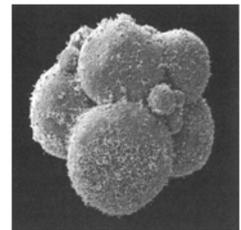


Inserm

cea

PARIS
DIDEROTUNIVERSITÉ
PARIS-SUD 11FACULTE DE MEDECINE
PARIS-SUD

INSTITUT FEDERATIF DE RECHERCHE N° 13
PARIS SUD CYTOKINES



Résumés des présentations de la Journée " Reproduction " de l'IFR 13

Mardi 23 octobre 2007

Hôpital Antoine Bécère - Clamart : Amphithéâtre - Niveau hall

Responsables scientifiques :

René Habert (rene.habert@cea.fr) Directeur de l'UMR 566.

Jean-Yves Picard (jean-yves.picard@u-psud.fr) Directeur de l'UMR 782.

Organisation :

Nicolas Regnault, (regnault.nico@wanadoo.fr) Secrétaire général de l'IFR 13.

INTRODUCTION

Une Journée « Reproduction » a été organisée par l'IFR 13 le mardi 23 octobre à l'Hôpital Antoine Bécère à Clamart.

Le Service de Gynécologie-Obstétrique de l'hôpital, dirigé par René Frydman, a été et reste un pionnier en France en procréation médicalement assistée. Au cours des dernières années, l'INSERM a développé considérablement la recherche en reproduction en créant deux grosses Unités de Recherche sur ce site. L'une est l'UMR « Gamétogenèse et Génotoxicité » INSERM U566, CEA, Universités Paris 7 et 11, créée en 2002 sur le centre CEA de Fontenay-aux-roses et dirigée par René Habert. L'autre est l'UMR « Endocrinologie et Génétique de la Reproduction et du Développement » INSERM U782 et Université Paris 11, créée en 2006 sur le campus de l'Hôpital et dirigée par Jean-Yves Picard.

Au cours de cette Journée Reproduction, les présentations ont été effectuées par les chercheurs, les enseignant-chercheurs et les praticiens hospitaliers des deux Unités, ainsi que par quelques invités (voir programme et résumés ci-joints). Cette journée, totalement gratuite, a été marquée par une très forte participation des acteurs de la discipline (plus de 150 personnes). Elle a contribué à mieux développer la communication scientifique et médicale dans le domaine de la Reproduction.

René Habert et Jean Yves Picard

Session 1 : EMBRYOGENESE

ROSSIGNOL Sylvie (oratrice invitée)

sylvie.rossignol@trs.aphp.fr

Expl. Fonct. Endo. Hôpital A. Trousseau et INSERM U515 / Univ. Paris 6, Paris

Epigénétique, empreinte parentale et AMP

S. Rossignol, Y. Le Bouc et C. Gicquel

Les procédures d'assistance médicale à la procréation (AMP) ont révolutionné le traitement de l'infertilité et sont actuellement à l'origine d'environ 1% des naissances dans les pays développés. Jusqu'à récemment, les études de suivi des enfants nés d'AMP n'avaient pas mis en évidence d'augmentation significative du risque de malformations congénitales par rapport à la population générale. Cependant, des études plus récentes suggèrent que l'AMP pourrait être responsable d'anomalies, et parmi elles, d'anomalies de croissance foetale.

Ces anomalies de croissance foetale sont aussi bien des retards de croissance intra-utérins (RCIU) que des macrosomies foetales, à savoir le syndrome de Wiedemann-Beckwith (SWB). Le mécanisme précis du RCIU des enfants nés après AMP reste obscur. A l'inverse, les patients nés d'AMP et présentant un SWB ont une anomalie épigénétique de la région 11p15. Une autre pathologie liée à l'empreinte parentale, le syndrome

d'Angelman, a été décrite chez des patients nés après ICSI et ces données suggèrent que les procédures d'AMP pourraient interférer avec les mécanismes de mise en place ou de maintien des marques épigénétiques, en particulier, dans les régions du génome soumises à empreinte parentale.

L'ensemble des données actuellement disponibles vont dans le sens d'une faible augmentation d'un risque de maladie liée à l'empreinte lui-même déjà extrêmement faible dans la population générale. L'étude prospective et à long terme de larges cohortes d'enfants nés après AMP sera donc nécessaire pour évaluer clairement ce risque.

MAURIN Marie-Laure

marie-laure.maurin@abc.ap-hop-paris.fr

Service d'Histologie Embryologie Cytogénétique, INSERM U782, Université Paris XI, Hôpital Antoine Bécère, AHP, Clamart

Etude des régions subtélomériques par *Multiplex Ligation dependant Probe Amplification (MLPA)* dans une cohorte de fœtus présentant un retard de croissance

M.-L. Maurin¹, F. Petit², S. Prevot³, A. Mantel⁴, V. Gautier¹, G. Tachdjian¹, S. Brisset

1 Histologie Embryologie Cytogénétique, INSERM U782, Univ Paris XI, Hôpital Antoine Bécère, AHP, Clamart.

2 Service de Biochimie, Hôpital Antoine Bécère, AHP, Clamart.

3 Service d'Anatomie Pathologique et Fœtopathologie, Hôpital Antoine Bécère, AHP, Clamart.

4 Service de Biochimie, Hôpital de Bicêtre, AHP, Le Kremlin Bicêtre.

De Vries et al. (2001) ont mis en évidence rétrospectivement l'importance statistique du petit poids fœtal comme élément indicateur de déséquilibre subtélomérique.

En 2001, De Vries et al. ont colligé rétrospectivement les données cliniques pré et post natales de 29 patients présentant un retard mental et porteurs d'un déséquilibre subtélomérique, comparées à 110 patients présentant un retard mental sans anomalie subtélomérique. Un seul critère clinique était statistiquement discriminant : le retard de croissance intra utérin (RCIU), portant sur le poids fœtal. Un RCIU était rapporté chez 37% (10/27) des enfants porteurs d'un déséquilibre télomérique associé à un retard mental, pour seulement 9% (9/105) des enfants porteurs d'un retard mental sans déséquilibre subtélomérique ($p < 0,0005$). La validité de ce critère n'a pas été testée à ce jour sur une cohorte de fœtus.

