes suivantes de l'étude consisteront à séquencer l'ensemble des exons/jonctions intron-exon du /des gènes candidats afin d'identifier la ou les mutations causales. Enfin, pour confirmer que le gène identifié est bien responsable du phénotype d'infertilité, une étude fonctionnelle est nécessaire ; en raison de la difficulté d'atteinte de la protéine (gonadique exclusive ou préférentiellement), un recours à des modèles cellulaires et/ou animaux sont envisagés.

Intérêt de la stratégie de transfert au stade zygotique, en fécondation in vitro (FIV/ICSI), pour les couples présentant une fragmentation précoce massive et récurrente de leurs embryons

Vanina DE LAROUZIERE (Histologie, Biologie de la Reproduction, CECOS, hôpital Tenon)

La qualité des embryons obtenus en FIV (Fécondation In Vitro) est évaluée essentiellement sur des critères morphologiques et cinétiques, avant le transfert in utero qui se fait habituellement au deuxième (J2) ou troisième jour (J3) du développement embryonnaire. Les embryons de qualité satisfaisante qui n'ont pas été transférés, pour éviter le risque de grossesse multiple, sont congelés pour un transfert ultérieur. Parmi ces critères morpho-cinétiques, la fragmentation de l'embryon est un marqueur incontournable de qualité, inversement corrélée à son devenir. Or, 3% des couples présentent de façon imprévisible et récurrente une fragmentation précoce de la majorité de leurs embryons, aboutissant à une absence de transfert ou un échec d'implantation. Il a été montré dans certains modèles animaux que les facteurs régulateurs de mort cellulaire et de réponse au stress d'origine maternelle jouent un rôle crucial dans le développement embryonnaire précoce.

Nous avons alors fait l'hypothèse que les embryons de ces couples subissent de façon excessive les effets délétères des conditions de culture in vitro et, de ce fait, sont incapables de se développer normalement dans les conditions classiques de l'AMP. Nous proposons d'appliquer à ces couples une stratégie de transfert précoce à J1 au stade zygotique (ovocyte fécondé au stade des deux pronuclei ou 2PN) afin de soustraire leurs zygotes à l'effet potentiellement délétère de l'environnement in vitro. Les zygotes non transférés seront cultivés jusqu'à J2 pour valider le phénotype de fragmentation. Ceux qui échapperaient à cette fragmentation et évolueraient en embryons clivés de qualité satisfaisante seront congelés à J2.

Une étude préliminaire prospective non contrôlée, a été menée sur 53 couples présentant en moyenne 2.8 échecs de FIV/ICSI, associés à 50% de zygotes ou d'embryons massivement fragmentés et moins de 3% d'embryons de qualité optimale (« top embryos »). Quatorze grossesses cliniques ont résulté du premier transfert au stade zygotique, dont 10 évolutives avec naissance de 11 enfants en bonne santé, soit des taux de grossesse et d'accouchement respectivement de 26.4 % et 18.9 % par transfert. Ainsi, alors que chez ces couples, aucune grossesse n'avait été obtenue au cours de 147 tentatives précédentes aboutissant à 121 transferts au stade d'embryon clivé (Jour 2 ou 3 du développement embryonnaire), près de 20% des mêmes couples ont obtenu 1 enfant en 1 tentative de transfert zygotique.

Etude de la méthylation de la région 11p15 au cours du développement chez l'homme : tissus fœtaux et diagnostic anténatal de Syndrome de Silver Russell ou Wiedemann-Beckwith

Irène NETCHINE (Laboratoire de biologie moléculaire endocrinienne, INSERM U938, hôpital Armand Trousseau)

Objectifs

La région 11p15 chez l'homme est l'une des régions soumises à empreinte parentale très importante durant la vie foetale chez l'homme. Elle comporte des gènes essentiels pour la prolifération et le cycle cellulaire KCNQ1OT1, CDKN1C (ICR2, domaine centromérique) et IGF2, H19 (ICR1, domaine télomérique). Les troubles d'empreinte (LOI) de cette région telle que perte (LOM) ou gain (GOM) de méthylation sont en cause dans deux syndromes cliniquement opposés, le syndrome de Wiedemann-Beckwith (SBW) et le syndrome de Silver-Russell (SRS). Ces LOI se produisent le plus souvent en mosaïque ce qui rend leur détection avec les méthodes d'analyse conventionnelles très difficile. Les syndromes de SRS et BWS se caractérisent par une hétérogénéité clinique complexe qui peut être expliquée par l'aspect en mosaïque des LOI de la région 11p15 pouvant être différent d'un tissu à un autre.

