

Diagnostic Préimplantatoire (DPI) et Mucoviscidose



DR SCHMITT- 16 OCTOBRE 2014
SERVICE GÉNÉTIQUE MÉDICALE

Le DPI en France



- **4 centres autorisés (ABM):** Paris, Strasbourg, Montpellier et Nantes
- **Agréments nominatifs pour 5 ans (ABM):** prélèvement cellulaire sur l'embryon obtenu par FIV, analyse de cytogénétique y compris moléculaire sur la ou les cellules embryonnaires, analyses de génétique moléculaire sur la ou les cellules embryonnaires.
- **Objectif d'activité:** 250 cycles par an et par centre
- **Indications:**
 - Anomalies chromosomiques (38% demandes en 2011)
 - Maladies monogéniques (58% demandes en 2011)
 - Détermination de sexe pour pathologies liée au chromosome X
 - DPI - HLA

Réglementation



- **Loi 94-654 du 27 juillet 1994**

« Forte probabilité de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic »

- **Loi n°2004-800 du 6 août 2004**

Donne compétence à l'Agence de la biomédecine pour délivrer les autorisations d'extension du diagnostic préimplantatoire dans un but thérapeutique à titre expérimental (L. 2131-4-1 du Code de la santé publique).

Extension du DPI (DPI-HLA)

- **Loi de Bioéthique modifiée du 7 Juillet 2011**

Parcours et prise en charge des couples au CHU de Nantes



- 1. Constitution du dossier de DPI**
2. Staff DPI, Staff CPDPN
3. Mise au point technique
4. Consultation pluridisciplinaire
5. Programmation du DPI

1. Constitution du dossier



- coordonnées du couple
- courrier médicaux, arbre généalogique
- résultats des analyses génétiques
- caryotypes parentaux
- bilan AMP (AMH, CFA)

Secrétariat DPI: sonia.blon@chu-nantes.fr

Tél.: 02 40 08 33 97

Parcours et prise en charge des couples au CHU de Nantes



1. Constitution du dossier de DPI
2. **Staff DPI, Staff CPDPN**
3. Mise au point technique
4. Consultation pluridisciplinaire
5. Programmation du DPI

2. Staff DPI, CPDPN



- **Composition**: généticiens, biologistes, gynécologues,...
- **Objectif**: valider, après étude du dossier, le principe du DPI pour la maladie susceptible d' être transmise
- Exemple de la mucoviscidose : étude des mutations familiales (mutations CF, large spectre, CFTR-RD..?)

Parcours et prise en charge des couples au CHU de Nantes



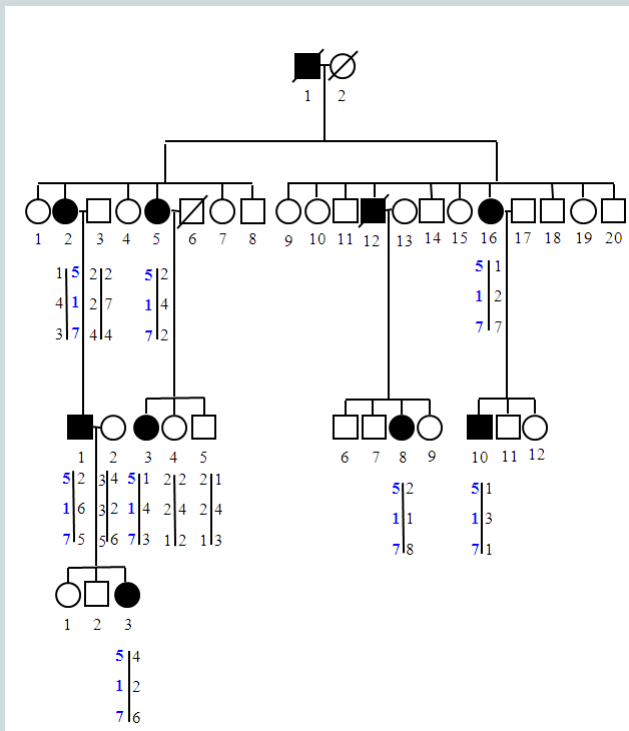
1. Constitution du dossier de DPI
2. Staff DPI, Staff CPDPN
3. **Mise au point technique**
4. Consultation pluridisciplinaire
5. Programmation du DPI