La MLPA est une technique de PCR mutiplex qui permet de détecter les anomalies de nombre de copies de 45 séquences d'acides nucléiques spécifiques dans une seule réaction de PCR à l'aide d'un seul couple d'amorces (Schouten et al., 2002).

Nous avons étudié 20 fœtus présentant un RCIU (16 au 10^{ème} percentile et 4 au 5^{ème} percentile). L'ADN fœtal a été extrait à partir d'échantillons de tissus congelés (12 de foie, 4 de poumon, 2 de rein et 2 de muscle). Quatorze ADN ont pu faire l'objet d'une analyse par MLPA. Aucun déséquilibre subtélomérique n'a été observé dans cette série. L'objectif est d'augmenter la taille de la cohorte afin d'obtenir 50 échantillons analysables. De plus, l'augmentation de la taille de la cohorte permettra de constituer une sous-cohorte de fœtus présentant un retard de croissance harmonieux, plus spécifiquement attendu dans une anomalie

chromosomique constitutionnelle.

De Vries B.B. et al., *J. Med. Genet.*, 2001, 38 : 145-150.

Schouten J.P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30 : e57.

COULLIN Philippe

philippe.coullin@u-psud.fr

INSERM U 782, 32 rue des Carnets, 92140 Clamart

Epidémiologie et génétique des môles hydatiformes

Ph. Coullin¹, A.L. Diatta², J.M. Afoutou², J.C. Moreau², M. Chavance³, J.J. Candelier¹, J.Y. Picard¹

1 INSERM U 782, Univ Paris XI, Clamart. 2 Hôpital Le Dantec, Dakar, Sénégal. 3 INSERM U472, Villejuif.

Les môles hydatiformes complètes (CMH), caractérisées par l'absence d'embryon et la dégénérescence villose totale du placenta, sont d'origine androgénique.

L'incidence des CMH en Europe occidentale et Amérique du Nord est approximativement d'un cas pour 2500 naissances. Il est très supérieur dans de nombreux « Pays du Sud » (1/400 par exemple au Sénégal), où l'évolution fréquente des CMH en choriocarcinomes représente un réel problème de santé publique. L'incidence « occidentale » correspond vraisemblablement au taux « basal » dû aux déficiences chroniques du système gamétogenèse-fécondation dans l'espèce humaine. L'excès des conceptions molaires des « Pays du Sud » peut être attribué à des facteurs exogènes, immunologiques ou/et alimentaires, tels que des carences. Le Sénégal, où il existe une variation cyclique importante du nombre des conceptions humaines en fonction des saisons et des périodes des travaux agraires, constitue un modèle attractif pour étudier le rôle de ces facteurs alimentaires.

La courbe annuelle des conceptions des grossesses molaires est parfaitement parallèle à celle des conceptions normales. Par contre, celle des conceptions des futures « mères de môle » est décalée par rapport aux deux autres, et montre que la vie embryonnaire et fœtale d'une majorité de ces femmes, donc leur gamétogenèse, s'est déroulée pendant la période la plus défavorable qui correspond à la soudure alimentaire avant les récoltes. Au contraire, une minorité ont effectué leur gamétogenèse durant les périodes fastes suivant les récoltes.

Ces études indiquent, que d'éventuels facteurs alimentaires sont impliqués dans la genèse des CMH en Afrique de l'Ouest. Ils n'interviendraient pas primitivement au moment de l'ovulation et de la fécondation mais pendant la période fœtale de la gamétogenèse de la future patiente.

Coullin P. Des andro/parténogénètes humains (môles hydatiformes et tératomes ovariens) au cancer. *Gyn. Obst. Fert.*, 2005, 33 : 469-482.

Session 2 : GAMETOGENESE

ROUSSEAUX Sophie (oratrice invitée)

sophie.rousseau@ujf-grenoble.fr

INSERM U823, Equipe 6, Univ. Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, 38706 La Tronche Cedex

Les acteurs de la ré-organisation post-méiotique du génome mâle

Lors de leur maturation, les cellules mâles germinales, ou spermatides, subissent une réorganisation structurale globale majeure de leur génome, associée au remplacement de la plupart des histones par les protamines, aboutissant à une forte compaction de l'ADN dans le spermatozoïde. Malgré l'importance fondamentale de ce phénomène, les mécanismes moléculaires impliqués sont encore méconnus.

Avant leur remplacement, les histones sont globalement acétylées dans les spermatides en élongation. Nous avons montré que cette acétylation joue le rôle de signal pour le recrutement de facteurs réorganisant et compactant la chromatine acétylée. L'un de ces facteurs, BRDT, contient deux bromodomains liant les histones acétylées, et possède la propriété unique de compacter spécifiquement la chromatine acétylée. Un polymorphisme modifiant un acide aminé localisé dans le premier bromodomaine de la protéine a été identifié à l'état homozygote chez plusieurs hommes infertiles et perturbe la fonction de la protéine. D'autres acteurs de la réorganisation post-méiotique du gamète mâle pourraient être impliqués dans l'infertilité masculine.

Govin J. et al., *J. Cell. Biol.*, 2007, 176 : 283-294.

Faure A.K. et al., *Mol. Hum. Reprod.*, 2003, 9 : 757-763.

Govin J. et al. J., *Biol. Chem.*, 2006, 281 : 37888-37892.

Caron C. et al., *EMBO Rep* 4 : 877-882.

Pivot-Pajot C. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 2003, 23 : 5354-5365.

Hazzouri M. et al., *Eur. J. Cell. Biol.*, 2000, 79 : 950-960.

