



HAL
open science

Diagnostic préimplantatoire et mutation FMR1 : quelles sont les chances d'obtenir un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures

Méryl Sadoun

► To cite this version:

Méryl Sadoun. Diagnostic préimplantatoire et mutation FMR1 : quelles sont les chances d'obtenir un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-03199379

HAL Id: dumas-03199379

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03199379>

Submitted on 15 Apr 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2019

N°175

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE
DOCTEUR EN MÉDECINE

Diagnostic préimplantatoire et mutation FMR1 :
quelles sont les chances d'obtenir un embryon sain
en fonction du nombre d'ovocytes matures

Présentée et soutenue publiquement
le 2 Octobre 2019

Par

Méryl SADOUN

Née le 16 mai 1989 à Paris

Dirigée par Le Docteur Charlotte Sonigo, MCU

Jury :

M. Le Professeur Michaël Grynberg, PU-PH Président

Mme. Le Professeur Nelly Frydman, PU-PH

Mme. Le Professeur Julie Steffann, PU-PH

Mme. Le Docteur Charlotte Sonigo, MCU

Mme. Le Docteur Anne Mayeur, PH

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur Michaël Grynberg,

Vous me faites l'honneur d'être le Président de mon jury de thèse. Je vous remercie de m'aider à passer cette étape importante dans ma carrière. Merci pour vos enseignements, votre accessibilité et votre sympathie qui vous rendent si unique.

À Madame le Docteur Charlotte Sonigo,

Merci pour ton encadrement, ta disponibilité sans faille et ta gentillesse. Merci pour ton énergie débordante et toute la motivation que tu m'as transmise. C'est un bonheur d'avoir eu la chance de travailler avec toi.

À Madame le Professeur Nelly Frydman,

Merci de m'avoir appris tant de choses sur la biologie de la reproduction et le DPI, univers mystérieux pour moi avant mon arrivée à Bécélère. Tu es une source d'inspiration par ta passion.

À Madame le Professeur Julie Steffann,

Merci d'avoir pris le temps de juger mon travail et de me faire l'honneur d'être dans mon jury de thèse.

À Madame le Docteur Anne Mayeur,

Merci pour tous tes conseils, ton aide et ta gentillesse. Merci de faire partie de mon jury de thèse.

TABLE DES MATIERES

I/ ABREVIATIONS	6
II/ INTRODUCTION	7
III/ ETAT DES CONNAISSANCES	9
III-1 : X fragile, une maladie par expansion de triplets	9
III-1-a : Gène FMR1 et expansion de triplets	11
III-1-b : Transmission de la mutation ou pré-mutation	12
III-1-c : Phénotype des patients et patientes porteurs d'une pré-mutation FMR1	16
III-1- d : Phénotype des patients porteurs d'une mutation complète du gène FMR1	16
III-2 : Diagnostic préimplantatoire et diagnostic prénatal pour anomalie du gène FMR1	18
III-2-a : Diagnostic prénatal	18
III-2-b : Histoire et technique du diagnostic préimplantatoire en France	20
III-2-c : Spécificité du DPI pour anomalies du gène FMR1.....	22
III-3 : Préservation de fertilité	26
III-3-a : Cadre légal de la préservation de fertilité en France	26
III-3-b : Techniques de préservation de fertilité féminine	27
III-3-c Indication de préservation de fertilité en France	29
III-3-d : Cas particulier de la préservation de fertilité pour baisse de la réserve ovarienne.....	30
IV/ OBJECTIFS DE L'ETUDE	32
V/ MATERIEL ET METHODE	34
V-1 : Population de l'étude	34
V-1-a : Patientes présentant une anomalie du gène FMR1 ayant bénéficié d'une stimulation de l'ovulation pour DPI	34
V-1-b : Patientes présentant une anomalie du gène FMR1 ayant bénéficié d'une stimulation de l'ovulation pour préservation de fertilité	35
V-1-c : Groupes contrôles	36
V-2 : Protocoles de stimulation ovarienne	36
V-2-a : Stimulation ovarienne	36
V-2-b : Déclenchement de l'ovulation et ponction ovocytaire	38
V-3 : Technique de DPI	38
V-4 : Paramètres étudiés	39
V-5 : Statistiques	39
V-5-a : Analyses des populations et de la réponse à la stimulation	39
V-5-b : Probabilité d'obtenir un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures obtenus	40

VI/ RESULTATS :	41
VI-1 : Population étudiée	41
VI-2 : Réponse à la stimulation	42
<i>VI-2-a : Prise en charge en DPI</i>	43
<i>VI-2-b : Prise en charge en préservation de fertilité</i>	43
VI-3 : Probabilité d'obtenir un embryon sain en DPI en fonction du nombre d'ovocytes matures recueillis	44
<i>VI-3-a : Etude globale</i>	44
<i>VI-3-b : Probabilité selon l'âge : patientes de plus ou de moins de 35ans</i>	46
VII- DISCUSSION	48
VIII- CONCLUSION	54
IX- REFERENCES	56
X- ABSTRACT	62
XI- RESUME	63

ABREVIATIONS

ADO	Allele Drop Out
AMH	Anti Müllerian Hormone ou Hormone antiimüllérienne
ARNm	ARN messagers
DPI	Diagnostic Préimplantatoire
DPN	Diagnostic pré natal
<i>FMR1</i>	Fragile X Mental Retardation 1 gene
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
FISH	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
FIV	Fécondation <i>In Vitro</i>
FORT	Follicular Output RaTe
FSH	Follicule Stimulating Hormone
FXS	Syndrome de l'X fragile
FXPOI	Fragile X Associated Primary Ovarian Insufficiency
FXTAS	Fragile X Associated Tremor / Ataxia Syndrom
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
ICSI	Intra-Cytoplasmic Sperm Injection
IMG	Interruption Médicale de Grossesse
IOP	Insuffisance Ovarienne Précoce
LH	Luteinizing Hormone
MDA	Multiple Displacement Amplification
PCR	Polymerase Chain Reaction
QI	Quotient intellectuel

INTRODUCTION

Le syndrome de l'X fragile, première cause de retard mental chez le garçon, est une maladie liée à une expansion de triplets CGG du gène *FMR1*. Les patients peuvent être porteurs d'une pré-mutation ou d'une mutation complète du gène selon le nombre d'expansion de triplets CGG : une pré-mutation est caractérisée par un allongement comprenant de 59 à 200 copies du triplet CGG, et une mutation complète par une expansion supérieure à 200 copies, pouvant aller jusqu'à 1000 répétitions. La mutation complète entraîne un syndrome de l'X fragile dont la symptomatologie varie en fonction du sexe de l'enfant, pouvant notamment entraîner un handicap mental sévère, surtout chez le garçon.

Les femmes porteuses d'une pré-mutation ou d'une mutation complète du gène *FMR1* présentent un risque de transmission de l'anomalie génétique à leur descendance. Cette transmission s'accompagne fréquemment d'une augmentation de l'expansion de triplets qui peut faire basculer le chromosome X porteur d'un statut de pré-mutation à une mutation complète. Les enfants de ces patientes peuvent alors être porteurs soit d'une pré-mutation soit d'une mutation complète. Ainsi, les femmes porteuses d'une pré-mutation ou d'une mutation complète du gène *FMR1* peuvent avoir recours, si elles le souhaitent, à un diagnostic prénatal pour connaître la taille de l'expansion des triplets CGG du gène *FMR1* du fœtus.

Depuis plusieurs années, un diagnostic génétique préimplantatoire (DPI) peut être également proposé pour les patientes porteuses d'une mutation complète ou d'une pré-mutation du gène *FMR1*. L'objectif du DPI est d'éviter la transmission de cette maladie potentiellement sévère à la descendance, sans avoir recours à une interruption médicale de grossesse.

Par ailleurs, les patientes porteuses d'une pré-mutation du gène *FMR1* sont à risque de développer une insuffisance ovarienne précoce (IOP). Depuis la loi de bioéthique de 2011, il est possible de proposer à ces jeunes femmes une autoconservation d'ovocytes matures. Les ovocytes cryoconservés pourront ensuite être utilisés pour l'obtention d'une grossesse, en passant, ou non, par une tentative de DPI. Cependant, le nombre optimal d'ovocytes matures à cryoconserver pour permettre l'obtention d'une grossesse n'est pas connu et représente un enjeu majeur.

Le principal objectif de ce travail est de tenter de déterminer les chances d'obtenir au moins un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures obtenus. Ceci permettrait de conseiller au mieux les patientes candidates à une cryoconservation ovocytaire et qui souhaiteraient un DPI au moment de la réutilisation de leurs ovocytes.

Après un rappel sur le syndrome de l'X fragile, la mutation du gène *FMR1*, les principales étapes du DPI et de la préservation de la fertilité, nous exposerons les objectifs, les populations étudiées, les méthodes ainsi que les résultats de cette étude rétrospective. Enfin nous analyserons l'impact de ces données dans l'information et l'orientation de nos patientes suivies en DPI ou en préservation de la fertilité dans le cadre d'une anomalie du gène *FMR1*.

ETAT DES CONNAISSANCES

III-1 : X fragile, une maladie par expansion de triplets

III-1-a : Gène *FMR1* et expansion de triplets

Initialement nommé syndrome de Martin Bell, le syndrome de l'X fragile est identifié pour la première fois en 1943 comme une forme de retard mental et de troubles du comportement dont la transmission serait liée à l'X (1). Décrit par Lubs en 1969, le syndrome X fragile se manifeste par une altération des fonctions cognitives supérieures, allant de simples difficultés d'apprentissage à un retard mental sévère (2). Ce syndrome est responsable de déficit intellectuel chez un sujet masculin sur 4000, mais peut également atteindre les femmes avec une sévérité moindre et une fréquence d'environ 1 sur 7000.

La découverte de l'anomalie génétique en 1991 (3) a permis la compréhension de ce mode de transmission inhabituel pour une pathologie liée à l'X en mettant en évidence un nouveau type de mutation jusqu'alors jamais décrit : il s'agit d'une mutation instable se caractérisant par des séquences répétitives de triplets CGG dans la partie non codante du gène. Le gène de l'X fragile, appelé *FMR1* (Fragile Mental Retardation), se situe sur le chromosome X au locus FRAXA, en Xq27.3 (4). Il est composé de 17 exons. L'expansion de triplets se situe au niveau du premier exon. Chez le sujet sain, la séquence répétitive existe sous forme de polymorphisme et comporte une moyenne de 29 CGG (de 6 à 49) (5).

La mutation s'exprime en 2 temps : une pré-mutation caractérisée par un allongement comprenant de 59 à 200 copies du triplet CGG, et une mutation complète caractérisée par une expansion supérieure à 200 copies, pouvant aller jusqu'à 1000 répétitions et entraînant un phénotype X fragile de déficience intellectuelle, surtout chez le garçon. La mutation

complète entraîne une méthylation de l'îlot CpG (région promotrice du gène) à l'origine d'une abolition en 3' de la transcription du gène et donc d'une absence de la protéine FMRP. Cette méthylation anormale est à la base de la technique diagnostique. Entre 50 et 59 copies, il s'agit d'une zone dite « intermédiaire » pour laquelle une instabilité est possible lors de la transmission mais une transition en mutation complète n'a jamais été rapportée.