3. Mise au point technique exemple de la Mucoviscidose



Principe des techniques:

1 - Analyse indirecte par haplotypage

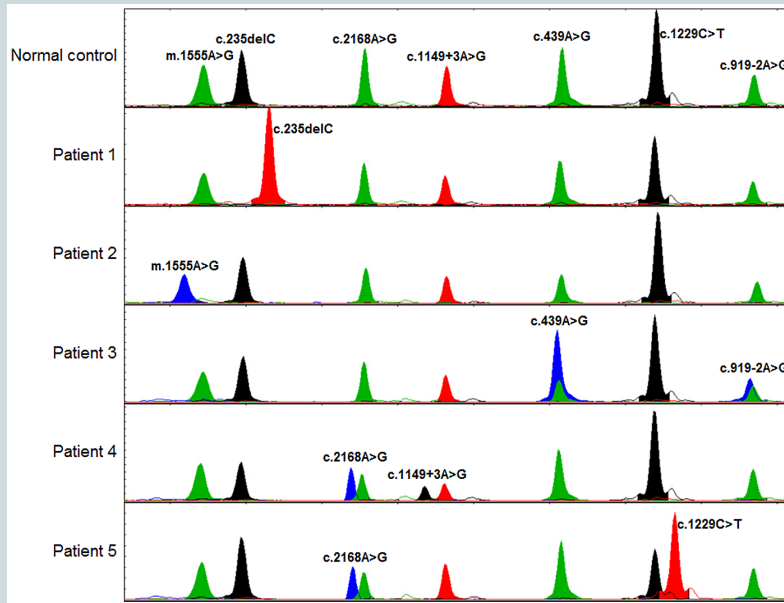


3. Mise au point technique exemple de la Mucoviscidose



Principe des techniques:

2 - Analyse directe par PCR mini-séquençage (Snap Shot)

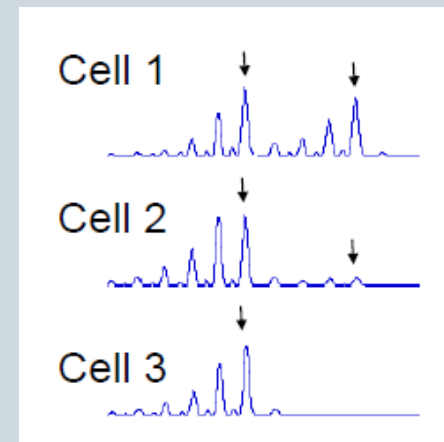
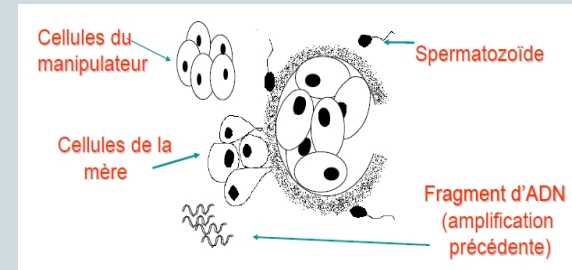