MORENO Stéphanie

stephanie.moreno@cea.fr

UMR Gamétogenèse et Génotoxicité, INSERM U566 / CEA / Univ. Paris 7 et 11- Fontenay-aux-Roses

La lignée germinale mâle fœtale

B. Petre-Lazar, H. Coffigny, G. Livera, M. Attali, R. Habert et S.G. Moreno

Le testicule est un organe très sensible aux rayonnements ionisants. Chez le fœtus, la lignée germinale, lorsqu'elle est en période d'arrêt mitotique, est environ dix fois plus radiosensible que chez l'adulte en terme de mortalité cellulaire. Le but de notre travail est d'étudier le développement des gonocytes testiculaires en liaison avec leur radiosensibilité (1). Nous nous sommes focalisés sur deux voies majeures impliquées dans le contrôle du cycle et de l'apoptose : la voie p53 et la voie du TGFβ.

Concernant la famille p53, nous avons montré que seule la protéine p63 est exprimée dans le noyau des cellules germinales (appelées gonocytes). L'utilisation de souris KO a révélé que p63 est impliquée dans l'apoptose naturelle des gonocytes (2), mais qu'elle n'est pas nécessaire à leur apoptose radio-induite (3).

Concernant la voie TGFβ, nous avons montré par immunohistochimie que les isoformes 2 et 3, ainsi que les récepteurs de type I et II, sont exprimés dans les gonocytes.

En raison de la létalité précoce des souris KO pour le récepteur de type II du TGFβ ou pour p63, nous avons entrepris de créer des souris invalidées spécifiquement dans la lignée germinale, en utilisant le système Cre-lox. Nous pourrions ainsi analyser le rôle physiologique de ces deux voies dans le contrôle du développement de la lignée germinale.

1. Moreno S.G. et al., *Biol. Reprod.*, 2001, 64 : 1422-1431.
2. Petre-Lazar B. et al., *J. Cell. Physiol.*, 2007, 210 : 87-98.
3. Petre-Lazar B. et al., *Int. J. Radiation Biol.*, 2006, 82 : 771-780.

BERNARDINO-SGHERRI Jacqueline

jacqueline.bernardino@cea.fr

UMR Gamétogenèse et Génotoxicité, INSERM U566 / CEA / Univ. Paris 7 et 11 – Fontenay aux roses

La lignée germinale néonatale mâle

A. Forand, P. Fouchet, J.B. Lahaye, S. Messiaen, R. Habert et J. Bernardino-Sgheri

Des données récentes montrent une dégradation de la production spermatique humaine dans les pays industrialisés. Ces anomalies seraient en partie la conséquence d'une altération de la différenciation des gonocytes au cours de la vie fœtale ou postnatale sous l'effet de facteurs environnementaux parmi lesquels on ne peut exclure l'exposition à des rayonnements ionisants de source médicale.

Les cellules germinales néonatales murines sont très peu étudiées par rapport à celles de l'adulte. C'est pourtant au cours de cette période que les gonocytes, quiescents en fin de vie fœtale, reprennent leur cycle cellulaire et se différencient en spermatogonies. Si la radiosensibilité des cellules germinales décroît fortement après la naissance en terme de mort cellulaire, elle semble être augmentée en terme d'induction de mutations transmissibles à la génération suivante. Nous avons donc cherché à établir les paramètres biologiques pouvant expliquer ces résultats.

Nous avons montré que les gonocytes néonataux sont plus sensibles à l'irradiation que les spermatogonies néonatales en terme de taux de cassures double brins et d'apoptose. Nous étudions maintenant les mécanismes impliqués dans l'apoptose radio-induite de ces cellules.

HESTERS Laëtitia

laetitia.hesters@abc.aphp.fr

Hôpital A. Béclère, APHP/ Unité INSERM U782/ Univ. Paris 11 - Clamart.

Etude de la maturation nucléaire ovocytaire *in vitro* par analyse chromosomique du 1er globule polaire

L. Hesters1, G. Tachdjian1, M. Filali1, S. Brisset1, S. Ganieux1, R. Fanchin2, R. Frydman2, N. Frydman1

1Histologie-Embryologie-Cytogénétique, Hôpital A. Béclère, APHP, INSERM U782, Univ. Paris Sud, Clamart)

2Gynécologie Obstétrique Médecine de la Reproduction. Hôpital A. Béclère, APHP, INSERM U782, Univ. Paris Sud, Clamart

La maturation *in vitro* (MIV) est une technique récente d'Assistance Médicale à la Procréation, proposée aux patientes présentant un syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) et permettant d'obtenir des ovocytes matures en absence de stimulation hormonale. Cependant, les taux de grossesse et d'enfants nés après MIV restent inférieurs à ceux des cycles stimulés. Il a par

ailleurs été observé dans notre expérience une qualité embryonnaire diminuée et une incidence plus élevée de fausses couches.

In vivo, la maturation ovocytaire se produit parallèlement à la croissance folliculaire avec d'une part l'augmentation de taille du cytoplasme et d'autre part l'acquisition de la compétence méiotique. La qualité de cette maturation peut donc être appréciée sur des critères cytoplasmique ou nucléaire.

Dans cette étude, la maturation ovocytaire nucléaire *in vitro* a été réalisée par l'analyse chromosomique du 1er globule polaire (1er GP) par hybridation *in situ* fluorescente spécifiques des chromosomes 13, 16, 18, 21 et 22.

Huit patientes ont été incluses dans cette étude. Les résultats ont montré un taux d'analyse chromosomique de 69% (41/59) et un taux d'aneuploidie de 76% (31/41). Concernant le type d'anomalies chromosomiques, les non-disjonctions ont été plus fréquemment observées que les séparations prématurées des chromatides sœurs (55% *versus* 19%).