Ces LOI se produisent très tôt durant le développement foetal et affectent ainsi le devenir du futur individu. A ce jour aucune étude exhaustive du pattern de méthylation de la région 11p15 n'a été réalisée chez l'homme. Or cette étude peut permettre d'avancer dans la compréhension de la physiopathologie du SRS et SBW. Beaucoup d'études ont été néanmoins réalisées chez la souris et les résultats sont extrapolés chez l'humain. Par ailleurs, le diagnostic anténatal (DPN), réalisé sur l'ADN extrait à partir d'échantillons biologiques fœtaux, permet la recherche de causes moléculaires de certaines maladies graves in utero. A ce jour, le DPN moléculaire des anomalies de méthylation de la région 11p15 pour les suspicions de SRS ou de SBW, n'est pas disponible.

Notre objectif à travers ce projet est donc d'étudier la méthylation différentielle de la région 11p15 dans différents tissus fœtaux normaux et pathologiques de façon aussi exhaustive que possible pour comprendre la physiopathologie complexe du SRS et SBW. Par ailleurs, le développement d'un diagnostic anténatal devient une nécessité pour répondre aux demandes croissantes de ce type de test pour lequel nous sommes de plus en plus sollicités en tant que le centre de référence en France du suivi médical et de l'analyse moléculaire de ces deux syndromes.

Résultats attendus

Des profils de méthylation différents de la région 11p15 peuvent être identifiés dans les différents tissus fœtaux normaux ou pathologiques qui seront analysés. Ces résultats aideront dans la compréhension de la physiopathologie du SRS et SBW. Par ailleurs, la mise au point du DPN moléculaire de la région 11p15 sur l'ADN amniocytaire nous permettra d'offrir un outil de diagnostic pour le dépistage du SRS et SBW *in utero*.

Méthodes

L'étude de la méthylation différentielle de la région 11p15 (ICR1 et ICR2) sera réalisée grâce à la technique quantitative, allele specific methylated multiplex real time quantitative PCR (ASMM RTQ-PCR) que nous avons récemment développée et validée au laboratoire, rendant possible une exploration moléculaire y compris sur une faible quantité d'ADN.

Génotypage de patientes infertiles pour un nouveau facteur de survie maternel. Etude cas-témoins multicentrique

Jean-François GUERIN (Service de médecine de la reproduction, Hôpital femme-mère-enfant, Bron)

Objectifs

Des signes d'apoptose, une forme de suicide cellulaire programmé, ont été décrits dans les ovocytes et l'embryon préimplantatoire à la fois in vitro et in vivo. En dépit de leur rôle crucial, les processus de mort cellulaire restent mal caractérisés dans ces tissus, notamment au niveau de leur contrôle génétique. Les régulateurs d'apoptose appartenant à la famille Bcl-2 occupent une place centrale dans les voies de décision de vie ou de mort cellulaire. Parmi ses membres, le facteur de survie Bcl2l10 est spécifiquement exprimé dans les ovocytes et l'embryon précoce humain. Le but du projet est d'étudier la variabilité génétique le long du gène Bcl2l10 chez des femmes fertiles et infertiles

Résultats attendus

Nous déterminerons si certaines variations alléliques détectées sur Bcl2l10 sont corrélées à l'infertilité féminine. Les effets possibles des variations observées sur l'expression du gène Bcl2l10 ou sur la fonction de son produit seront prédits, ouvrant la voie à des études fonctionnelles.

Méthodologie

Etude multicentrique de type cas – témoins portant sur des populations de femmes fertiles et infertiles. Séquençage moléculaire et analyse des séquences. Construction et test fonctionnel d'une protéine mutante recombinante.