3. Mise au point technique exemple de la Mucoviscidose



Difficultés liées au DPI

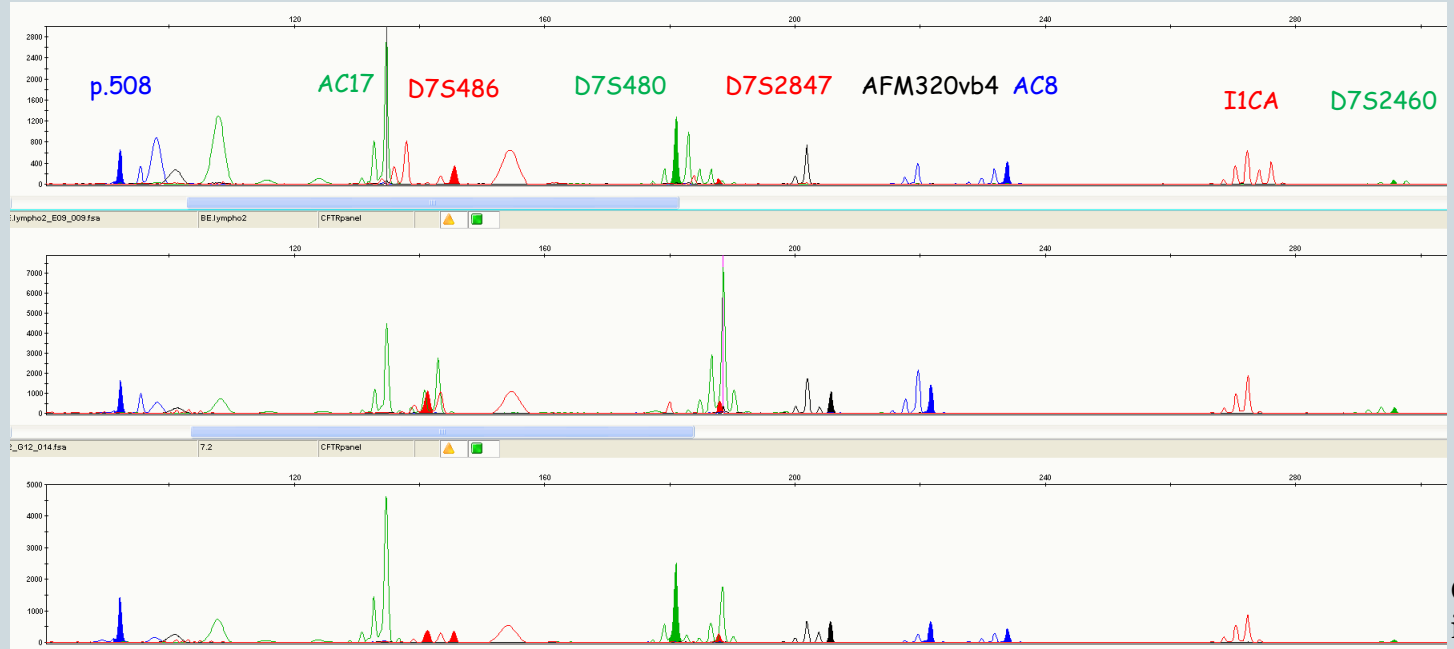
- 1- Diagnostic à partir d'une cellule
- 2- Éviter les contaminations
- 3- Diagnostic mis au point pour chaque famille
 - Importance de l'informativité
 - Mutations différentes
- 4- Risque d'Allele Drop-Out (ADO)