Cette étude a mis en évidence un taux d'aneuploidie élevé suggérant de potentiels effets délétères de la MIV ou de la pathologie SOPK sur la maturation nucléaire. Afin de répondre à ces questions, l'étude va être étendue à des patientes SOPK en cycle stimulé. En effet seule une étude comparative avec des ovocytes maturés *in vivo* permettra de distinguer les deux hypothèses.

PESTY Arlette

arlette.pesty@cea.fr

UMR Gamétogenèse et Génotoxicité, INSERM U566 / CEA / Univ. Paris 7 et 11 – Fontenay aux roses

Evolution de la localisation PLC- β 1 dans les ovocytes au cours de la folliculogénèse *in vitro* chez la souris

A. Pesty 1, O. Broca 2, C. Poirot 2, B. Lefèvre 1

1 UMR Gamétogenèse et Génotoxicité, INSERM U566 / CEA / Univ. Paris 7 – Fontenay aux roses ;

2 UFR Biologie de la Reproduction, groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Université Paris 6, Paris.

La cryopréservation de tissu ovarien est de plus en plus souvent proposée aux patientes souffrant d'un cancer, avant qu'elles ne subissent leur traitement stérilisant afin de leur laisser une chance d'avoir des enfants ultérieurement. En effet, le cortex ovarien est la source unique d'ovocytes à partir duquel, après décongélation, il est possible de mettre en culture des follicules préantraux au sein desquels les ovocytes peuvent se développer, acquérir leur compétence méiotique et devenir fécondables. Actuellement, cette stratégie demeure cependant un défi puisque seules deux équipes ont à ce jour rapporté la naissance de souriceaux après une telle pratique. Aucun index biochimique ou métabolique n'a été étudié dans les ovocytes pour attester de leur qualité au cours du développement intra folliculaire *in vitro*.

Lors de culture *in vitro* de follicules préantraux prélevés sur souris pré-pubères de 12 jours (1), nous avons étudié la localisation de la PLC- β 1, enzyme ayant un rôle important lors de la maturation finale de l'ovocyte de souris. Nous avons observé que sa localisation était corrélée à l'évolution du diamètre des ovocytes, de la configuration de la chromatine (2) et la mise en place de la signalisation calcique (3). D'abord concentrée dans le noyau des ovocytes à chromatine diffuse entre J-1 et J-6 de culture, elle

se répartit ensuite dans tout l'ovocyte à J-9 où la conformation de la chromatine est intermédiaire. Enfin, à J-12 de culture, la PLC- β 1 est exclusivement dans le cytoplasme et la chromatine condensée autour du nucléole.

L'ensemble de ces données démontre que le protocole de culture utilisé produit des ovocytes avec des caractéristiques semblables aux ovocytes ayant effectué leur maturation *in vivo* (4) et qu'il est prometteur d'envisager la culture expérimentale des follicules ovariens.

(1) Cortvriendt, Smits and Van Steireghem, Hum. Reprod., 1996, 11 : 2656-2666.

(2) Miyara F. et al., Mol. Hum. Reprod., 2003, 64 : 458-470.

(3) Pesty A. et al., Mol. Hum. Reprod., 2007, 13 : 3-9.

(4) Lefèvre B. et al., Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr., 2007, 17 : 259-269.

Session 3 : PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET PHYSIQUES

LEVACHER Christine

christine.levacher@cea.fr

UMR Gamétogenèse et Génotoxicité, INSERM U566 / CEA / Univ. Paris 7 et 11 – Fontenay aux roses

Oestrogènes et testicule foetal

G. Delbès, C. Duquenne, J. Lassarguère, C. Racine, G. Livera, B. Jégou, R. Habert et C. Levacher

Alors que les perturbateurs endocriniens, et particulièrement les xéno-oestrogènes, exercent des effets délétères sur le testicule pendant la vie foetale et néonatale, le rôle joué par les oestrogènes eux-mêmes sur le développement précoce du testicule est mal connu.

Nous avons montré, par des études *in vitro* chez le rat, que les oestrogènes exogènes (DES et E2) inhibent la différenciation des cellules de Leydig en début de vie foetale en diminuant leur nombre et leur activité stéroïdienne (1). En fin de vie foetale, une inhibition endogène par les oestrogènes, due une activité aromatasase importante, empêche une inhibition exogène supplémentaire (2). Les oestrogènes ont un effet délétère sur les cellules germinales pendant la première phase proliférative foetale en augmentant leur apoptose (1) mais ne modifient pas le nombre de ces cellules pendant la période néonatale (2).

L'étude du développement testiculaire chez des souris KO pour les récepteurs des oestrogènes (ER) a permis de montrer une augmentation du nombre de gonocytes 2 jours après la naissance chez les souris ER α KO, en raison d'une diminution de l'apoptose (3). Par ailleurs, l'activité stéroïdienne est plus élevée chez les souris ER α KO, tout au long de la vie foetale et néonatale et s'accompagne d'un accroissement de la transcription des enzymes de la stéroïdogenèse (4).

Les oestrogènes sont donc susceptibles d'agir directement et à concentration physiologique sur le testicule foetal et néonatal. Ils exercent un effet négatif sur le nombre de cellules germinales via ER β et sur la stéroïdogenèse via ER α . Il existe des fenêtres temporelles de sensibilité qui pourraient être différentes selon les espèces.

(1) Lassarguère et al., Toxicol. Sci., 2003, 73 : 160-169.

(2) Delbès et al. Toxicol., Sci., 2007, 9 : 234-243.

(3) Delbès et al., Endocrinology, 2004, 145 : 3395-4303.

(4) Delbès et al., Endocrinology, 2005, 146 : 2454-2461.

Androgènes et testicule foetal

J. Merlet, E. Moreau, S. Moreno, R. Habert et C. Racine

Des études épidémiologiques, cliniques et expérimentales ont mis en évidence des effets délétères des perturbateurs endocriniens à activité anti-androgénique sur les fonctions de reproduction masculines. Ces altérations trouveraient leur origine pendant la vie fœtale. Or, le rôle physiologique des androgènes sur le développement du testicule foetal est peu documenté. Pour étudier cette question, nous avons utilisé un modèle de souris Tf_m (*Testicular Feminized*) déficientes pour le récepteur des androgènes.