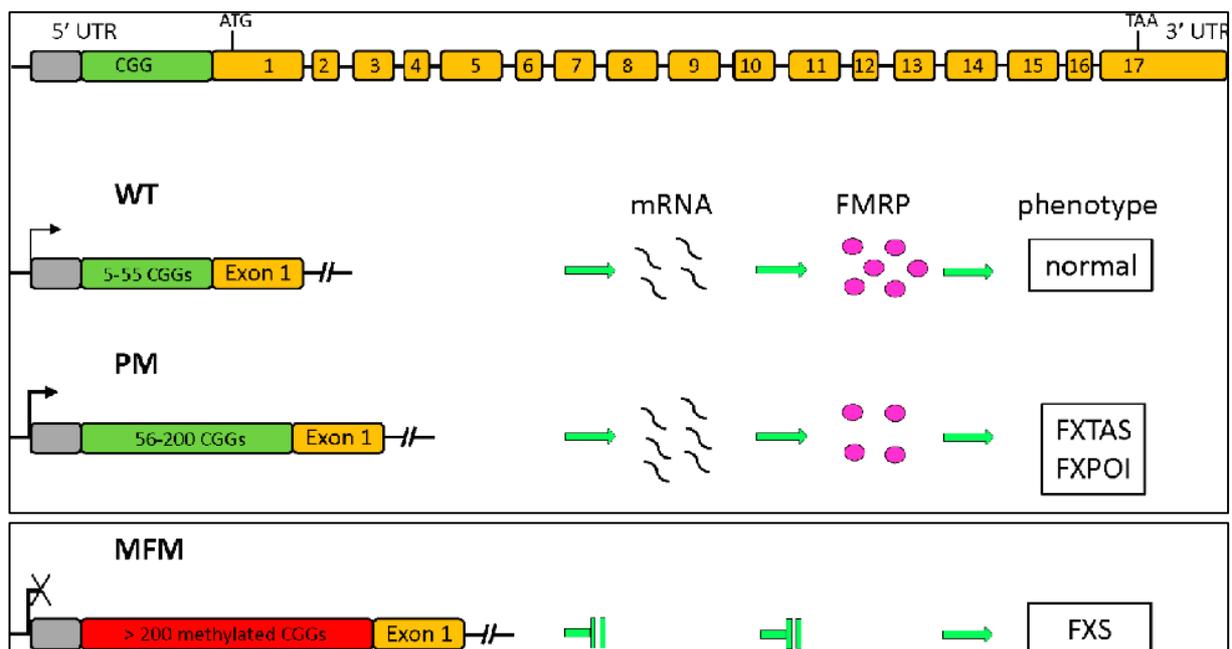


Figure 1 : Structure du gène *FMR1* et de ses différentes formes alléliques.

Le gène *FMR1* code pour une protéine RNA-binding appelée Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP). L'ARN messager (ARNm) correspondant à un transcrit de 4,4 kb, est présent dans la plupart des tissus avec une expression maximale dans le cerveau et le testicule. La protéine FMRP est sans homologie structurale avec les protéines cytoplasmiques connues. Elle est présente chez l'homme non muté en cas de pré-mutation, et absente en cas de mutation complète.

Le syndrome de l’X fragile est expliqué par un mécanisme moléculaire d’amplification de triplets. Le phénotype clinique des patients porteurs d’une anomalie du gène *FMR1* diffère en fonction du type d’anomalie (mutation complète ou pré-mutation) et du sexe.

III-1-b : Transmission de la mutation ou pré-mutation

Le syndrome de l’X fragile (FXS) est une maladie dominante dite liée au chromosome X, à pénétrance incomplète chez les filles. Les garçons et les filles peuvent être touchés : les hommes transmettent leur chromosome X altéré à toutes leurs filles mais à aucun de leur garçon et une femme porteuse de l’anomalie génétique a un risque sur deux de la transmettre à son enfant indépendamment du sexe de ce dernier.

Dans le cas où un homme atteint du FXS a un enfant de sexe féminin, bien qu’il lui transmette obligatoirement son gène altéré, celle-ci n’est pas pour autant atteinte du FXS. En effet, la mutation complète ne se maintient pas au cours du processus de formation des spermatozoïdes. Un homme muté ne transmet jamais la mutation complète car ses spermatozoïdes sont uniquement porteurs de l’allèle pré-muté (6). En effet, il semblerait que l’expansion de la pré-mutation en mutation complète n’a pas lieu pendant la méiose mais pendant le stade post-zygotique.

Le nombre de répétitions de triplets CGG du gène *FMR1* augmente uniquement lors de la transmission maternelle : les pré-mutations sont instables quand elles sont transmises par la mère. Les femmes porteuses d’une pré-mutation n’ont pas de retard mental en lien avec le FXS. Cependant, il y a un risque de transformation de la pré-mutation en mutation complète après quelques générations (7). Il existe une forte corrélation entre le nombre de répétitions

CGG de la femme porteuse et le risque de transformation en mutation complète chez la descendance (8).

Ainsi, 4 catégories d'allèles ont été définies par le Collège Américain de génétique médicale en fonctions du risque de transmission du syndrome de l'X fragile (9):

- allèles normaux (6 - 45 triplets) : la majorité de la population ayant environ 29 ou 30 triplets

- allèles intermédiaires (45 - 55 triplets) : l'expansion est susceptible d'augmenter de taille et peut aboutir à une mutation complète en au moins deux générations

- allèles pré-mutés (55 - 200 triplets) : une mutation complète peut être observée à la génération suivante

- allèles porteurs d'une mutation complète (> 200 triplets) : définis par la présence d'une méthylation des triplets CGG et des îlots CpG à proximité

III-1-c : Phénotype des patients et patientes porteurs d'une pré-mutation *FMR1*

La prévalence des porteurs de la pré-mutation est de 11,7/10000 hommes et 34,4/10000 femmes (11). Les pré-mutations sont notamment associées à un risque d'insuffisance ovarienne précoce (IOP) chez les femmes et au syndrome tremblement-ataxie lié à une pré-mutation de l'X fragile (FXTAS) chez les hommes.

Syndrome FXPOI : Insuffisance ovarienne (Fragile X associated Primary Ovarian Insufficiency)

Les patientes porteuses d'une pré-mutation du gène *FMR1* peuvent présenter une atteinte ovarienne variable pouvant aller d'une baisse de la réserve ovarienne à un épuisement total et précoce de la réserve ovarienne (RO) qu'on appelle une insuffisance ovarienne

prématurée (IOP)₍₁₂₎. Plusieurs paramètres cliniques et paracliniques permettent d'évaluer la fonction et la réserve ovarienne. Sur le plan clinique, on retrouve la régularité et la durée des cycles menstruels ou la présence de bouffée de chaleur par exemple. Des dosages hormonaux réalisés en début de cycle menstruel comme le dosage de la FSH permettent également d'évaluer le fonctionnement ovarien. Enfin, le dosage de l'hormone antimüllérienne (AMH) sérique et la réalisation d'une échographie vaginale pour évaluer le nombre de petits follicules antraux présents dans les ovaires sont considérés comme les meilleurs reflets de la réserve ovarienne.

Ainsi, Sullivan *et al* ont proposé une classification de l'atteinte ovarienne en fonction de sa sévérité (12) :

- « Overt POI » : femmes présentant des troubles du cycle allant jusqu'à l'aménorrhée associée à une FSH élevée et une infertilité. Le stade le plus avancé est une IOP définie par une aménorrhée de plus de 4 mois, un taux de FSH élevé chez une femme de moins de 40 ans.
- « Biochemical POI » : femmes présentant des cycles réguliers mais une FSH élevée et une hypofertilité
- « Occult POI » : femmes présentant des cycles réguliers avec une FSH normale mais une hypofertilité [\(13\)](#).

On estime que 4 à 6% des IOP isolées sont liées à une pré-mutation du gène *FMR1*. Cela peut aller jusqu'à 11% lorsqu'il existe une histoire familiale d'IOP [\(14\)](#).

Le risque d'IOP chez les patientes porteuses d'une pré-mutation est estimé entre 16 et 21% alors qu'il est de 1% dans la population générale et chez les patientes porteuses d'une

mutation complète (15). L'IOP survient chez environ 20% des femmes présentant une pré-mutation, ce qui rend le risque d'IOP dans cette population environ 20 fois supérieur à celui de la population en général (16) (17) (18). L'âge moyen de découverte d'un FXPOI est de 33 ans. (22).

Les femmes présentant une IOP réelle, quelle que soit l'étiologie, ont 4% à 8% de chance de concevoir naturellement, sans avoir recours à une technique d'aide médicale à la procréation (AMP), et ce même des années après le diagnostic (19) (20). Par ailleurs, il a été rapporté que 12,6% des femmes chez lesquelles un FXPOI avait été diagnostiqué avaient conçu spontanément après le diagnostic (21).

Aucune différence d'âge de la première ménarche n'a été mise en évidence entre des patientes pré-mutées et les contrôles sains (22).

Chez ces patientes, l'âge moyen de la ménopause est de 43,1 ans, et 35,2% des femmes porteuses d'une pré-mutation rapportent un arrêt des cycles menstruels avant l'âge de 40 ans donc un IOP, alors que seulement 18% avaient été diagnostiquées FXPOI (23).

La relation entre le nombre de triplet CGG et l'âge du dernier cycle menstruel n'est pas linéaire (14) (24) (25). Cependant, le nombre de répétitions est un des facteurs pouvant expliquer la différence de sévérité de l'atteinte ovarienne. En effet, il a été montré que le groupe le plus à risque de développer une IOP était celui des femmes ayant entre 80 et 100 CGG alors qu'après ce seuil il existe un plateau ou même une décroissance de ce risque après plus de 100 répétitions (25) (26) .