3. Mise au point technique exemple de la Mucoviscidose



cen	D7S486
	D7S2460
CFTR	I1CA
	AC8
	p.508
	AC17
tel	AFM320vb5
	D7S2847
	D7S480



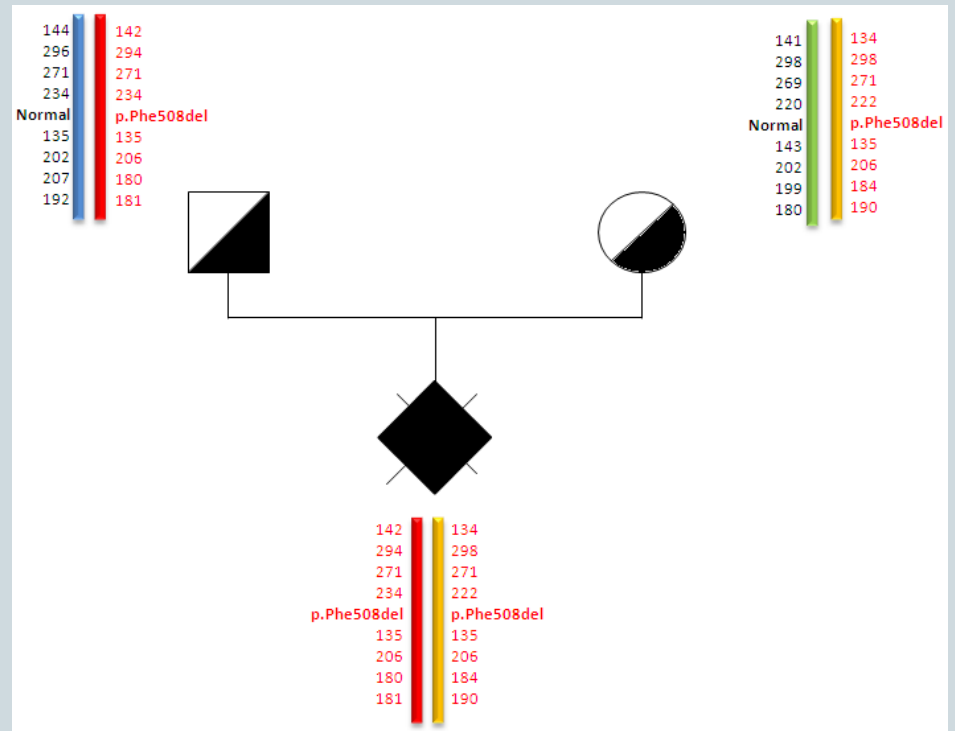