Nous avons montré que l'absence de fonctionnalité du récepteur des androgènes n'a pas d'effet sur le développement des cellules de Leydig tandis qu'elle induit un retard de différenciation des cellules périvitubulaires myoïdes. Ce défaut de différenciation pourrait, par un mécanisme paracrine, expliquer l'effet stimulateur des androgènes sur la prolifération des cellules de Sertoli que nous avons observé en fin de vie fœtale (1). De façon surprenante, ce travail a également démontré un effet inhibiteur des androgènes sur la prolifération des gonocytes au début du développement testiculaire (2). Enfin, nous avons clairement identifié les gonocytes comme étant des cellules cibles directes des androgènes en mettant en évidence un récepteur aux androgènes fonctionnel dans ce type cellulaire (2).

Ce travail est important pour la compréhension des altérations de la reproduction induites par les perturbateurs endocriniens. Il a permis d'identifier une nouvelle voie potentielle d'action des androgènes dans les gonocytes pouvant être impliquée dans les modifications épigénétiques des cellules germinales observées suite à un traitement par un anti-androgène (3).

1. Merlet et al., Cell. Cycle, 2007.
2. Merlet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, 104 : 3615-3620.
3. Anway et al., Science, 2005, 308 : 1466-1469.

ROUILLER-FABRE Virginie
virginie.rouiller-fabre@cea.fr

UMR Gamétogenèse et Génotoxicité, INSERM U566 / CEA /
Univ. Paris 7 et 11 – Fontenay aux roses

Ontogenèse et régulations des fonctions testiculaires chez le fœtus humain

R. Lambrot, H. Coffigny, C. Pairault, R. Frydman, R. Habert et V. Rouiller-Fabre

Afin d'étudier l'ontogenèse des deux fonctions testiculaires pendant la vie fœtale chez l'Homme et leur régulations, nous avons établi une collaboration avec le Service de Gynécologie Obstétrique de l'Hôpital Béclière.

Les testicules sont prélevés sur des fœtus humains âgés de 7 à 12 semaines issus d'Interruption Volontaire de Grossesse (IVG). Le premier objectif de notre travail a été de mettre au point les outils d'analyse du développement et de la fonctionnalité du testicule foetal humain. Dans un second temps, nous avons adapté le système de culture organotypique en milieu dépourvu

d'hormones et de facteurs de croissance que nous avons mis au point initialement chez le rat (1).

Nous avons montré que, dans ce modèle, le testicule foetal conserve son organisation. En ce qui concerne la gamétogenèse, pour les stades les plus jeunes, le nombre de cellules germinales est conservé ou augmenté au cours de la culture. En revanche, pour des stades un peu plus âgés (au-delà de 7 semaines) ce nombre décroît au cours de la culture. Pour la stéroïdogénèse, après une première période d'augmentation de la sécrétion de testostérone pour les stades les plus précoces, l'addition de LH devient indispensable pour conserver un profil proche de celui observé *in vivo* (2).

L'approche *in vitro* étant bien sûr la seule approche expérimentale possible chez l'Homme, nous disposons désormais d'un modèle particulièrement intéressant pour étudier les régulateurs et perturbateurs potentiels des fonctions testiculaires.

1. Habert R. et al., Molec. cell. Endocrinol., 1991, 82 : 199-206.
2. Lambrot R. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 2006, 91 : 2696-2703.

COFFIGNY Hervé

herve.coffigny@cea.fr

UMR Gamétogenèse et Génotoxicité, INSERM U566 / CEA /
Univ. Paris 7 et 11 – Fontenay aux roses

Effets des rayonnements ionisants sur le testicule fœtal humain

R. Lambrot, V. Rouiller-Fabre, C. Pairault, C. Lecureuil, R. Frydman, R. Habert et H. Coffigny

Le testicule est l'un des organes les plus radiosensibles. Les rayonnements ionisants induisent un stress génotoxique et les effets ont été décrits chez l'homme adulte et chez le rat et la souris aux stades fœtal et néonatal (1).

En utilisant le modèle de culture organotypique, nous avons observé que les cellules germinales (CG) sont très sensibles à l'irradiation puisque leur nombre diminue fortement après exposition aux rayonnements gamma. L'effet est dose dépendant à partir de 0,1 Gy et il résulte d'une augmentation de l'apoptose. La forme phosphorylée de p53 est détectée dans tous les types cellulaires du testicule dès 1 heure après l'irradiation et l'ajout d'un inhibiteur spécifique de p53, la pifithrine alpha, entraîne une diminution significative de l'apoptose radio-induite dans les CG. L'irradiation induit une augmentation de l'apoptose et un arrêt de la prolifération des cellules de Sertoli. Cependant, la diminution du nombre de cellules de Sertoli est plus faible que celles des cellules germinales. Enfin, la stéroïdogénèse n'est pas modifiée par l'irradiation (maintien de la production de testostérone et de l'expression des enzymes stéroïdogènes) (2).

En conclusion, le résultat majeur de notre étude est sans conteste la très forte radiosensibilité des CG fœtales mâles humaines. Une dose de 0,1 Gy qui détruit 40% des CG représente environ 30 fois la dose moyenne totale à laquelle un Français est exposé chaque année, et la femme enceinte peut connaître une augmentation de ce taux dans le cadre d'examen radiologiques pendant sa grossesse.

1. Moreno et al., Int. J. Radiat. Biol., 2001, 77 : 529-538.
2. Lambrot et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 2007, 92 : 2632-2639.