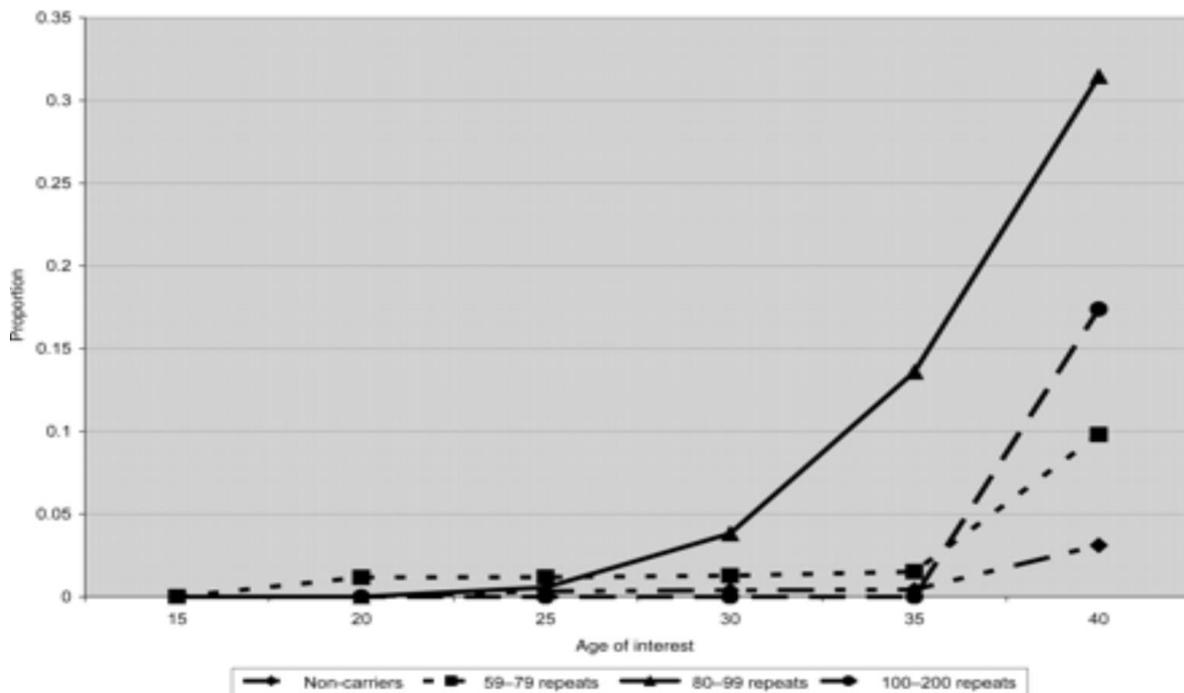


Figure 2: Proportion de femmes en insuffisance ovarienne précoce en fonction du nombre de répétitions de triplets dans l'exon 1 du gène *FMR1* chez 948 femmes (429 porteuses d'une pré-mutation du gène *FMR1* et 517 témoins) (27)

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la dysfonction ovarienne chez les patientes porteuses d'une pré-mutation du gène *FMR1* sont mal connus. D'après des modèles murins, il semblerait que la pré-mutation du gène *FMR1* n'impacterait pas la mise en place du pool des follicules primordiaux mais induirait un développement folliculaire anormal à l'origine d'une apoptose accrue (28). Une étude plus récente, toujours dans un modèle murin, suggère que la pré-mutation du gène *FMR1* serait à l'origine d'une anomalie mitochondriale pouvant être à l'origine de l'apoptose des follicules en croissance (31)

Syndrome FXTAS (Fragile X associated Tremor/Ataxia Syndrome) et autres manifestations liées à la pré-mutation

Le syndrome FXTAS est un syndrome neurodégénératif progressif apparaissant en général après 50 ans. Il touche environ 40% des hommes et 8% des femmes porteurs d'une pré-

mutation du gène *FMR1* (29). Un tremblement d'intention, une ataxie, une neuropathie, un déficit cognitif avec éventuellement une évolution vers la démence peuvent être observés (30) (31) (32). D'autres symptômes ont été observés chez les patients pré-mutés (avec une prévalence supérieure à la population générale) comme des troubles à type d'anxiété, de dépression et de troubles obsessionnels compulsifs (33) (34), ceux-ci pouvant apparaître dès l'enfance (35), une dysautonomie (avec une hypertension artérielle, une impuissance, une incontinence) et des pathologies auto-immunes (hypothyroïdie et sclérose en plaques) (36)

III-1- d : Phénotype des patients porteurs d'une mutation complète du gène *FMR1*

Prévalence

La prévalence de patients porteurs de la mutation complète est estimée à 1,4/10000 hommes et 0,9/10000 femmes (11). Le FXS est plus souvent diagnostiqué chez les garçons que chez les filles. Chez les filles, l'anomalie peut ne donner que de très faibles manifestations cliniques voire aucune car il peut se produire un phénomène de compensation. En effet, en cas de biais d'inactivation du chromosome X atteint, le chromosome X actif est sain et s'exprime majoritairement. C'est pourquoi, 100% des hommes porteurs de la mutation complète et 60% des femmes porteuses de la mutation complète présentent des symptômes cliniques.

Clinique

La triade clinique classique associe retard mental, dysmorphie faciale et macro-orchidie. Elle est observée chez 60% des hommes atteints. Mais les manifestations de la maladie sont peu spécifiques du FXS et d'un grand polymorphisme clinique. Dans l'enfance, les garçons ont un

retard des acquisitions motrices et/ou du langage. Chez tous les garçons et la moitié des filles, les troubles intellectuels s'associent à des troubles du comportement et/ou à des signes dysmorphiques. Otites et sinusites récidivantes et convulsions sont possibles. Le déficit intellectuel va de troubles mineurs de l'apprentissage avec quotient intellectuel (QI) normal, à un déficit sévère pouvant toucher la mémoire immédiate et de travail, les fonctions exécutives, les capacités visuo-spatiales et mathématiques. Les troubles du comportement peuvent être discrets (humeur instable) ou sévères, de type autisme (battements de mains, contact oculaire pauvre, évitement du regard, morsures de mains, défense tactile et désinhibition). Troubles de l'humeur, anxiété et agressivité sont possibles. Chez les filles, les troubles intellectuels et du comportement sont en général discrets, à type de troubles affectifs et de l'apprentissage. Dans les deux sexes, les signes physiques sont discrets : visage étroit et allongé, oreilles et front proéminents, hyperlaxité des doigts, pieds plats et macro-orchidie chez le garçon après la puberté [\(37\)](#).

Mécanismes moléculaires

La région de répétition des triplets ainsi qu'un îlot CpG situé à proximité sont méthylés chez les patients symptomatiques dont la mutation est complète ce qui entraîne une inactivation de la transcription du gène [\(38\)](#) [\(39\)](#) [\(40\)](#) [\(41\)](#). Ainsi les concentrations d'ARNm et des protéines FMRP sont faibles ou nulles. L'absence de protéine FMRP entraîne une dérégulation de la traduction en protéine des ARN avec lesquels elle interagit [\(42\)](#) [\(43\)](#).

Les différents profils de méthylation du gène *FMR1* expliqueraient la variabilité phénotypique observée, la sévérité du phénotype étant liée aux taux de méthylation du gène [\(44\)](#) [\(45\)](#).

Le syndrome X fra est donc potentiellement sévère et reconnu comme une indication de DPN et de DPI depuis plusieurs années.

III-2 : Diagnostic préimplantatoire et diagnostic prénatal pour anomalie du gène *FMR1*

Les femmes atteintes d'une anomalie du gène *FMR1* doivent bénéficier d'un conseil génétique afin d'avoir toutes les informations sur le risque de transmission de la maladie. Pendant plusieurs années, le seul moyen permettant au couple de savoir si leur futur enfant sera atteint ou non de FXS, était le diagnostic prénatal. Si le fœtus présente une mutation complète, le couple peut alors demander, s'il le souhaite, une interruption médicale de grossesse. Il s'agit d'un événement marquant et psychologiquement difficile pour ces couples. Un autre moyen d'éviter la transmission de la maladie est le don ovocyte ou l'adoption mais l'absence d'affiliation génétique pour le couple n'est pas facilement acceptée.

Depuis quelques années, il existe une technique antéconceptionnelle permettant à ces couples d'avoir une possible grossesse d'enfant non atteint de FXS, sans passer par le DPN : le diagnostic préimplantatoire.

III-2-a : Diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal est l'ensemble des pratiques médicales ayant pour but de détecter *in utero* chez le fœtus une affection grave, pouvant donner aux futurs parents le choix d'interrompre ou non la grossesse et de permettre une meilleure prise en charge médicale

de la pathologie si la grossesse est poursuivie. La demande d'interruption médicale de grossesse du couple est analysée puis validée ou non par un centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal (CPDPN) en fonction de la gravité et l'incurabilité de la pathologie dont est atteint le fœtus.

Le DPN pour FXS peut être obtenu par la détermination de la taille de l'expansion CGG et de l'état de méthylation du promoteur du gène *FMR1* à l'aide d'une combinaison de PCR et de transfert de Southern sur un échantillon prélevé à partir de villosités choriales ou d'une amniocentèse. Ce diagnostic est précis car il permet de déterminer le sexe de l'enfant à venir et si il est porteur d'une pré-mutation ou d'une mutation complète du gène *FMR1*. Le couple peut alors, si il le souhaite, et après validation par un CPDPN, interrompre la grossesse à n'importe quel moment si l'enfant à naître est porteur d'une mutation complète.

Les résultats de l'étude de la méthylation provenant d'un échantillon de villosités choriales doivent être interprétés avec prudence. En effet, en cas de mutation complète, la méthylation n'est pas toujours présente avant 14 semaines de gestation (46). De plus, le gène *FMR1* n'est pas méthylé si le chromosome X inactivé est celui qui porte la mutation chez un fœtus de sexe féminin. Par conséquent, une amniocentèse de suivi peut être requise pour différencier une grande pré-mutation d'une petite mutation complète avec l'étude du statut de méthylation, cette étude est également nécessaire si l'on souhaite exclure un mosaïcisme somatique avec mutation complète et pré-mutation. Dans tous les cas, la contamination maternelle devrait être exclue et le sexe du fœtus déterminé afin d'interpréter les résultats de l'étude sur la mutation (47).

Ces femmes devraient disposer de suffisamment de temps pour examiner et prendre en compte les informations fournies, y compris le modèle complexe d'héritage et les implications du FXS. Nos patientes connaissent généralement peu le FXS avant le conseil génétique. Un support psychosocial adéquat doit être apporté aux porteurs de mutations qui peuvent devenir anxieux lorsqu'ils connaissent le risque incertain d'héritage lié à l'expansion d'une pré-mutation en mutation complète et le phénotype incertain d'une porteuse de mutation complète ainsi que les risques futurs de FXPOI et de FXTAS [\(48\)](#).

III-2-b : Histoire et technique du diagnostic préimplantatoire en France

Le DPI consiste à biopsier et analyser les embryons obtenus par injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) et à ne réimplanter que les embryons non atteints par la mutation recherchée.

Au Royaume-Uni et aux États-Unis, les premiers enfants nés des premiers programmes de FIV avec DPI ont vu le jour en 1990 (49). Ils étaient plus de 10000 en 2010 (50). En France, le premier DPI a eu lieu en 1999. La première naissance après un DPI a eu lieu en novembre 2000. Ce retard par rapport aux autres pays est dû au temps qu'il a fallu au législateur pour adopter les décrets d'application de la loi de 1994, concernant le DPI.

La première étape du DPI est le recueil d'ovocytes par voie endovaginale après hyperstimulation ovarienne contrôlée. Lors de la FIV, les spermatozoïdes et les cellules du cumulus qui se trouvent au niveau de la zone pellucide de l'ovocyte peuvent se déplacer au cours de la biopsie embryonnaire et mener à une contamination paternelle ou maternelle respectivement. C'est pourquoi dans le cadre du DPI, c'est la technique d'ICSI qui est

systématiquement privilégiée, les cellules du cumulus étant précautionneusement retirées avant la fécondation (51). Trois jours après la fécondation, quand l'embryon est au stade de 6 à 8 cellules, un ou deux blastomères sont prélevés pour l'analyse génétique. La biopsie embryonnaire réalisée à ce stade ne compromet pas le développement futur de l'embryon (52). Dans certains cas, la biopsie peut se faire au stade blastocyste, l'embryon est alors vitrifié et réimplanté si il est sain, à distance de la biopsie.