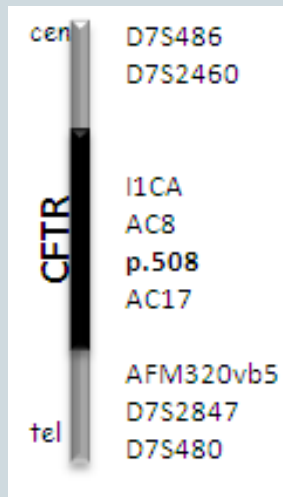
père

mère

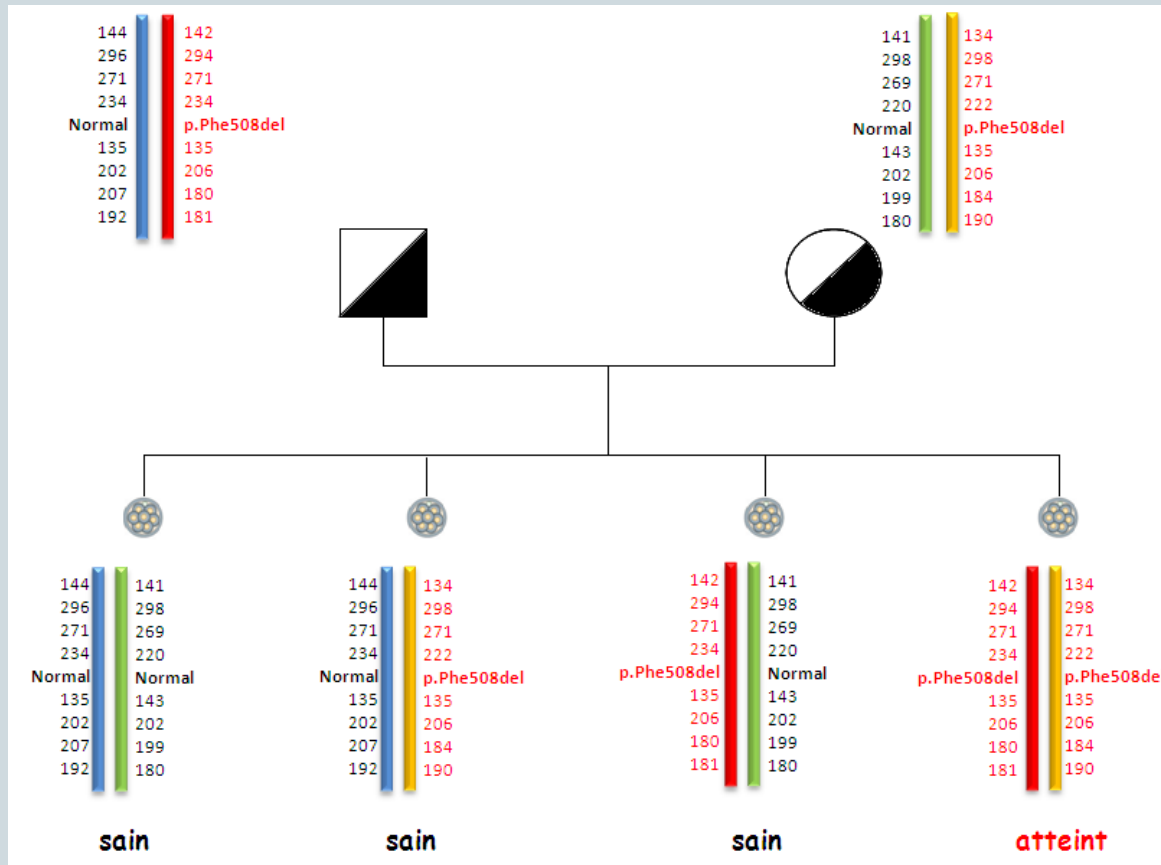
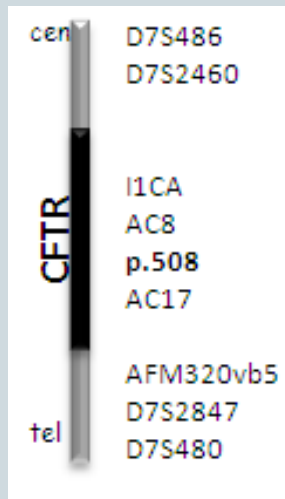
Cas index