ARNAULT Emilie
emilie.arnault@cea.fr

UMR Gamétogenèse et Génotoxicité, INSERM U566 / CEA /
Univ. Paris 7 et 11 – Fontenay aux roses

L'uranium naturel perturbe sensiblement l'atrésie folliculaire *in vivo* et la méiose ovocytaire *in vitro* chez la souris.

E. Arnault, M. Doussau, A. Pesty, B. Gouget, A. Van Der Meeren, P. Fouchet et B. Lefèvre

L'intoxication aux métaux lourds induit des dysfonctionnements ovariens susceptibles d'entraîner une hypofertilité voire une ménopause précoce, consécutives à la perte de la réserve ovocytaire. Dans cette étude, nous avons analysé chez la souris les effets de l'uranium naturel sur la folliculogenèse *in vivo* ainsi que sur la méiose et la dégénérescence de l'ovocyte isolé en culture.

Des femelles ont été intoxiquées pendant 15 semaines avec 5, 50 ou 400 mg/l de nitrate d'uranyle dans leur eau de boisson. Leurs ovaires ont ensuite été prélevés et traités pour analyse histologique. La population des follicules primordiaux ainsi que le nombre total de follicules en croissance n'a été affecté par aucune des doses d'uranium utilisées. Cependant, l'intoxication par l'uranium a perturbé la croissance folliculaire et a augmenté significativement le processus d'atrésie.

Dans un deuxième temps, les effets de l'uranium ont été étudiés sur des ovocytes matures isolés et cultivés pendant 72 h. La présence de 424 mg/l d'uranium dans leur milieu de culture a entraîné un ralentissement de la cinétique de la méiose *in vitro* et a diminué de façon significative le nombre d'ovocytes ayant atteint le stade de métaphase II. Par contre, aucune augmentation de la fragmentation ovocytaire n'a été observée en présence d'uranium.

En conclusion, l'uranium naturel, même à faible dose, perturbe sensiblement la folliculogenèse et la méiose chez la souris, et représente par conséquent un risque potentiel pour la fertilité féminine.

Session 4 : CELLULES SOUCHES

TACHDJIAN Gérard
gerard.tachdjian@abc.aphp.fr

INSERM U 782, 32 rue des Carnets, 92140 Clamart

Les cellules souches embryonnaires humaines, modèle d'étude des pathologies génétiques.

G. Tachdjian¹, O. Féraud², N. Frydman¹, C. Bas¹,
R. Frydman³, A. Bénaceur²

¹Histologie Embryologie Cytogénétique, Inserm U782, Hôpital Antoine Béclère, Clamart, ²Inserm U602, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, ³Gynécologie Obstétrique, Inserm U782, Hôpital Antoine Béclère, Clamart.

Les cellules souches embryonnaires sont des cellules dites pluripotentes puisqu'elles ont la capacité de produire les trois feuillettes embryonnaires et les tissus et organes qui en dérivent. Extraits de la masse cellulaire interne, ces cellules souches embryonnaires peuvent être dérivées sous forme de lignées permanentes qui conservent *in vitro* leur caractère pluripotent et

un génome similaire aux cellules souches embryonnaires primaires. La capacité de prolifération quasi illimitée à l'identique (autorenouvellement) permet l'accumulation d'un grand nombre de cellules souches embryonnaires.

La création de nouvelles lignées de cellules souches embryonnaires humaines, à partir d'embryons surnuméraires obtenus dans le cadre d'assistance médicale à la procréation avec absence de projet parental et consentement éclairé après information sur les possibilités d'accueil d'embryons et d'arrêt de cryoconservation et donnés par le couple à la recherche, est possible en France conformément à la loi de Bioéthique du 6 août 2004. Les cellules souches embryonnaires porteuses d'anomalies génétiques peuvent constituer des modèles d'étude physiopathologique de maladies génétiques héréditaires ou somatiques.

Nous décrivons l'exemple de la dérivation de la première lignée française de cellules souches embryonnaires humaines réalisée à partir d'un embryon atteint d'un déséquilibre chromosomique détecté au cours d'un diagnostic génétique préimplantatoire (autorisation de l'Agence de la Biomédecine du 20 septembre 2006). Cette lignée de cellules souches embryonnaires exprime les marqueurs cellulaires embryonnaires et la pluripotence a été testée *in vitro* (corps embryoides) et *in vivo* (tératome). Cette lignée de cellules souches embryonnaires humaine porteuse d'une translocation chromosomique déséquilibrée cryptique peut être utilisée comme modèle *in vitro* de pathologies chromosomiques pour l'étude des anomalies du développement et de la reproduction humain ou en cancérologie.

LIVERA Gabriel
gabriel.livera@cea.fr

UMR Gamétogenèse et Génotoxicité, INSERM U566 / CEA /
Univ. Paris 7 et 11 – Fontenay aux roses

Orientation mâle ou femelle de la lignée germinale : Initiation de la méiose ou arrêt mitotique des cellules germinales murines.

E. Trautmann, M.J. Guerquin, C. Duquenne, R. Habert et G. Livera

Pendant la vie fœtale, la méiose débute uniquement dans les cellules germinales (CG) femelles alors qu'au même moment les CG mâles entrent en quiescence. Récemment l'acide rétinolique, le dérivé biologiquement actif de la vitamine A, a été décrit comme un acteur majeur de la transition mitose/méiose. Celui-ci est dégradé spécifiquement dans le testicule fœtal.