Initialement, la procédure était considérée comme extrêmement compliquée et associée à un risque d'erreurs élevé. Les progrès majeurs sur la technique du DPI ont permis de largement diminuer ce risque. Les maladies identifiables par DPI sont de plus en plus nombreuses entraînant de nombreuses discussions éthiques parmi les spécialistes du monde entier (53).

L'analyse génétique repose sur une FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) pour les anomalies chromosomiques et les diagnostics de sexe embryonnaire ; les limites de cette technique sont les défauts d'hybridation et le possible chevauchement des signaux fluorescents (54). Le DPI repose sur une technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour le diagnostic de maladies monogéniques : soit par la mise en évidence d'une mutation (diagnostic direct) soit par l'étude de la ségrégation de marqueurs polymorphes intrafamiliaux (diagnostic indirect). Les deux stratégies peuvent être utilisées conjointement. Les limites de cette technique sont les défauts d'amplification de l'ADN appelés phénomènes d' « allele drop out » (ADO) (55) (un des allèles n'est pas amplifié) et la contamination par un ADN extérieur. La faible quantité d'ADN disponible pour le test génétique (diagnostic sur cellule unique) en fait toute la difficulté.

III-2-c : Spécificité du DPI pour anomalies du gène *FMR1*

Entre 2013 et 2016, selon l'agence de biomédecine, le nombre de demandes acceptées en France en génétique moléculaire pour syndrome de l'X fragile a doublé en passant de 15 à 30 demandes par an.

L'analyse directe de la mutation du gène *FMR1* du blastomère biopsié semblerait être la technique la plus fiable pour déterminer si l'embryon est porteur d'une mutation complète du gène *FMR1*. Cependant, il existe des preuves que l'expansion de la répétition de CGG se produit entre le 5^{ème} et le 20^{ème} jour de l'embryogenèse (56). Ceci signifierait que dans les blastomères biopsiés au stade de 8 cellules, l'expansion de la répétition de CGG n'est pas encore établie et seule la pré-mutation serait retrouvée. De plus, une des limites techniques est que l'amplification par PCR d'une pré-mutation de plus de 75 CGG nécessite des quantités d'ADN très importante correspondant à environ 5000 cellules, ce qui n'est pas possible en DPI. C'est pourquoi le DPI du FXS par PCR n'est faisable que par la détermination de l'allèle sain et/ou de l'allèle portant la pré-mutation présumée (57).

Le diagnostic direct consiste à mesurer la taille des allèles normaux du gène *FMR1*. Le principe de la procédure est d'amplifier l'allèle normal avec le plus petit taux de répétition de CGG par PCR. Le but étant d'identifier les embryons non atteints. Pour que cela soit possible, il faut que les couples soient « informatifs » sur la taille de l'expansion de CGG, c'est à dire que la taille de l'expansion de l'allèle du gène *FMR1* sain de la mère soit différente de celle du père. Seulement 63% des couples demandeurs de DPI pour FXS sont informatifs (58). Le diagnostic direct peut être limité par un échec d'amplification de l'ADN

dû à une taille excessive de l'expansion : les embryons porteurs de pré-mutations ne sont identifiables que si la taille de l'expansion n'excède pas 75 triplets. Le diagnostic direct expose au risque d' « Allele Drop Out » (ADO) (55) qui fait porter à tort le diagnostic d'atteinte de l'embryon. L'ADO correspond à un échec d'amplification d'ADN d'un des deux allèles sains d'une cellule hétérozygote. Un garçon sain, par exemple, a un allèle amplifié dans les conditions normales. Si par accident (ADO), l'allèle n'est pas amplifié, on portera à tort le diagnostic de garçon « atteint » (59).

Les premiers DPI pour FXS ont été réalisés en 1995 et en France en 2004 à l'hôpital Antoine Béchère (Clamart). Ils étaient uniquement basés sur la détection des allèles sains maternels et paternel (60). Certains couples non informatifs peuvent être aidés en utilisant des marqueurs polymorphiques de l'ADN liés à des régions proches du gène *FMR1* (61). Ce premier test diagnostique indirect a été publié en 2001. L'équipe d'Apessos (61) affirmait pouvoir offrir un DPI pour FXS à 90% des couples demandeurs dans leur centre par l'amplification par PCR de marqueurs polymorphiques proches du gène *FMR1* (DXS998, FRAXAC1, FMRa, ATL1, FRAXAC2, FMRb). Dans ce test indirect, la séquence de triplets CGG n'est pas amplifiée et le test repose sur l'analyse de marqueurs associés au gène *FMR1*. La limite de ce test est la possibilité que se produisent des recombinaisons chromosomiques et/ou des échecs d'amplifications pouvant mener à de faux diagnostics même si le risque décroît avec le nombre de marqueurs utilisés. Dans ces tests indirects, certains marqueurs peuvent être informatifs et d'autres non, ce qui requiert un test adapté pour le DPI de chaque couple. De plus, l'utilisation de marqueurs indirects détecte également les contaminations d'ADN, ce qui représente un problème majeur en DPI.

Le test parfait comprendrait donc l'amplification des répétitions de triplets CGG combinée à des marqueurs indirects dans une même analyse PCR.

L'équipe de Malcov et al, en 2007 a établi une stratégie de PCR nichée [\(62\)](#) (modification de la PCR classique dans le but de réduire la quantité de produits non spécifiques consécutifs à la liaison des amorces à des sites inattendus) pour permettre dans une seule cellule l'amplification simultanée de :

- la région de *FMR1* contenant la répétition de triplet CGG,
- le gène SRY, marqueur du déterminisme sexuel,
- 3 ou 4 marqueurs polymorphiques de l'ADN proche de *FMR1* : CA1, CA2, DX584, DX998, DX1193, DX6687 et DX1125.

Avec cette technique, l'efficacité de l'amplification est de plus de 96% pour tous les loci. L'absence d'amplification de la région de *FMR1* contenant la répétition de triplet CGG est de 9% chez les femmes hétérozygotes et de 5 -10% pour les marqueurs polymorphiques. Pour les mâles, l'échec d'amplification du gène SRY est de l'ordre de 5%. La même équipe a publié un résumé de son expérience en 2009 [\(63\)](#) : sur un total de 47 cycles menés auprès de 14 couples, l'amplification par PCR nichée a été un succès dans 90% des cas (6,4% d'échec d'amplification et 4,3% d'échec de déterminisme sexuel) permettant de diagnostiquer 89,2% (250/280) des embryons analysés.

Pour faire face au manque de matériel génétique (1 à 2 cellules prélevées par embryon uniquement), une approche combinant l'amplification par déplacement multiple et la PCR a été décrite. L'amplification par déplacement multiple ou MDA (Multiple Displacement Amplification) est une technique d'amplification génomique *in vitro*. La première étape du

diagnostic consistait à l'amplification de l'ensemble du matériel génétique fourni par le blastomère biopsié par MDA. Une PCR était secondairement réalisée pour l'amplification de l'allèle sain du gène *FMR1*, de marqueurs polymorphiques proches (DXS998, DXS548, FRAXAC1, DXS1215) et d'une séquence du gène de l'amelogenin uniquement présent dans les embryons masculin, permettant le déterminisme sexuel (64). L'amplification était menée avec succès dans 85 à 95% des cas avec une amélioration de la technique par la réalisation première de la MDA. 89% des embryons ont pu être diagnostiqués avec succès par cette technique.

Une récente étude française a identifié de nouveaux marqueurs polymorphiques. En utilisant une PCR combinant l'amplification de marqueurs proches de la mutation *FMR1* (FRAXAC1), de nouveaux proches du gène *FMR1* (CA332P, AC287P, AC210P, CA525D, GT624D) et du gène *AMELY* (déterminisme sexuel), le succès de l'amplification est de 94%. Ce test indirect permet le diagnostic de 96% des embryons analysés. Les auteurs remarquent également que ce test indirect associé à une amplification de l'allèle sain du gène *FMR1* permet de diagnostiquer 100% des embryons (65).

Ainsi, le DPI pour FXS repose aujourd'hui sur le diagnostic indirect par l'étude de ségrégation de marqueurs polymorphes au sein de la famille ainsi que le déterminisme sexuel par une séquence du gène de l'amelogenin. Ainsi le DPI permet de déterminer si l'embryon est porteur du chromosome X atteint de sa mère mais ne permet pas de connaître le nombre de triplets CGG dont sera porteur le chromosome X de l'enfant. Ainsi des embryons garçons ou filles porteurs du chromosome X morbide de leur mère sont considérés comme des embryons atteints alors qu'ils pourraient être seulement pré-mutés.

Ainsi, de nombreux embryons par DPI sont à tort détruits car on ne peut déterminer si ils sont porteurs d'une mutation complète ou seulement d'une pré-mutation, on peut seulement déterminer si ils ont hérités du chromosome X morbide de leur mère.

Cette limite du diagnostic souligne la nécessité d'obtenir un nombre important d'embryons au moment du DPI et donc demande une attention particulière au moment de la stimulation ovarienne des patientes.

III-3 : Préservation de fertilité

III-3-a : Cadre légal de la préservation de fertilité en France

En France la préservation de fertilité s'inscrit dans le cadre de la loi de bioéthique de 2004 et de l'Article L2141-11 du code de la santé publique modifié par LOI n°2011-814 du 7 juillet 2011 - art. 32 :

« Toute personne dont la prise en charge médicale est susceptible d'altérer la fertilité, ou dont la fertilité risque d'être prématurément altérée, peut bénéficier du recueil et de la conservation de ses gamètes ou de ses tissus germinaux, en vue de la réalisation ultérieure, à son bénéfice, d'une assistance médicale à la procréation, ou en vue de la préservation et de la restauration de sa fertilité. Ce recueil et cette conservation sont subordonnés au consentement de l'intéressé et, le cas échéant, de celui de l'un des titulaires de l'autorité parentale, ou du tuteur, lorsque l'intéressé, mineur ou majeur, fait l'objet d'une mesure de tutelle. Les procédés biologiques utilisés pour la conservation des gamètes et des tissus germinaux sont inclus dans la liste prévue à l'article L. 2141-1, selon les conditions déterminées par cet article. »

III-3-b : Techniques de préservation de fertilité féminine

Plusieurs techniques de préservation de la fertilité féminine, ayant pour objectif de cryoconserver des gamètes, sont aujourd'hui disponibles. Le choix de la technique la plus adaptée dépend de nombreux paramètres.

Les différentes techniques disponibles aujourd'hui sont les suivantes :

- Cryoconservation d'ovocytes ou d'embryons après hyperstimulation ovarienne contrôlée:

Le principe est d'hyperstimuler par gonadotrophines les follicules ovariens en maîtrisant le moment de l'ovulation pour recruter plusieurs follicules contenant les ovocytes et de les ponctionner afin de cryoconserver les ovocytes matures ou de cryoconserver des embryons après recueil du sperme du conjoint et technique de FIV ou ICSI. Il s'agit de techniques d'AMP bien maîtrisées, offrant environ 25 % de chance de grossesse par transfert d'embryon [\(66\)](#).

La cryoconservation d'ovocytes matures représente plus de risque de lyse à la décongélation que les embryons mais les ovocytes appartiennent à la femme et les embryons au couple. Si le couple se sépare, il ne sera pas possible de transférer les embryons [\(67\)](#).