Allogreffe utérine chez la brebis

Tristan GAUTHIER (Service de Gynécologie-Obstétrique Hôpital Mère Enfant, CHU LIMOGES)

Actuellement, les patientes ayant une absence d'utérus acquise ou congénitale ou des synéchies utérines complètes et désireuses d'un enfant ont comme seules solutions l'adoption ou la grossesse de substitution. Cette dernière, autorisée dans certains pays, est interdite en France. La greffe d'utérus pourrait être une alternative intéressante chez les patientes ayant une infertilité utérine et souhaitant mener une grossesse. Les allogreffes utérines pratiquées sur le porc, la brebis et le singe sont peu nombreuses dans la littérature. A ce jour aucune grossesse après allogreffe utérine n'a été décrite excepté chez les souris syngéniques.

Objectifs : Après avoir étudié la greffe ovarienne chez la brebis et la femme, nous désirons montrer la faisabilité chez la brebis d'une allogreffe utérine orthotopique associée à une immunosuppression optimale avec épargne en corticoïdes. L'objectif à terme est l'obtention de grossesse sur utérus greffé.

Résultats attendus : Nous prévoyons la réalisation de 10 transplantations utérines orthotopiques. Nous espérons un taux survie du greffon supérieur à 90 % avec le protocole immunosuppresseur. A 6 mois minimum du geste, les brebis seront inséminées. Nous espérons ainsi obtenir les premières grossesses après allogreffe utérines orthotopiques.

Méthodologie : Un prélèvement utérin avec les annexes et un large patch vasculaire sera réalisé chez la brebis donneuse sous anesthésie générale suivi d'euthanasie. La greffe orthotopique avec macroanastomoses vasculaires sera réalisée chez la brebis receveuse dans les suites immédiates du prélèvement de façon à réduire le temps d'ischémie froide. 10 greffes seront réalisées impliquant 10 brebis donneuses euthanasiées et 10 brebis receveuses.

Chaque greffe sera suivie d'un protocole d'immunosuppression comportant une induction par anticorps monoclonal anti-IL2, une association cyclosporine et mycophénolate mofetil et une corticothérapie brève sur 7 jours. Une artériographie sera réalisée à 8 semaines de chaque greffe afin contrôler la vascularisation utérine. A 3 mois de la greffe, une laparotomie exploratrice permettra l'analyse macroscopique du greffon. Une analyse histologique y sera systématiquement associée. A 6 mois de la transplantation et après stabilité du greffon, une substitution du mycophénolate, tératogène, par de l'azathioprine sera effectuée avant d'envisager une insémination de l'utérus greffé.

Identification de marqueurs protéiques de la lignée germinale testiculaire dans le plasma séminal humain par une approche Omique combinatoire

Charles PINEAU (Unité Inserm 625)

L'ICSI (intracytoplasmic sperm injection) est proposée aux couples infertiles souhaitant procréer dans les cas d'azoospermie non obstructive (NOA) chez le partenaire masculin. Ses chances de succès dépendent avant tout de la possibilité de récupérer des spermatozoïdes à partir de fragments de biopsies testiculaires. Malheureusement, il n'existe à ce jour aucune méthode permettant de prédire avec un fort degré de confiance la présence de cellules germinales post-méiotiques dans les testicules avant intervention chirurgicale, ce qui explique le taux extrêmement important de biopsies négatives.

Objectifs : Notre étude a pour objectif de vérifier si des biomarqueurs protéiques spécifiques des cellules germinales post-méiotiques peuvent être détectés dans le plasma séminal humain. Ces biomarqueurs pourraient être utilisés avec pertinence pour proposer une biopsie testiculaire seulement aux patients chez lesquels il y a de très hautes probabilités d'obtenir des spermatozoïdes après l'intervention chirurgicale.

Résultats attendus : Cette étude devrait permettre : 1) d'améliorer notre connaissance sur le protéome du plasma séminal humain chez l'homme fertile sain et chez les patients présentant des étiologies distinctes d'azoospermie; et 2) l'identification de biomarqueurs protéiques dont la présence dans le plasma séminal sera utilisée comme un indicateur prédictif fort de la probabilité de récupérer des spermatozoïdes vivant à partir de fragments de biopsies testiculaires.