3. Mise au point technique exemple de la Mucoviscidose

- ✓ Confirmation du statut des parents et/ou du cas index
- ✓ Réalisation des haplotypes sur ADN génomique
- ✓ Validation de l'informativité des marqueurs



3. Mise au point technique exemple de la Mucoviscidose

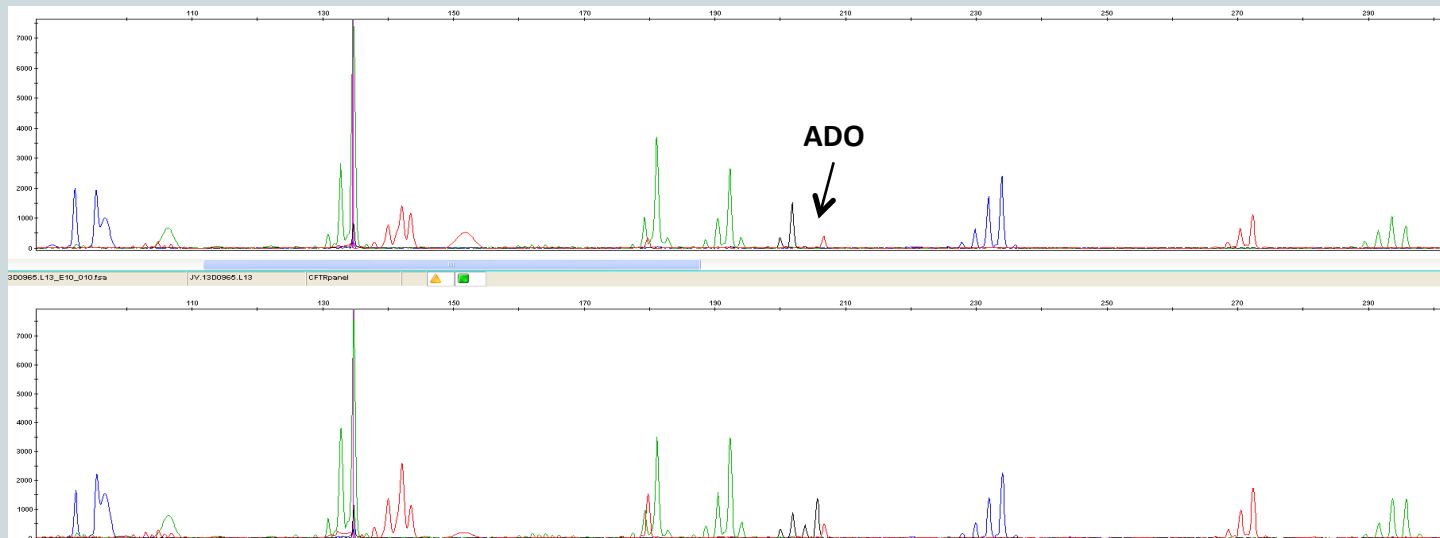


3. Mise au point technique exemple de la Mucoviscidose



Validation de la PCR sur cellule unique (lymphocytes) Recommandations ESHRE,PGDIS

- Au moins 50 cellules uniques en plusieurs séries (10-20 cellules/série)
- Taux d'amplification > 90%
- Taux d'ADO < 10%
- Taux de contamination < 5%



3. Mise au point technique exemple de la Mucoviscidose



	Mr			Mme			TOTAL			
	nbr lymphos	ADO	abs ampli	nbr lymphos	ADO	abs ampli	ADO		abs ampli	
p.508	26	0	0	26	0	0	0	0,00%	0	0,00%
AC17	26	homoz	0	26	2	0	2	7,69%	0	0,00%
D7S486	26	0	0	26	3	0	3	5,77%	0	0,00%
D7S480	26	2	0	26	homoz	1	2	7,69%	1	1,92%
AC8	26	0	0	26	4	0	4	7,69%	0	0,00%
I1CA	26	0	0	26	homoz	0	0	0,00%	0	0,00%
D7S2460	26	1	0	26	3	0	4	7,69%	0	0,00%
AFM320vb5	26	homoz	0	26	1	0	1	3,85%	0	0,00%
D7S2847	26	3	2	26	2	1	5	9,62%	3	5,77%

nbr BLANC	12	nbr BLANC contaminé	0
-----------	----	---------------------	---

0,00%

VALIDATION DE LA FAISABILITE TECHNIQUE



Parcours et prise en charge des couples au CHU de Nantes



1. Constitution du dossier de DPI
2. Staff DPI, Staff CPDPN
3. Mise au point technique
4. **Consultation pluridisciplinaire**
5. Programmation du DPI

4. Consultation Pluridisciplinaire



- **Objectifs:**

- expliquer au couple le déroulement des différentes phases de la FIV et du diagnostic génétique
- expliquer les différents résultats susceptibles d'être obtenus et leurs conséquences sur le déroulement du DPI
- Consentement préalable à signer par le couple

- **En pratique:**

- 1 journée au CHU de Nantes
- Consultations programmées avec un généticien, gynécologue, biologiste, anesthésiste, psychologue, sage-femme

Parcours et prise en charge des couples au CHU de Nantes



1. Constitution du dossier de DPI
2. Staff DPI, Staff CPDPN
3. Mise au point technique
4. Consultation pluridisciplinaire
5. **Programmation du DPI**