La cryoconservation ovocytaire n'est envisageable que si il n'y a pas de contre-indication à la stimulation par gonadotrophines et si il n'existe pas d'urgence à débiter un traitement gonadotoxique.

Avec un taux de naissance de 4% par ovocyte vitrifié (68) et de 25% par embryon transféré (67) se pose la problématique du nombre nécessaire d'ovocytes matures à obtenir pour espérer une grossesse ultérieure. Il n'est pas toujours possible d'effectuer plusieurs cycles de stimulation et parfois le nombre d'ovocytes recueillis est très faible du fait d'une réserve

ovarienne basse, posant ainsi le problème de savoir à quelle patiente proposer une conservation et de l'information à leur fournir sur les chances de grossesse future.

- Cryoconservation d'ovocytes ou d'embryons maturés in vitro (MIV) sans stimulation :

Il s'agit d'une technique encore expérimentale. Elle ne nécessite pas ou peu de stimulation ovarienne et peut donc être proposée sans délai et en cas de lésion hormono-dépendante. Les ovocytes recueillis au niveau des follicules antraux par voie transvaginale sous contrôle échographique seront maturés au laboratoire de biologie de la reproduction, en vue d'une vitrification d'ovocytes matures ou d'embryons. Elle peut se faire dans l'urgence, ne nécessitant pas de stimulation par gonadotrophines.

Le principal inconvénient de cette technique est le nombre très faible d'ovocytes pouvant être recueillis. En effet, le nombre recueilli dépend du compte des follicules antraux (CFA), de l'accessibilité des ovaires (qui sont non stimulés) et de leur réponse à la maturation in vitro du fait de la fragilité des fuseaux et du cytoplasme (69) car seul des ovocytes matures peuvent être cryoconservés ou utilisés pour réaliser une FIV ou une ICSI.

-Cryoconservation de tissu ovarien :

Cette technique expérimentale est la seule disponible pour les filles pré-pubères. Elle peut être proposée exclusivement ou en complément des techniques de cryoconservation ovocytaire chez les patientes pubères. Un prélèvement d'ovocytes immatures en vue de MIV peut également s'effectuer ex vivo directement sur la pièce de tissu ovarien.

Le prélèvement d'un lambeau ovarien, ou d'un ovaire entier en cas de risque très élevé d'insuffisance ovarienne définitive (irradiation corporelle totale avec chimiothérapie) a lieu sous coelioscopie. Dans de rares cas, la présence de de micro-métastases dans le

prélèvement ne permettent pas de le conserver car il y aurait un risque de réintroduction de la maladie au moment de la greffe.

Cette technique a donné lieu à moins d'une centaine de naissances dans le monde avec un taux de grossesse de 21% en moyenne (70) [\(71\)](#).

Le choix de la technique la plus adaptée dépend de nombreux paramètres (âge de la patiente, situation personnelle, réserve ovarienne, contexte clinique, notion d'urgence, nature et posologie des traitements, ...). La stratégie de préservation de fertilité doit donc être prise en concertation pluridisciplinaire et après information éclairée de la patiente.

III-3-c Indication de préservation de fertilité en France

En France, la préservation de fertilité a été initialement développée pour les patients devant recevoir un traitement ou une chirurgie à risque gonadotoxique et pouvant affecter leur fertilité future.

Le risque d'infertilité, temporaire ou définitive est difficile à prévoir. Il dépend de nombreux facteurs dont le type de traitement administré, les doses utilisées, l'âge au moment des traitements.

Une technique de préservation de la fertilité peut également être proposée lorsqu'un projet de grossesse doit être repoussé comme après un traitement anti-cancéreux, en raison du risque de rechute et/ou du risque de développement anormal de l'embryon lié à la chimiothérapie récente.

Aujourd'hui, les indications de préservation de fertilité se sont considérablement élargies.

Des femmes souffrant de problèmes hématologiques bénins (drépanocytose,

thrombocytémie essentielle), d'endométriose profonde ou de maladies auto-immunes (lupus, polyarthrite rhumatoïde), et plus globalement celles atteints par toutes les maladies susceptibles d'être traitées par des molécules potentiellement toxiques pour les ovaires peuvent avoir recours à une technique de préservation de fertilité. Enfin, une technique de préservation de fertilité peut également être proposée pour les patientes présentant des stigmates d'altération de la réserve ovarienne ou une pathologie génétique à risque d'altération prématurée de la réserve ovarienne comme les patientes atteinte de FXPOI ou présentant une pré-mutation du gène *FMR1*. Cette indication représente le cœur de ce travail de thèse et sera développée plus loin dans le manuscrit.

III-3-d : Cas particulier de la préservation de fertilité pour baisse de la réserve ovarienne

La fonction ovarienne normale est le résultat d'un processus continu, débutant dès la vie foetale et commençant par la formation, la prolifération et la migration de cellules germinales primordiales vers les gonades aboutissant à la formation d'un stock de follicules primordiaux, constituant la réserve ovarienne. Dès la vie foetale puis tout au long de la vie, il existe une diminution constante du stock de réserve se terminant par une déplétion totale et physiologique, vers l'âge de 50 ans, du stock folliculaire, se traduisant cliniquement par la ménopause. Cependant, l'ovaire est sensible à divers facteurs intrinsèques et extrinsèques pouvant induire une déplétion plus précoce de la réserve ovarienne et au maximum une IOP, se caractérisant par une aménorrhée de plus de 4 mois, associée à un taux de FSH élevé à 2 reprises chez une femme de moins de 40 ans [\(72\)](#) [\(19\)](#). Les principales causes d'IOP sont les causes iatrogènes (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie), chromosomiques (syndrome de Turner) ou génétiques (mutations de certains gènes dont le gène *FMR1*). Cependant, dans la

grande majorité des cas, la cause de l'IOP n'est pas retrouvée. Par ailleurs, l'ovaire peut également être sensible à divers facteurs extrinsèques tels que le tabagisme, des problèmes environnementaux et médicaux, notamment l'endométriose, la chimiothérapie, la radiothérapie et la chirurgie des ovaires (73). On retrouve également des altérations de la réserve ovarienne dans certaines maladies auto-immunes comme le lupus ou le diabète de type 1.

En cas d'IOP vraie, il est souvent trop tard pour proposer et mettre en place une technique de préservation de fertilité permettant de préserver des gamètes. Cependant, lorsqu'il existe des stigmates d'altération précoce de la réserve ovarienne ou lorsqu'un risque d'IOP est mis en évidence, comme la découverte d'une mutation génétique dans le cadre d'une enquête familiale par exemple, il est tout à fait possible de proposer et éventuellement de réaliser une technique de préservation de fertilité adaptée à l'âge et au souhait de la patiente. Lorsque cela est possible, la technique de choix est la réalisation d'une stimulation ovarienne avec cryoconservation d'ovocytes matures. Dans cette situation, l'objectif est de vitrifier le plus possible d'ovocytes matures afin d'obtenir « des chances raisonnables » de grossesse. Contrairement aux situations où un traitement doit démarrer en urgence, dans le cadre des baisses de la réserve ovarienne, plusieurs cycles de stimulation peuvent être réalisés. L'objectif final du nombre d'ovocytes matures à vitrifier n'est pas connu à ce jour et dépend de nombreux paramètres comme l'âge ou l'histoire familiale et personnelle de la patiente. Cependant, les femmes doivent être prévenues que, quel que soit le nombre d'ovocytes vitrifiés, cela ne représente pas des garanties de grossesse ultérieure. (74) (75)

OBJECTIF DE L'ETUDE

Dans le cadre d'une pré-mutation du gène *FMR1* le risque d'IOP est connu. Au moment du diagnostic, les femmes porteuses d'une pré-mutation ont une réserve ovarienne normale ou déjà altérée. Si les paramètres de la réserve ovarienne le permettent et que la patiente le souhaite, on peut proposer une autoconservation ovocytaire après stimulation ovarienne. Les ovocytes matures sont vitrifiés et conservés pour une utilisation ultérieure si il existe une infertilité du couple ou un souhait de DPI.

Des études ont montré qu'il était possible de stimuler les patientes présentant une pré-mutation du gène *FMR1* pour obtenir des embryons à analyser en DPI ou des ovocytes à préserver pour une grossesse ultérieure, même si elles présentent une altération de la réserve ovarienne [\(76\)](#) [\(77\)](#) [\(78\)](#) [\(79\)](#)

En cas de préservation de la fertilité, l'objectif est de congeler « un maximum » d'ovocytes matures ce qui se révèle parfois difficile pour ces femmes atteintes de FXPOI et qui seront éligibles à un DPI si elles le souhaitent. Plusieurs cycles de stimulations peuvent être nécessaires afin d'atteindre « un nombre maximal » d'ovocytes matures conservés. Cependant, le nombre d'ovocytes matures à cryoconserver pour obtenir des chances « raisonnables » de grossesse ou de transfert d'un embryon sain en cas de DPI n'est pas connu à ce jour.

Actuellement, les patientes porteuses d'une pré-mutation *FMR1* peuvent avoir accès à une technique de DPI ou de DPN pour éviter de donner naissance à un enfant atteint de FXS. Si les couples choisissent d'avoir recours à une technique de DPI, il est primordial de leur expliquer que, du fait de limites techniques, le DPI pour XFRA élimine de nombreux

d'embryons seulement atteints d'une pré-mutation, car sont considérés comme atteints tous les embryons ayant hérités du chromosome X atteint. En DPN, il est possible de savoir le nombre de triplets CGG du gène *FMR1* de l'enfant à naître et de son sexe.

Le centre de Médecine de la Reproduction et de Préservation de la Fertilité de l'Hôpital Antoine Béchère a la spécificité de prendre en charge des patientes présentant une pré-mutation du gène *FMR1* à la fois dans le cadre du DPI et de la cryoconservation ovocytaire.

L'objectif principal de ce travail est de définir la probabilité d'obtenir un embryon sain à transférer en fonction du nombre d'ovocytes matures obtenus lors d'une stimulation pour DPI. Ces informations nous permettront d'informer au mieux les patientes ayant recours à une préservation de fertilité pour pré-mutation *FMR1*, et de les orienter vers du DPN ou du DPI en fonction du nombre d'ovocytes cryoconservés.

L'objectif secondaire était d'évaluer la réponse à la stimulation de l'ovulation des patientes présentant une anomalie du gène *FMR1*. Afin de répondre à cette question, nous avons comparé les principaux résultats de la stimulation de l'ovulation, chez les patientes porteuses d'une anomalie du gène *FMR1* ayant eu recours à une stimulation de l'ovulation pour préservation de fertilité ou DPI, à ceux d'une population contrôle appariée sur l'âge, le CFA et le protocole de stimulation.

MATERIEL ET METHODE

V-1 : Population de l'étude

Nous avons inclus dans cette étude des patientes présentant une anomalie du gène *FMR1* ayant eu recours à une stimulation de l'ovulation pour DPI ou dans le cadre d'une préservation de la fertilité.

V-1-a : Patientes présentant une anomalie du gène *FMR1* ayant bénéficié d'une stimulation de l'ovulation pour DPI

Toutes les patientes ayant bénéficié d'un DPI pour pré-mutation ou mutation complète du gène *FMR1* à l'hôpital Antoine Béclère entre 2006 et Décembre 2018 ont été incluses dans cette étude rétrospective unicentrique (Groupe XFRA DPI).