Méthodologie : 500mg de protéines issues d'un pool de plasma séminal non-liquéfié provenant de donneurs sains seront pré-fractionnés sur deux chimiothèques de ligands hexapeptidiques (Proteominer™). En conditions de surcharge, les protéines fortement exprimées seront théoriquement diluées tandis que les protéines à faible nombre de copies seront concentrées. Les protéines adsorbées seront éluées sous 4 conditions différentes, produisant 8 sous-protéomes complémentaires. Chaque fraction sera digérée à la trypsine et injectée dans un spectromètre de masse LTQ-ORBITRAP™ XL en vue de l'identification de protéines à l'aide d'un algorithme innovant de « liste d'exclusion dynamique ». La liste de protéines identifiées sera comparée, fusionnée et complétée avec différents jeux de données déjà publiés de protéines du plasma séminal humain, conduisant à une liste de protéines uniques non-redondantes.

Une analyse de profilage tissulaire utilisant des données d'expression Affymetrix sera utilisée pour cribler l'ensemble de données protéiques et identifier des biomarqueurs fonctionnels potentiellement spécifiques pour chacun des organes participant dans la composition de protéique du plasma séminal (testicule, épидидyme, vésicules séminales et prostate). Dans le présent projet, la priorité sera donnée aux protéines spécifiques de la présence dans le testicule de cellules germinales méiotiques et post-méiotiques. La spécificité de ces biomarqueurs germinaux sera validée sur des plasmas séminaux normaux et pathologiques (NOA, agénésie bilatérale des canaux déférents, syndrome Sertoli-cell only, post-vasectomie) par des techniques de biochimie conventionnelles (e.g. Western blot). Une étude Pilote a démontré que l'approche « Omique combinatoire » est un outil puissant pour identifier des marqueurs biologiques pertinents à partir de fluides biologiques complexes sans avoir besoin de recourir aux lourdes et coûteuses approches de protéomique différentielle.

NR5A1 et l'infertilité

Anu BASHAMBOO (Institut Pasteur)

NR5A1 (également appelé SF-1), membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, est un régulateur de la transcription des gènes clés impliqués dans l'axe hypothalamo-hypophysio-stéroïdogène. Nous avons identifié plusieurs mutations dans le gène *NR5A1* associées à certains phénotypes d'infertilité humaine : insuffisance ovarienne primaire et infertilité masculine. Ces mutations sont peut-être la cause génétique la plus importante de ces phénotypes. Cette proposition vise à comprendre le mécanisme par lequel ces mutations sont associées à ces phénotypes. Pour y parvenir, nous allons analyser les propriétés biochimiques et fonctionnelles des protéines mutées en analysant leur capacité à subir des modifications post-traductionnelles, ainsi que leur capacité à se lier à des éléments connus de régulation, en synergie avec les cofacteurs de transactivation de gènes cibles. La capacité de chacune des protéines mutées qui vont directement interagir physiquement avec des cofacteurs spécifiques, notamment l'ARN non codant SRA, sera étudiée. Ces données seront utilisées pour déterminer le mécanisme par lequel des mutations de *NR5A1* entraînent une défaillance des ovaires et de la spermatogenèse et permettront d'identifier les autres facteurs génétiques responsables d'infertilité.

Diagnostic par puces à ADN des aneuploïdies fœtales à partir du sang maternel

Jean-Michel DUPONT (Institut Cochin - INSERM U 567)