5. Programmation du DPI

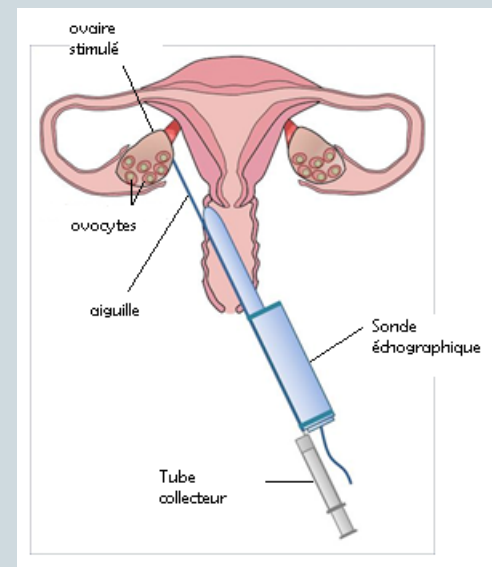
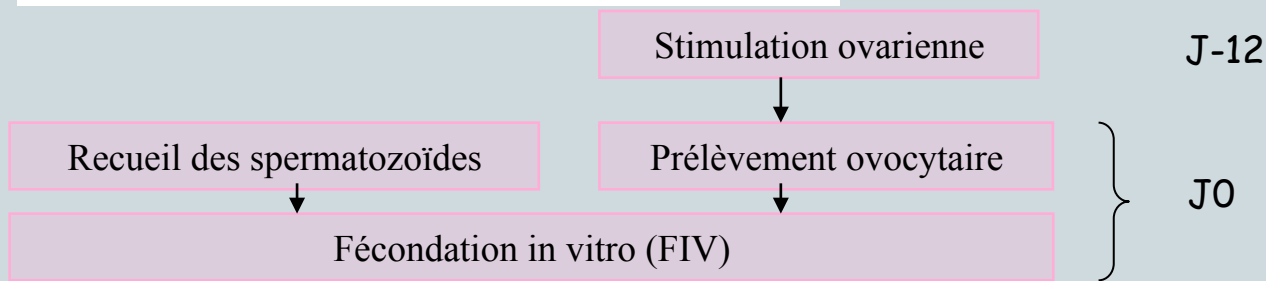
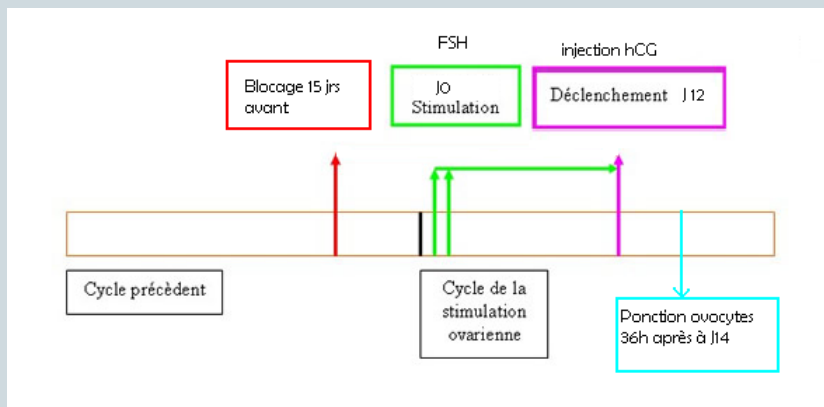
exemple de la Mucoviscidose



Pré-DPI: environ 1 mois avant la programmation

- ✓ PCR sur cellule unique (lymphocytes des parents)
- Validation du mix d'oligos (réservé pour le DPI)
- Validation du kit PCR (réservé pour le DPI)
- Validation des thermocycleurs

5. Programmation du DPI exemple de la Mucoviscidose



Ovocyte et cellules du cumulus

5. Programmation du DPI de l' ICSI à la biopsie



Zygote :



Embryon à 4 blastomères



Embryon au stade de morula



FIV avec ICSI

16 à 20 h

J1 =24 h

J2 =45 h

72 h = **J 3**

96 h = J 4

J 5



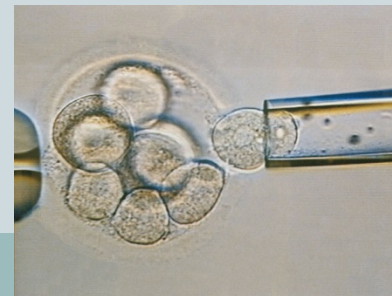
Embryon à 2 blastomères



Embryon à 8 blastomères



Blastocyste



Biopsie blastomère(s)