Les critères d'acceptabilité pour avoir recours à une prise en charge en DPI à l'hôpital Antoine Béclère sont :

- Eligibilité et faisabilité génétique
- _Patiente de 18 à 38 ans
- _CFA>10 et AMH>1ng/ml
- _Couple ayant reçu une information pluridisciplinaire
- _Pas de contre-indication médicale à une grossesse.

Au total, pour le groupe XFRA DPI, 92 cycles ont été débutés chez 38 patientes.

Après exclusion de 7 cycles ayant été annulés pour des raisons variées, 85 cycles ont été analysés pour 33 patientes (Figure [32](#)).

V-1-b : Patientes présentant une anomalie du gène *FMR1* ayant bénéficié d'une stimulation de l'ovulation pour préservation de fertilité.

Nous avons également étudié toutes les patientes ayant bénéficié d'une préservation de la fertilité pour pré-mutation du gène *FMR1* à l'hôpital Antoine Bécclère et à l'hôpital Jean Verdier entre 2006 et 2018 (Groupe XFRA PF).

Quarante-et-un cycles de préservation de la fertilité ont été réalisés chez 14 patientes porteuses d'une pré-mutation *FMR1*. Les patientes ont toutes souhaité une préservation ovocytaire et non embryonnaire (Figure 3).

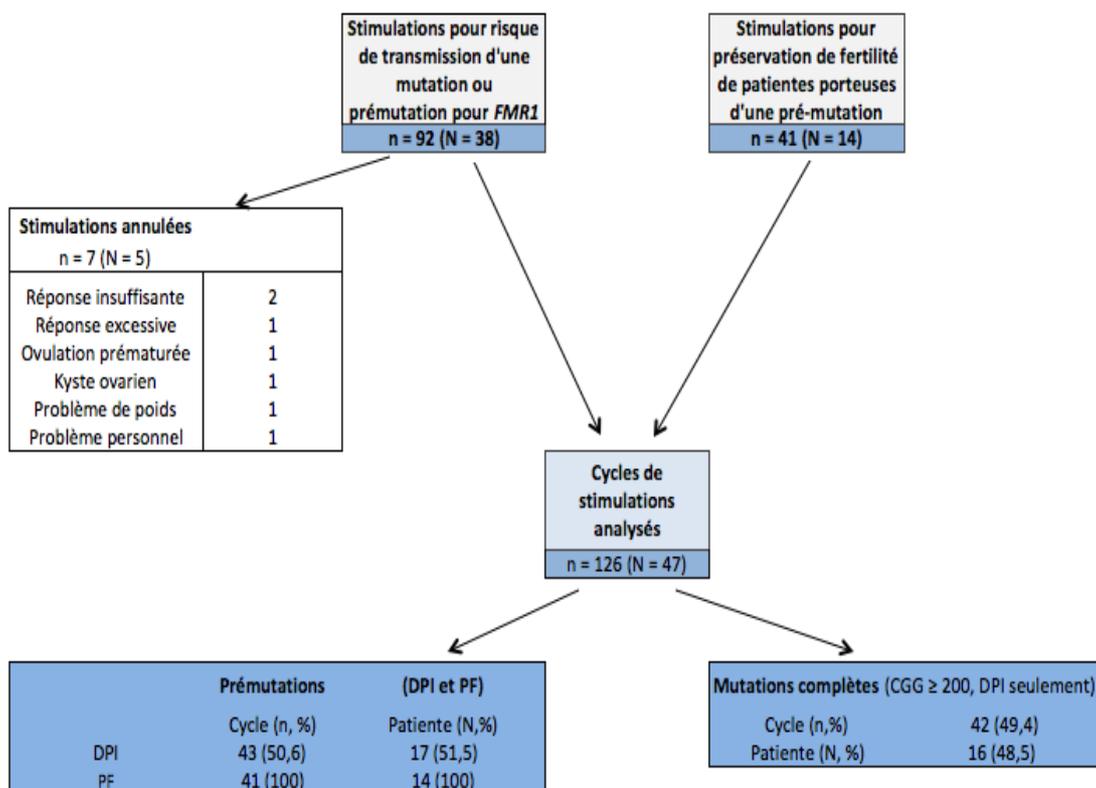


Figure 3 : Flow-chart (n: nombre de cycles de stimulation, N: nombre de patientes)

V-1-c : Groupes contrôles

Les patientes ayant bénéficié d'un DPI ont été appariées selon leur âge, le CFA et le protocole de stimulation à des patientes ayant eu recours à un DPI pour translocation masculine réalisé à Antoine Béclère durant la même période (Groupe témoins DPI).

Les patientes ayant bénéficié d'une préservation ovocytaire ont été appariées sur l'âge, le CFA et le protocole de stimulation à des patientes ayant eu recours à une stimulation de l'ovulation pour préservation de la fertilité, pour une indication non oncologique, à l'Hôpital Jean Verdier sur la même période (Groupe témoins PF).

L'appariement a été réalisé par cycle de stimulation ayant permis une ponction ovocytaire.

V-2 : Protocoles de stimulation ovarienne

V-2-a : Stimulation ovarienne

Deux principaux types de protocole de stimulation de l'ovulation ont été réalisés : protocoles utilisant des agonistes ou des antagonistes de la GnRH.

Lors d'un protocole long agoniste, la désensibilisation hypophysaire était obtenue grâce à une injection unique d'agoniste retard de la GnRH (Triptoréline, Decapeptyl® 3mg, Ipsen Pharma, Paris, France) le 1^{er} jour du cycle précédent la stimulation ou grâce à une injection quotidienne d'agoniste de la GnRH (Triptoréline, Decapeptyl® 0,1mg, Ipsen Pharma, Paris, France) à partir du 20^{ème} jour du cycle précédent celui de la stimulation.

Lors d'un protocole antagoniste, les patientes pouvaient recevoir ou non un prétraitement par pilule oestro-progestative en continu (Levonorgestrel + Ethinylestradiol, Minidril®, Pfizer, Paris, France) le mois précédent celui de la stimulation ou par des oestrogènes par voie orale (Provames® 2 mg, Serb, Paris, France) pendant 8 à 10 jours le mois précédent celui de la stimulation.

Pour chaque protocole une échographie pelvienne et un dosage hormonal (estradiol, LH, progestérone) étaient réalisés avant le début de la stimulation par gonadotrophines afin de vérifier l'absence de follicules en croissance ou de kyste ovarien. Dans le cadre du DPI, une attention particulière était portée à l'endomètre qui devait être fin.

La stimulation ovarienne a été menée à l'aide de FSH recombinante (Follitropine alpha, Gonal F®, Serono pharmaceuticals, Boulogne, France ; Follitropine alpha, Bemfola®, Gedeon Richter, Paris, France ; Follitropine bêta, Puregon®, Schering-Plough corporate, New Jersey, USA ou 150 UI Follitropine alpha associée à 75 UI Lutropine alpha, Pergoveris®, Merck biopharma, Darmstadt, Allemagne) ou urinaire (Menotropine, Menopur®, Ferring pharmaceuticals, Gentilly, France) pendant au moins 5 jours. La dose de départ était adaptée en fonction de l'âge et des paramètres de la réserve ovarienne. Au sixième jour puis tous les 2 – 3 jours, un dosage hormonal et une échographie pelvienne étaient réalisés afin d'évaluer la réponse ovarienne. Les doses de FSH administrées étaient adaptées aux résultats de ce bilan. Dans le protocole antagoniste, le blocage de l'ovulation par un antagoniste de la GnRH était systématiquement débuté au sixième jour de la stimulation (Cetrorelix, Cétrotide® 0,25 mg, Merck biopharma, Darmstadt, Allemagne ou Ganirelix®, Orgalutran 0,25mg/0,5ml, MSD, Courbevoie, France)

V-2-b : Déclenchement de l'ovulation et ponction ovocytaire

Lorsque au moins 3 follicules avaient atteint une taille pré ovulatoire à l'échographie (16-22mm) et que le taux d'oestradiol par follicule préovulatoire étaient d'environ 200 pg/ml, le déclenchement de l'ovulation était obtenu par l'administration d'hormone chorionique gonadotrophique (hCG) (10 000 UI, gonodotrophine chorionique endo, Schering Plough, New Jersey, USA ou Choriogonadotropine alpha, Ovitrelle® 250 microgrammes/0,5ml, Merck biopharma, Darmstadt, Allemagne).

La ponction ovarienne avait lieu 36h plus tard sous anesthésie locale ou générale en fonction du choix de la patiente.

Dans le cadre de la préservation de la fertilité, les ovocytes matures étaient congelés par une technique de vitirification.

V-3 : Technique de DPI

Les ovocytes matures étaient fécondés par micro-injection d'un spermatozoïde dans l'ovocyte. Deux blastomères étaient prélevés à J3 sur les embryons de 6 à 8 cellules afin d'être testés. La biopsie était réalisée à l'hôpital Antoine Bécère et le diagnostic génétique à l'hôpital Necker par la méthode de diagnostic indirect. Les embryons considérés comme non atteints et évolutifs pouvaient être ensuite transférés dans l'utérus à J5 sous contrôle échographique ou vitrifiés.

Un soutien de la phase lutéale était réalisé par l'administration de progestérone 600 mg/j par voie vaginale (Progestan® 200mg, Besins international, Montrouge, France).

V-4 : Paramètres étudiés

Plusieurs paramètres classiques de réponse à la stimulation de l'ovulation ont été évalués comme le nombre d'ovocytes obtenus matures. Dans le cadre du DPI, le nombre d'embryons obtenus au total puis diagnostiqués sains a été évalué.

De plus, un indicateur de réponse à la stimulation, le Follicular Output RaTe (FORT), a également été calculé. Cet indice correspond au rapport entre le nombre de follicules préovulatoires (16-22mm) le jour du déclenchement rapporté au nombre de follicules antraux (3-8mm) le premier jour de la stimulation [\(80\)](#) (77).

V-5 : Statistiques

V-5-a : Analyses des populations et de la réponse à la stimulation

Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne (\pm écart-type). Les patientes des groupes « XFRA DPI » et « XFRA PF » ont été comparées à leur groupe contrôle concernant les principales caractéristiques de la population (âge, IMC, AMH, CFA). Les principaux résultats des stimulations des différents groupes ont également été comparés à leur groupe témoin. Les comparaisons statistiques en ont été réalisées à l'aide de tests non-paramétriques de Wilcoxon-Mann Whitney dans le cas où la distribution n'était pas normale ou de tests t de Student avec correction de Welsh si la distribution était normale. Un test non paramétrique de Kruskal Wallis avec un test post-hoc de Dunns a été utilisé pour la comparaison de plus de 2 groupes. Les résultats étaient considérés comme significatifs lorsque $p < 0,05$. Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPadPrism, version 7.02.

V-5-b : Probabilité d'obtenir un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures obtenus

Pour chaque cycle de stimulation pour DPI, un nombre d'ovocytes matures a été recueilli et pour certains cycles un ou plusieurs embryons sains obtenus.

Grâce à ces données une analyse VBA (Visual Basic for Applications) sur Excel a permis de déterminer la probabilité d'obtenir au moins un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures obtenus à la ponction.