Nous avons étudié le rôle de cette dégradation sur la prolifération et la différenciation des CG mâles. En utilisant le modèle de culture organotypique (1), nous avons confirmé qu'un excès d'acide rétinolique induit la méiose dans des gonades XY explantées à 11,5 jours post-conception (jpc) (2) et découvert que celui-ci n'a plus cet effet à partir de 13,5 jpc (3). L'utilisation de la culture à 13,5 jpc nous a permis de démontrer que l'acide rétinolique maintient les CG mâles dans un état prolifératif alors qu'elles rentrent en quiescence dans le milieu témoin à l'instar de l'évolution observée *in vivo*. Cet effet dépend de l'activation de la PI3K. L'inhibition de Cyp26, l'enzyme qui dégrade l'acide rétinolique dans le testicule, induit les mêmes effets. Les CG traitées à l'acide rétinolique qui n'entrent pas en arrêt mitotique n'expriment pas non plus les marqueurs associés à la différenciation mâle normale tels que p63gamma ou l'hyperméthylation du génome. Enfin, que l'acide rétinolique initie (11,5 jpc) ou non (13,5 jpc) la méiose, celui-ci induit l'apoptose

des cellules germinales.

En conclusion, la réduction des taux d'acide rétinoïque dans le testicule fœtal est nécessaire pour prévenir non seulement l'initiation de la méiose mais aussi pour induire l'arrêt mitotique et la différenciation mâle normale des CG fœtales.

1. Livera et al., Cell Tissue Res., 2006, 324 : 507-521.
2. Koubova et al., PNAS, 2006, 103 : 2474-2479.
3. Trautmann et al., Cell. Cycle, *en révision*.

Session 5 : HORMONE ANTI-MULLERIENNE (AMH)

FANCHIN Renato

renato.fanchin@abc.aphp.fr

U 782 Inserm - Hôpital Antoine Béchère - 92140 CLAMART

Anti-Müllerian hormone: insights into a peculiar marker of the ovarian follicular status

R. Fanchin, J. Taieb, D. Mendez, J. Scheffer, A. Dzik, N. Frydman, R. Frydman

Our presentation will essentially focus on our clinical research on the role of Anti-Müllerian hormone as a marker of the ovarian functioning. AMH, a glycoprotein that is exclusively produced by the granulosa cells of ovarian follicles in the adult female (Vigier et al., 1984), is new and maybe unique biomarker of the ovarian follicular status. Indeed, in contrast with inhibin B and E₂, AMH is produced, presumably FSH-independently (Bath et al., 2003 ; Eldar-Geva et al., 2005), in a wide range of follicles that goes from the primary to the early antral stages of folliculogenesis (Baarends et al., 1995 ; Durlinger et al., 2002b ; Weenen et al., 2004), and with little susceptibility to disorders of antral follicle growth during the luteal-follicular transition. We will address the fact that the relationship between antral follicle counts and serum AMH levels is stronger than that observed with FSH, inhibin B and E₂ on day 3 (Fanchin et al., 2003a), and that intercycle reproducibility of AMH measurements is better than the latter parameters (Fanchin et al., 2005a). Also, it will provide data indicating that peripheral AMH levels decline during controlled ovarian hyperstimulation (COH), thus confirming that maturing follicles lose progressively their ability to produce AMH (Fanchin et al., 2003b), and data illustrating that follicular fluid (FF) AMH concentrations in small antral follicles are 3-fold as high AMH as in preovulatory follicles (Fanchin et al., 2005b). Further, we will show that hCG-driven luteinization additionally curtails follicular AMH production (Fanchin et al., 2005c). Finally, AMH production measured in FF from individual follicles is increased in women having normal follicular counts and responsiveness to COH (Fanchin et al., 2005b).

Together, these data reinforce the soundness of AMH measurements as a quantitative and maybe qualitative marker of granulosa cell activity and health. In addition, unpublished data on the striking relationship between FF AMH production and the quality of the ensuing oocyte/embryo as well as on the profile of serum AMH levels during the menstrual cycle will be presented and discussed.

DI CLEMENTE Nathalie

nathalie.diclemente@u-psud.fr

Unité INSERM 782, 32 rue des Carnets, 92140 Clamart

Etude structure/fonction du récepteur de type II de l'AMH

C. Belville, J.D. Maréchal, J. Gonzales, J.Y. Picard, N. Josso, R.L. Cate, N. di Clemente

Le syndrome de persistance des canaux de Müller (PMDS) est un cas de pseudo hermaphrodisme masculin caractérisé par la persistance d'utérus et de trompes chez des individus par ailleurs normalement virilisés. Ces patients se divisent en deux groupes en fonction de leur taux sérique d'AMH avant la puberté: des patients dont le taux d'AMH est effondré, et des patients dont le taux d'AMH est normal. De nombreuses mutations des gènes de l'AMH et de son récepteur de type II ont été découvertes chez ces patients depuis une vingtaine d'année (Josso et al., 2006). Nous avons réalisé récemment une étude structure/fonction du récepteur de type II de l'AMH à partir de 10 mutations, après mutagenèse dirigée de l'ADNc du récepteur normal pour les reproduire.

Contrairement aux autres récepteurs de la famille du TGFβ, les récepteurs de l'AMH tronqués dont il reste tout ou une partie du domaine extracellulaire ne sont pas détectés dans le milieu de culture de cellules COS transfectées avec leur ADNc. Des expériences de traduction *in vitro*, de pulse/chase, de microscopie confocale et de traitement des cellules transfectées avec un inhibiteur du protéasome, la lactacystine, nous ont permis de montrer que cela était dû à leur instabilité. Concernant les récepteurs mutés au niveau du domaine intracellulaire, aucun d'entre eux n'est capable de médier l'activation par l'AMH d'un gène rapporteur spécifique d'un effecteur de l'AMH, Smad1, dans les cellules P19 comme le fait le récepteur normal, à l'exception de la mutation d'une glycine en valine en position 142 qui diminue légèrement la capacité du récepteur à activer Smad1. Une modélisation des domaines extracellulaire et cytoplasmique du récepteur est en cours pour expliquer ces résultats.

Josso N., Picard J.Y., Rey R., di Clemente N., Ped. Endocrinol. Rev., 2006, 3 : 347-358.