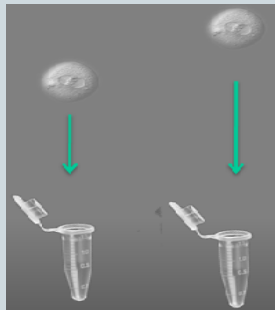
5. Programmation du DPI exemple de la Mucoviscidose

J3



Biopsie

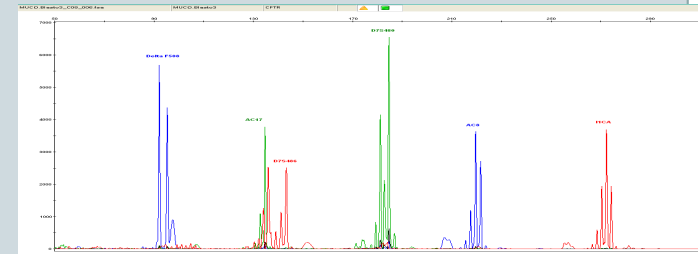
Tubage



PCR multiplexe $\approx 4h$

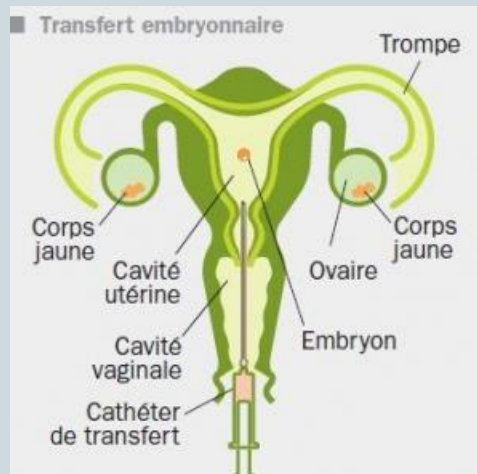


J4



5. Programmation du DPI exemple de la Mucoviscidose

- Transfert des embryons sains (J4 ou J5)



- Prise de sang: β HCG à J11
- Suivi normal de la grossesse, diagnostic prénatal (DPN) éventuel

6. Ré-analyse



- ✓ à J4, après transfert +/- congélation des embryons sains
- ✓ PCR sur embryons complets (ou dissociés selon besoin)
- ✓ Confirmation du statut des embryons atteints

Bilan DPI CHU Nantes

Juin 2013-Octobre 2014



Nombre de femmes ponctionnées	60 (cyto +mol)
Nombre de grossesses cliniques	7
Nombre d'accouchements	3

Bilan DPI Mucoviscidose

Juin 2013-Octobre 2014



Nombre de couples à risque de mucoviscidose étudiés	7
Nombre de DPI effectués	12
Nombre de transferts	13 10 frais +3 TEC
Nombre de grossesses biochimiques	7
Nombre de grossesses cliniques	4 (dont une GEU)
Nombre de grossesses en cours	2
Nombre d'accouchement	1

Génotypes étudiés: 5 F508del/F508del, 1 F508del/c.1585-1G>A, 1 F508del/c.2600_2601ins A

Coordonnateur du centre: Pr Cédric Le Caignec

Secrétariat: Mme Sonia Blon

**Service de médecine et biologie du développement
et de la reproduction:**

Pr Paul Barrière
Dr Thomas Fréour
Dr Sophie Mirallié
Dr Carole Springart

ingénieur:

Jenna Lammers

gynécologues référents:

Dr Florence Leperlier
Dr Julien Bancquart

sage femme référente:

Sylvie Charon

psychologue:

Coralie Gonin

Service de génétique médicale:

DPI moléculaire:

Pr Cédric Le Caignec
Dr Sébastien Schmitt
Dr Gaelle Thierry

ingénieur:

Sophie Pedronno

technicien:

Amélie Rocher-Monnier

DPI cytogénétique:

Pr Cédric Le Caignec
Dr Claire Bénéteau
Dr Kamran Moradkhani

Ingénieur:

Anne-Laure Bauduin

technicien:

Aurélien Gauteul