La technique de référence pour le diagnostic prénatal des anomalies chromosomiques est aujourd'hui encore le caryotype réalisé après prélèvement invasif de matériel biologique fœtal, le plus souvent une amniocentèse. Cette approche qui offre une excellente fiabilité présente cependant l'inconvénient d'un risque de perte foetale qui en limite l'utilisation aux situations les plus à risque. La mise au point d'une méthodologie fiable et reproductible de diagnostic non invasif des aneuploïdies fœtales se heurte depuis de nombreuses années à l'impossibilité d'isoler de manière spécifique le matériel biologique fœtal présent dans le sang maternel, qu'il s'agisse de cellules ou d'ADN libre circulant. Notre objectif est de contourner cette étape de tri et d'enrichissement et de mettre à profit la technologie des puces à ADN pour réaliser une analyse pan génomique de l'ADN libre circulant dans le sang maternel afin de détecter une aneuploïdie foetale. Notre projet repose sur l'utilisation de puces SNP qui, par leur capacité à identifier les allèles présents dans un échantillon d'ADN, nous permettront d'identifier les allèles fœtaux en comparant les allèles présents dans les lymphocytes maternels (ADN maternel uniquement) et dans le plasma (ADN fœtal + ADN maternel). Au niveau de ces allèles fœtaux, l'analyse du ratio d'intensité de fluorescence entre allèle paternel et allèle maternel et sa comparaison après normalisation pour le chromosome entier avec le reste des chromosomes devrait nous permettre d'en déduire le nombre d'exemplaire de chaque paire. Une première étude de faisabilité a été réalisé en mélangeant de l'ADN fœtal trisomique pour le chromosome 21 à de l'ADN lymphocytaire de sa mère dans une proportion de 20% / 80% qui reflète la situation in vivo. L'analyse des intensités de fluorescence montre une variation significative du ratio pour les marqueurs du chromosome 21 par rapport à ceux des autres chromosomes prouvant ainsi la validité de l'approche.

Les objectifs du projet de recherche sont d'une part d'évaluer la faisabilité de l'analyse à partir d'ADN fœtal circulant dont la qualité est moins bonne que l'ADN lymphocytaire utilisé dans l'étude préliminaire et d'autre part d'analyser le sang de 30 femmes enceintes dont le caryotype foetal a été obtenu par ailleurs.

Evaluation médico-économique de 3 différentes puces à ADN dans le cadre du diagnostic prénatal

Pierre SARDA (Département de génétique médicale, hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier)

Le dépistage des maladies génétique avec handicap, en particulier avec un retard psychomoteur, constitue un enjeu majeur de santé publique. Le diagnostic prénatal de ces pathologies est extrêmement important et leur étiologie génétique difficile à identifier. Une anomalie chromosomique est retrouvée dans environ 10% des caryotypes fœtaux réalisés pour anomalie(s) échographique(s) et ce taux varie selon la ou les malformations constatées. Un caryotype fœtal normal ne permet pas d'éliminer une cause chromosomique, de plus en plus d'anomalies cryptiques (microremaniements) indétectables sur un caryotype classique étant décrites. Pour pallier cette insuffisance du caryotype à identifier plus d'anomalies chromosomiques lors d'un diagnostic prénatal, se développe depuis quelques années une nouvelle technique utilisant des puces à ADN. Cette méthode a révolutionné la génétique clinique et la cytogénétique car elle offre une meilleure résolution et permet de détecter plus d'anomalies chromosomiques que la cytogénétique classique. Son utilisation pour le diagnostic prénatal est encore limitée à quelques équipes et il n'y a pas encore eu d'évaluation des différentes puces disponibles sur le marché.

Notre projet actuel a pour objectifs :

1. de comparer 2 nouvelles puces à ADN, Cytogenetics Focused Array (Affymetrix) et 60K (Agilent), entre elles et avec notre puce de référence « GeneChip® Human Mapping 6.0 Set » (Affymetrix) pour la mise en évidence de déséquilibres chromosomiques (CNV) dans le cadre du diagnostic prénatal,
2. de comparer leur facilité d'utilisation (protocole, temps techniques, rendu du résultat),
3. d'évaluer leur coût dans le cadre du diagnostic prénatal.

Nous espérons ainsi doubler, par rapport au caryotype fœtal seul, le pourcentage d'anomalies chromosomiques identifiées en diagnostic prénatal pour malformations fœtales.

Dans une étude précédente, nous avons étudié la faisabilité de la réalisation d'un diagnostic prénatal des microremaniements chromosomiques chez des fœtus présentant au moins deux malformations dépistées lors d'une échographie obstétricale par la technique d'hybridation génomique sur puces à ADN. Nous utiliserons les ADN de cette étude et les résultats obtenus (puce de référence) pour comparer les nouvelles puces entre elles (concordance des résultats, facilité et simplicité technique, coût). Nous évaluerons également le délai de rendu des résultats, qui ne devrait pas être supérieur à celui du caryotype fœtal.