Cette probabilité a été étudiée sans tenir compte de l'âge de la patiente puis par analyse en sous-groupes en fonction de l'âge (plus ou moins de 35ans).

RESULTATS

VI-1 : Population étudiée

Parmi les 33 patientes du groupe XFRA DPI, 16 (48,5%) patientes étaient porteuses d'une mutation complète, ce qui représentait 42 (49,4%) cycles, 3 patientes avaient entre 50 et 79 répétitions CGG (8 cycles), 4 patientes avaient entre 80 et 99 répétitions CGG (10 cycles) et 10 avaient entre 100 et 199 répétitions CGG (25 cycles).

Dans le groupe XFRA PF, 6 patientes avaient entre 50 et 79 répétitions CGG (24 cycles), 5 patientes avaient entre 80 et 99 répétitions CGG (14 cycles) et 3 patientes avaient entre 100 et 199 répétitions CGG (3 cycles). (Figure 2)

Les patientes des groupes XFRA DPI et XFRA PF étaient comparables aux groupes témoins respectifs concernant l'âge, les paramètres de la réserve ovarienne (CFA et AMH) et l'IMC (tableau 1).

En comparaison aux patientes du groupe « XFRA DPI », les patientes du groupe « XFRA PF » étaient —significativement plus jeunes ($31,3 \pm 3,3$ vs $28,3 \pm 4,3$ ans, $p=0,027$) et plus mince ($22,4 \pm 3,4$ vs $20,5 \pm 2,4$ Kg/cm², $p=0,026$). Elles présentaient une altération de la RO avec des dosages d'AMH ($4,3 \pm 3$ vs $1 \pm 0,6$ ng/ml, $p < 0,0001$) et un CFA ($19,8 \pm 8,2$ vs $7,6 \pm 3,5$, $p < 0,0001$) significativement diminués (tableau 1).

n= Cycles	XFRA DPI n= 85	DPI Témoins n= 85	p value
Age (an)	31,7 (± 3,2)	32 ± (3,1)	0,47
IMC (Kg/cm ²)	22,7 (± 3,2)	24,4 ± (3,8)	0,08
CFA	20,7 (± 9)	20,8 ± (8,6)	0,95
AMH (ng/ml)	4,8 (± 3,6)	4,2 ± (2,58)	0,17
n= Cycles	XFRA PF n= 41	PF témoins n= 41	p value
Age (an)	28,9 (±3,8)	28,8 (±3,8)	0,88
IMC (Kg/cm ²)	20,4 (±2,2)	21,9 (±3,4)	0,2
CFA	7,2 (±3,9)	7,8 (±4,1)	0,5
AMH (ng/ml)	0,9 (±0,7)	1,6 (±1,5)	0,17
N= Patientes	XFRA DPI 33	XFRA PF 14	p value
Age (an)	31,3 (±3,3)	28,3 (±4,3)	0,027
IMC (Kg/cm ²)	22,4 (±3,4)	20,5 (±2,4)	0,026
CFA	19,8 (±8,2)	7,6 (±3,5)	< 0,0001
AMH (ng/ml)	4,3 (±3)	1 (±0,6)	< 0,0001

Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques des patientes DPI et XFRA PF et de leurs témoins. Résultats exprimés en moyenne (± écart-type)

VI-2 : Réponse à la stimulation

VI-2-a : Prise en charge en DPI

Les patientes du groupe XFRA DPI présentaient des paramètres de réponses à la stimulation comparable à ceux des patientes du groupe témoin. L'indice de FORT était comparable ($42,58 \pm 23,9$ vs $42,37 \pm 27,18$, $p=0,958$), ainsi que le nombre d'ovocytes matures recueillis ($9,41 \pm 5,24$ vs $9,85 \pm 4,14$, $p=0,549$). Le taux de maturation était significativement plus bas pour les patientes porteuses d'une mutation *FMR1* ($77,01 \pm 21,04\%$ vs $84,4 \pm 13,13\%$, $p= 0,07$) (Tableau 2).

	XFRA DPI n= 85	DPI Témoins n=85	p value
Dose de départ* (UI)	253,5 (±91,18)	245,2 (±87,8)	0,54
Dose totale* (UI)	2606 (±1099)	2590 (±1085)	0,92
Durée de la stim* (jours)	10,86 (±2,31)	11 (±2)	0,67
E2 jHCG* (pg/ml)	2700 (±1222)	2714 (±929,3)	0,94
Nbr foll > 16mm*	7,59 (±3,37)	7,57 (±3,14)	0,97
FORT (nbr foll > 16 / CFA)*	42,58 (±23,9)	42,37 (±27,18)	0,96
Nbr ovo recueillis*	12,08 (±6,1)	11,75 (±4,9)	0,70
Nbr ovo matures*	9,41 (±5,2)	9,85 (±4,14)	0,55
Taux de maturation (nbr d'ovo matures / nbr d'ovo recueillis)**	77,01 (±21)	84,4 (±13,13)	0,007
Taux de fécondation** (nbr d'ovo matures/ nbr de zygotes obtenus)	73,9 (±21,4)	75,02 (±21,12)	0,74
Nbr embryons obtenus*	7,2 (±4,54)	7,3 (±3,6)	0,79
Nbr embryons biopsiés*	3,4 (±2,98)	4,8 (±3)	0,002
Nbr embryons diagnostiqués*	3 (±2,7)	4,58 (±2,88)	0,0003
Nbr embryons atteints*	1,5 (±1,6)	3,32 (±2,40)	< 0,0001

Tableau 2 : Analyse en cycle de stimulation pour toutes les patientes prises en charge en DPI. (Résultats exprimés en moyenne ± écart-type* ou pourcentage**)

VI-2-b : Prise en charge en préservation de fertilité.

Les patientes du groupe XFRA PF présentaient des paramètres de réponse à la stimulation comparables à ceux des patientes du groupe témoin PF. L'indice de FORT n'était pas significativement différent dans les 2 groupes (73,3±46,9% vs 73,7±49%, p=0,972), ainsi que le taux d'ovocytes matures recueillis (5,1±3,6 vs 6±4,8 ovocytes, p=0,3) ou le taux de maturation (74,6±23,5% vs 79,8±22%, p=0,31) (Tableau 3).

	XFRA PF n= 41	PF témoins n= 41	p value
Dose de départ*	353,9 (±83,5)	386,6 (±93,7)	0,13
Dose totale*	3999 (±1298)	4151 (±1530)	0,65
Durée de la stim*	11,6 (±2,1)	10,8 (±2,3)	0,11
E2 jHCG*	1180 (±770)	1144 (±893,7)	0,86
Nbr foll > 16*	4,2 (±3)	4,8 (±3)	0,33
FORT (nbr foll > 16 / CFA)*	73,3 (±47)	73,7 (±49)	0,97
Nbr ovo recueillis*	6,9 (±4,9)	7,5 (±5,6)	0,64
Nbr ovo matures*	5,1 (±3,6)	6 (±4,8)	0,30
Taux de maturation (nbr d'ovo matures / nbr d'ovo recueillis) x 100**	74,6 (±23,5)	79,8 (±22)	0,31

Tableau 3 : Analyse en cycle de stimulation pour toutes les patientes prises en charge en préservation de fertilité. (Résultats exprimés en moyenne ± écart-type* ou pourcentage**)

Au total, les patientes du groupe XFRA PF ont conservé 5,1±3,6 ovocytes matures par cycle de préservation de fertilité. Elles ont bénéficié d'environ 3 cycles de préservation de fertilité par patiente permettant ainsi la cryopréservation d'une quinzaine d'ovocytes matures en moyenne par patientes.

VI-3 : Probabilité d'obtenir un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures recueillis

VI-3-a : Etude globale

Nous avons mis en évidence qu'il fallait au moins 3 ovocytes matures pour obtenir au moins un embryon sain à la biopsie. Le pourcentage de chance était alors de 28,6%. Cette probabilité augmentait de manière importante à partir de 10 ovocytes matures qui permettaient d'avoir plus de 60% de chance d'obtenir un embryon sain.

La probabilité d'obtenir au moins un embryon sain ne dépassait pas 69%, obtenue à partir de 22 ovocytes recueillis (figure 4). Il semblait exister un plateau à partir de 15 ovocytes matures avec une probabilité de 68% d'obtenir un embryon sain à transférer.

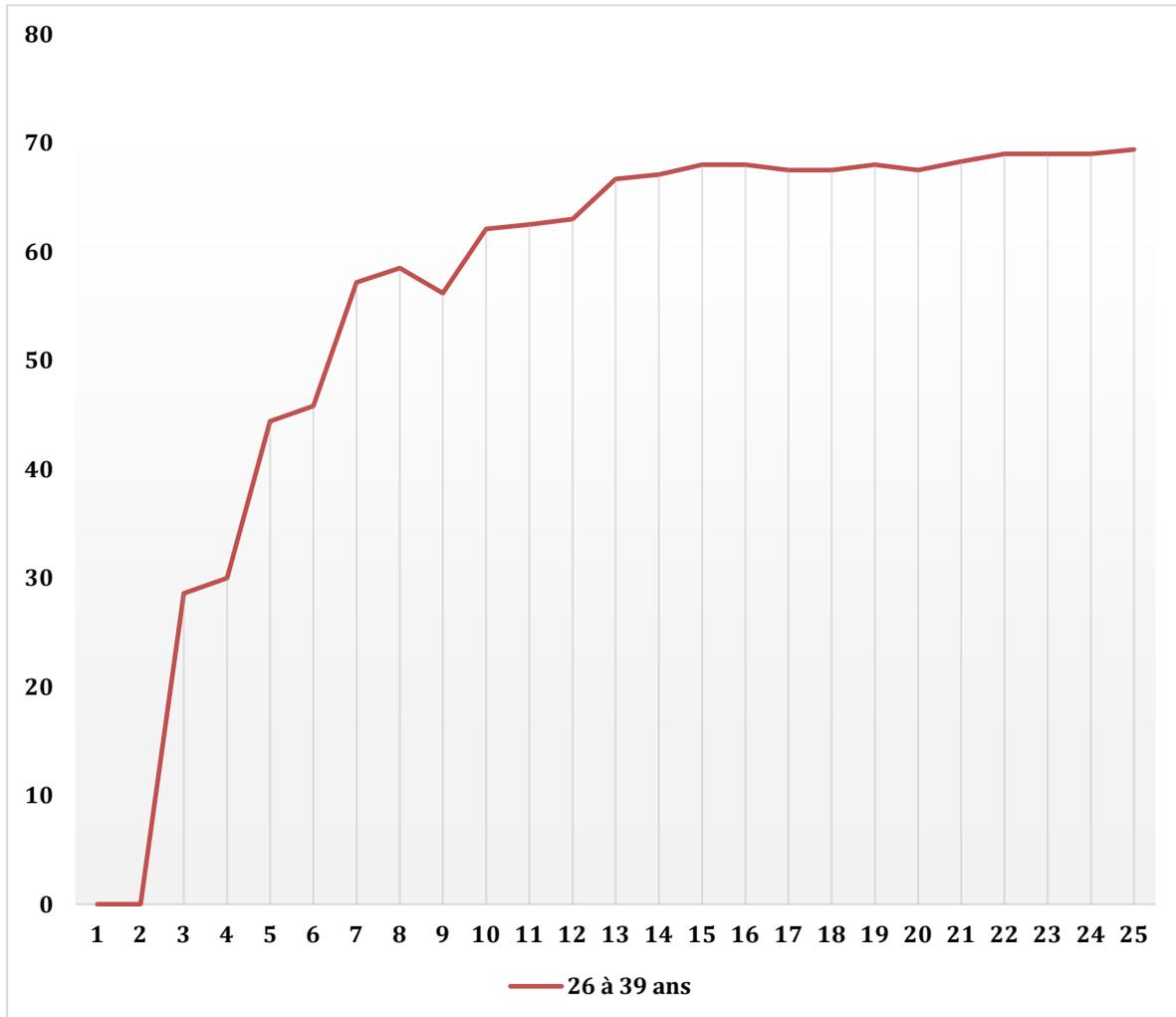


Figure 4 : Probabilité d'obtenir au moins un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures recueillis de 26 à 39ans.