TAIEB Joëlle

joelle.taieb@abc.aphp.fr

INSERM U 782 Endocrinologie et Génétique de la Reproduction et du Développement, 32 rue des Carnets, 92140 Clamart

Régulation de l'AMH par les gonadotrophines (LH et FSH) dans les cellules de la granulosa

J. Taieb, C. Belville, R. Rey, R. Fanchin, J.Y. Picard, R. Frydman, N. di Clemente

Nous avons mis au point un modèle cellulaire permettant l'étude de la régulation de l'AMH humaine. Nous avons sélectionné une lignée murine de cellules de la granulosa (KK1) exprimant l'ARNm de l'AMH et permettant de réaliser des études en gène rapporteur placé sous le contrôle du promoteur de l'AMH.

Ainsi, après la transfection des cellules KK1 par un ADNc de 3068 pb correspondant à la région 5' flanquante du gène de l'AMH humaine couplée au gène luc (qui code pour la luciférase), l'étude de la réponse à la stimulation des cellules pendant 48h par l'AMPc (qui régule positivement l'AMH) ou le TNFα (qui régule négativement l'AMH) nous a permis de valider notre modèle.

La co-transfection des gènes codant pour les récepteurs aux

gonadotrophines humaines (LH et FSH) nous a permis d'étudier la régulation de l'AMH par les gonadotrophines humaines recombinantes utilisées seules ou en association. Nous avons ainsi montré que la FSH et la LH régulent positivement l'expression de l'AMH et que l'association des deux gonadotrophines a un effet agoniste sur cette régulation.

Une réponse du même type, mais légèrement inférieure, a été obtenue en transfectant la lignée avec des ADNc de 2198, 423 et 202 pb correspondant à la région 5' flanquante du gène de l'AMH humaine couplée au gène luc.

Des études de mutagenèse dirigée devraient nous permettre de mettre en évidence le ou les facteurs de transcription qui participent à ces régulations (SF1, SOX9, GATA4, NFalphaB, AP2).

Par ailleurs, ce modèle cellulaire nous permettra d'aborder l'étude de la régulation de l'AMH par d'autres molécules comme les stéroïdes (estradiol, progestérone, testostérone, DHT, etc...) ou les facteurs de croissance (IGF, GDF9, BMP, etc...).

Session 6 : IMPLANTATION NORMALE ET PATHOLOGIQUE

CHAOUAT Gérard

gerard_chaouat@wanadoo.fr

Equipe implantation et dialogue cytokinique mère-conceptus INSERM U782 / Univ. Paris 11 et Hôpital Antoine Bécclère 92141 Clamart.

Nouvelles cytokines à l'interface materno-foetal : 1. Etudes fondamentales chez la souris

*G. Chaouat, M. Petitbarat, A. E. Mas, S. Dubanchet,
S. Fay et N. Lédée*

Le succès de la gestation dépend d'un équilibre discret entre cytokines pouvant provoquer un rejet et celles indispensables à la gestation. Ces dernières années, nous avons montré que les cellules NKs utérines et deux cytokines, l'interleukine 12 et l'interleukine 18, étaient au cœur de ce processus en contrôlant l'angiogenèse locale.

Dans la mesure où tant l'absence qu'un excès de ces deux cytokines sont anti-implantatoires, et comme l'utérus préimplantatoire comporte une grande quantité de TNF, nous nous sommes attachés à l'étude de trois « immunorégulateurs des régulateurs » potentiels, les interleukines 23, 27 et le TWEAK (*soluble TNF receptor WEAK inducer of apoptosis*). Les résultats obtenus par Immunohistochimie, RT-PCR, et neutralisation *in vivo* confirment le rôle de ces cytokines, et portent l'emphase sur l'embryon lui-même autant que l'utérus.

Nous replacerons ces résultats en perspectives des dérégulations du complément que nous sommes en train d'étudier comme impliquées dans les déficits d'implantation.

LÉDÉE Nathalie

ledeenathalie@aol.com

Equipe implantation et dialogue cytokinique mère-conceptus INSERM U782 / Univ. Paris 11 et Hôpital Antoine Bécclère 92141 Clamart.

Nouvelles cytokines à l'interface materno-foetal : 2. Vers des applications cliniques

N. Lédée, M. Petitbarat, S. Dubanchet, G. Chaouat

L'implantation embryonnaire apparaît comme un conflit immunitaire nécessaire et autocontrôlé. S'appuyant sur une connaissance fondamentale principalement élaborée en modèle murin (voir résumé précédent), nous mettons en évidence un dialogue pré-conceptionnel, pré-ovulatoire conditionnant le potentiel implantatoire du futur embryon en utilisant une technique d'Elisa en multiplex explorant parallèlement 27 chemokines/cytokines et facteurs de croissances.

Au niveau du milieu endoluminal utérin, en phase pré-implantatoire, en utilisant la même méthode de détection protéique, on note la présence de protéines directement impliquées dans le recrutement de cellules immunocompétentes et dans l'angiogenèse locale indispensable pour le processus implantatoire. Ces données suggèrent une anticipation majeure de la préparation maternelle à l'implantation, ce qui laisse présager de multiples applications cliniques rapides.

Dans cet optique de dialogue continu, la place de l'influence du liquide séminal en temps qu'acteur de la préparation utérine à l'implantation est une perspective complémentaire importante. L'ensemble de ces données sont en cours de soumission et ne sont donc pas encore publiées.

Par ailleurs, nous montrerons que l'étude de l'endomètre en fenêtre implantatoire chez des patientes en échecs de FIV/ICSI *versus* contrôles fertiles, permet d'identifier des dérégulations précisément dans le domaine de l'immunorégulation locale.

Lédée N., Chaouat G., Lombroso R. et al., *J. Reprod. Immunol.* (sous presse).

Lédée N., Dubanchet S., Lombroso R., Ville Y., Chaouat G., *J. Reprod. Immunol.*, 2006, 56 : 119-123.

Lédée-Bataille N., Dubanchet S., Bonnet-chea K. et al., *Fertil. Steril.*, 2005, 83 : 598-605.