Reprogrammation chromatinienne de l'embryon vue par les techniques de micro-CHIP dans le modèle murin

Déborah BOURC'HIS (Equipe « Décisions épigénétiques et reproduction chez les mammifères », Institut Curie)

Les évènements de différenciation inhérents au développement sont initiés par des facteurs de transcription ayant une spécificité de séquence, et sont maintenus par des modifications épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. Le développement précoce des mammifères se caractérise par un remaniement drastique des profils épigénétiques hérités des gamètes. Cette reprogrammation est essentielle à l'acquisition d'un état de pluripotence à l'origine de la capacité de l'embryon à former une pléthore d'identités cellulaires. Elle est aussi impliquée dans la première décision de lignage de l'embryon, qui consiste à maintenir un état embryonnaire pluripotent ou à former le trophoctoderme à l'origine des tissus extraembryonnaires. Malgré l'importance de ce phénomène, la cinétique développementale, les cibles et les effets transcriptionnels de ces remaniements épigénétiques sont mal connus. Les études de profils de méthylation de l'ADN ont révélé une déméthylation massive des éléments transposables (TE) et de gènes de pluripotence de la fécondation à l'implantation, puis une reméthylation des TE dans la phase suivante. En revanche, les données quant aux modifications d'histones sont plus parcellaires et les quelques études cytologiques menées sur des embryons préimplantatoires ne donnent qu'une information nucléaire globale. La plupart des effets corrélatifs entre profils chromatinien, statut transcriptionnel et pluripotence ont été étudiés *in vitro* sur des cellules ES. La difficulté d'étudier la conformation chromatinienne de séquences particulières sur une quantité réduite de matériel a limité jusqu'à présent l'analyse des embryons très précoces.

Nous proposons de développer au laboratoire une méthode d'immunoprécipitation de chromatine spécialement adaptée à un nombre limité de cellules (micro-CHIP), dans le but de comprendre la spécificité, la cinétique et la fonction des remaniements des profils d'histones des embryons préimplantatoires. Cette technique sera validée dans le modèle murin, par l'étude des éléments transposables qui subissent une relaxation épigénétique dans les cellules pluripotentes. Nous utiliserons les TE comme marqueurs de la reprogrammation de l'embryon, en corrélation avec leur taux d'expression. Leur statut hautement répété devrait améliorer le seuil de détection de la micro-CHIP. L'étude de ces séquences a de plus un intérêt immédiat en pathologie puisque ces éléments mobiles peuvent perturber l'architecture et la transcription des gènes. Ce projet fournira des données originales et importantes sur les liens entre profils épigénétiques, pluripotence et protection du génome. Il représente de plus un préalable indispensable à l'étude d'embryons humains pour lesquels les relations entre épigénétique et potentiel développemental sont quasiment inconnus.

Amélioration de la valeur prédictive de l'hormone anti-Müllérienne (AMH) en AMP

Nathalie DI CLEMENTE-RENAULD-BESSE (INSERM U782 PARIS XI)

L'hormone anti-Müllérienne (AMH) *Müllerian inhibiting substance* est un membre de la famille du *transforming growth factor beta* (TGF- β) dont le rôle de plus connu est d'induire la régression des canaux de Müller, les ébauche des trompes et de l'utérus, chez le fœtus mâle. Chez la femelle où l'AMH est exprimée par les follicules en croissance, elle intervient dans le contrôle du recrutement des follicules primordiaux et leur maturation. Ces dernières années, son dosage s'est beaucoup développé en gynécologie. L'AMH sérique est un bon marqueur des tumeurs des cellules de la granulosa et de l'efficacité de leur traitement. Elle est surtout devenue un outil très précieux en Médecine de la Reproduction pour évaluer la réserve folliculaire d'une femme et la capacité de ses ovaires à être stimulés. L'objectif de ce projet est d'améliorer la valeur prédictive de l'AMH en AMP. Plus précisément, nous étudierons 1/ si la mesure de l'activité biologique de l'AMH ne serait pas plus pertinente, question qui n'a jamais été soulevée jusqu'à présent, 2/ comment l'AMH pourrait être un marqueur de la qualité embryonnaire et 3/ quel serait le rôle de l'AMH dans le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), qui est une des principales cause d'infertilité chez les femmes en âge de procréer. En effet, l'AMH doit être clivée pour être active mais on ne connaît pas la proportion d'AMH clivée dans le sérum et le liquide folliculaire. Nous prévoyons donc de la déterminer par des expériences d'immunoprécipitation suivies d'une analyse par western-blotting. Puis nous étudierons l'activité biologique de l'AMH dans ces fluides à l'aide d'un test sur plaque que nous venons de mettre au point au laboratoire. Nous chercherons également à confirmer que l'AMH est marqueur de la qualité embryonnaire dans les cycles semi-naturels, mais aussi dans les cycles stimulés. Nous étudierons pour cela le lien entre l'activité biologique de l'AMH folliculaire, la production d'AMH par les cellules de la granulosa et le taux de grossesses. Enfin nous poursuivrons l'exploration du rôle de l'AMH dans le SOPK, en mettant en culture des cellules de la granulosa obtenues après ponction et en étudiant leur réponse à différents stimuli.

Nouveaux systèmes pour la cryopréservation d'ovocytes par congélation ou par vitrification

Anne BAUDOT (INSERM U698, Hôpital Bichat)

Les avancées réalisées au niveau des traitements anticancéreux entraînent aujourd'hui un nombre de plus en plus croissant de jeunes femmes guéries souhaitant avoir un enfant. Or les traitements de chimiothérapie et de radiothérapie sont à l'origine d'une perte importante de fertilité, voire de stérilité précoce. En réponse à ce problème, la cryoconservation de systèmes biologiques semble une solution pleine de promesse puisqu'elle peut être en particulier envisagée pour les ovocytes, soit par la méthode de congélation lente (refroidissement lent en présence d'une faible quantité d'agent cryoprotecteur, avec formation de glace extracellulaire), soit par la méthode de vitrification (refroidissement rapide en présence d'une quantité élevée d'agent cryoprotecteur, sans aucune formation de glace). Cependant, malgré de récents progrès, ces deux techniques appliquées aux ovocytes ne donnent pas encore satisfaction. La cryopréservation des ovocytes matures est en effet délicate du fait du volume cytoplasmique important de cette cellule germinale qui contient une teneur en eau beaucoup plus élevée que les autres cellules, posant des problèmes au moment de la congélation. De plus, le noyau est bloqué en métaphase méiotique II, ce qui rend le fuseau mitotique très fragile et particulièrement sensible à la température et au stress osmotique. A la suite d'une congélation lente, moins de 2% des ovocytes décongelés donnent jusqu'à présent lieu à la naissance d'un enfant. En ce qui concerne la vitrification des ovocytes, elle n'est actuellement pas envisagée dans la plupart des pays (dont la France) à cause de la cytotoxicité des solutions cryoprotectrices nécessaires pour vitrifier.

Le projet que nous souhaitons développer propose, en se basant sur les compétences précédemment développés en chimie, conservation de cellules, tissus et cryobiologie, d'utiliser des techniques innovantes pour résoudre les problèmes liés aux procédures de refroidissement et de réchauffement en synthétisant de nouveaux polymères biocompatibles ou cryogels utilisables aux températures cryogéniques). Ce projet vise 1) à mettre au point, avec les cryogels, des conditions de congélation de gamètes femelles viables et fonctionnels en utilisant des techniques de congélation permettant de s'affranchir ou de réduire la quantité des cryoprotecteurs cytotoxiques, source de dérives possibles au niveau du patrimoine génétique ; 2) à étudier les protocoles de réchauffement adapter à utiliser pour obtenir des gamètes fonctionnels ; 3) à mettre au point les techniques de vitrification de ces gamètes en l'absence, ou avec une diminution très importantes en concentration, des cryoprotecteurs.