VI/ 3-b : Probabilité selon l'âge : patientes de plus ou de moins de 35ans

Le taux de fécondabilité et le taux de fécondation diminuant avec l'âge, nous avons analysé les résultats en séparant les patientes en fonction de leur âge (plus ou moins 35ans).

Vingt huit patientes avaient entre 26 et 34 ans au moment de leurs stimulations représentant 67 cycles de DPI. Neuf patientes avaient plus de 35 ans au moment de leur stimulation représentant 18 cycles de DPI.

La probabilité d'obtenir un embryon sain était globalement plus faible pour les patientes de plus de 35 ans mais la courbe restait de forme similaire (Figure 5). Il fallait au minimum 6 ovocytes matures pour obtenir un embryon sain chez les femmes de plus de 35ans, alors que seulement 3 ovocytes permettait des résultats identiques chez les patientes de moins de 35 ans.

Chez les patientes de plus de 35ans, il n'y avait jamais plus de 50% de chance d'obtenir un embryon sain, quel que soit le nombre d'ovocytes matures recueillis, alors que les femmes de moins de 35 ans pouvaient avoir jusqu'à presque 75% de chance d'obtenir un embryon sain et lorsque au moins 12 ovocytes matures étaient recueillis.

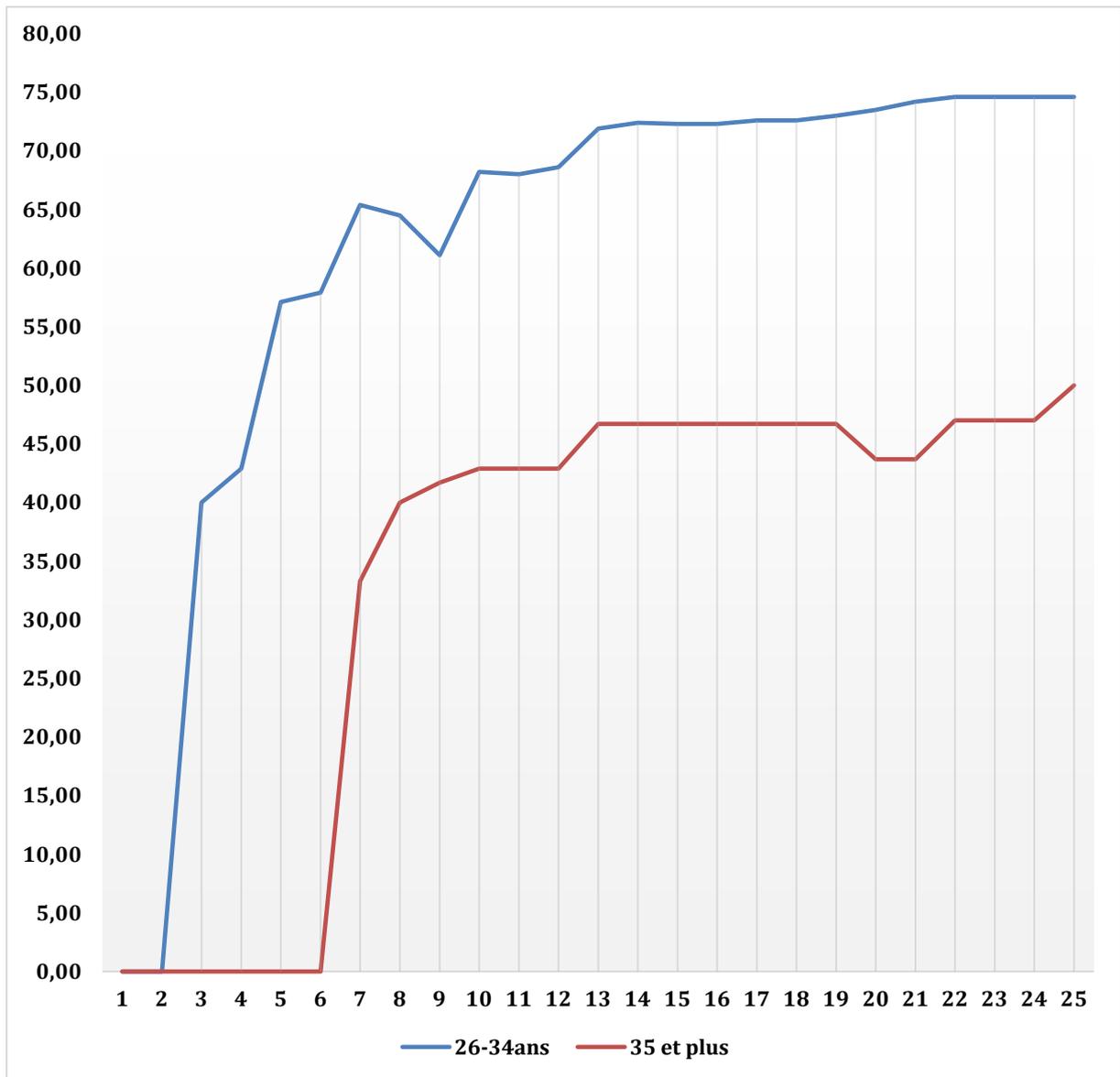


Figure 5: Probabilité d'obtenir au moins un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures recueilli et de son âge.

DISCUSSION

Les patientes porteuses d'une altération du gène *FMR1* peuvent avoir recours, si elles le souhaitent, à une prise en charge en DPI afin d'éviter d'avoir éventuellement recours à une IMG. Par ailleurs, depuis la dernière révision de la loi de bioéthique de 2011, ces patientes sont également éligibles à une technique de préservation de la fertilité car une pré-mutation du gène *FMR1* est la première cause génétique d'altération prématurée de la réserve ovarienne. Ainsi, lorsqu'une pré-mutation du gène *FMR1* est mise en évidence et que la réserve ovarienne le permet, ces patientes peuvent avoir recours à une cryopréservation d'ovocytes matures après stimulation de l'ovulation. Cependant, le nombre optimal d'ovocytes à vitrifier n'est pas connu. Ainsi, le principal objectif de cette étude était d'évaluer, dans le cadre de la prise en charge en DPI, les chances d'obtenir au moins un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures obtenus. Cette donnée pourrait permettre d'informer au mieux les patientes candidates à une cryoconservation ovocytaire et qui souhaiterait un DPI au moment de la réutilisation de leurs ovocytes.

Dans un premier temps nous avons montré la faisabilité d'une stimulation de l'ovulation chez les patientes porteuses d'une altération du gène *FMR1* en comparant leur réponse à la stimulation ovarienne à des patientes témoins. Nous avons tout d'abord mis en évidence que la réponse à la stimulation n'était pas altérée chez les patientes mutées ou pré-mutées pour le gène *FRM1* prise en charge dans le cadre du DPI. En effet, le FORT et le nombre d'ovocytes matures recueillis n'étaient pas différents de celui des patientes témoins appariées sur l'âge et le CFA.

Peu d'études ont analysé la réponse à la stimulation de l'ovulation des patientes présentant une altération du gène *FMR1*. L'étude d'Avraham *et al* publiée en 2017 (76), a cherché le lien entre la réponse ovarienne et le nombre de répétitions CGG chez les porteuses de mutation complète et de pré-mutation *FRM1*, soumises à une hyperstimulation contrôlée dans le cadre du DPI. La réponse ovarienne était normale chez les patientes porteuses d'une mutation complète mais était altérée chez les porteuses de pré-mutation, bien que le nombre de répétitions ne soit pas statistiquement associé de manière significative au nombre d'ovocytes récupérés.

Dans notre étude, en plus des paramètres classiques d'évaluation de la réponse ovarienne, l'indice de FORT a été utilisé. Il présente l'avantage d'être indépendant du nombre initial de follicules ovariens, contrairement aux autres paramètres d'évaluation de la réponse ovarienne à la stimulation utilisés jusqu'à présent soit, le nombre d'ovocytes matures ou d'embryons obtenus, les taux d'oestradiol le jour du déclenchement ou les doses totales de gonadotrophines utilisées au cours de la stimulation (80). Ainsi, les patientes présentant une altération du gène *FMR1* peuvent avoir recours à une stimulation de l'ovulation.

Cependant, du fait des critères d'acceptation du dossier de DPI, les patientes prises en charge dans ce contexte ne présentent pas d'altération de la réserve ovarienne. alors que chez les patientes ayant recours à une préservation de la fertilité, la réserve ovarienne peut être déjà altérée (16).

C'est pourquoi nous avons comparé la réponse à la stimulation des patientes de préservation de fertilité porteuses d'une pré-mutation *FMR1* à un groupe témoin de préservation de fertilité apparié sur l'âge, le CFA et le protocole de stimulation. Le FORT, le

nombre d'ovocytes matures recueillis ainsi que le taux de maturation étaient comparables dans les deux groupes

Une stimulation ovarienne est donc réalisable chez des patientes prémutées ou mutées *FMR1* mais le nombre « optimal » d'ovocytes à cryopréserver est difficile à estimer et conseiller les patientes dans ce contexte peut être délicat. Du fait du manque de recul quant à la réutilisation des ovocytes cryopréservés, il s'agit de la problématique la plus importante en préservation de la fertilité.

D'après une étude publiée en 2016 par Cobo *et al* (82), au moins 8 à 10 ovocytes matures sont nécessaires pour obtenir un succès « raisonnable » en terme de grossesse. Le taux de naissances vivantes par patiente était plus élevé chez les femmes de moins de 35 ans par rapport aux femmes de plus de 36 ans. En effet, pour les femmes de moins de 35 ans, 8 ovocytes permettent d'obtenir 40,8% de chances de grossesse alors que chez les femmes de plus de 36 ans, la vitrification de 11 ovocytes permet 35,6% de chances de grossesse.

Plus récemment, la même équipe (83) a montré une probabilité cumulative de naissances vivantes significativement plus élevée chez les patientes âgées de moins de 36 ans pour les cryoconservations non oncologiques ($P < 0,0001$), avec de meilleurs résultats lorsque davantage d'ovocytes étaient disponibles pour la FIV. De ce fait, les patientes ayant cryoconservés leurs ovocytes pour des raisons non oncologiques doivent être conseillées en fonction de leur âge et du nombre d'ovocytes disponibles.

Dans le cadre d'une préservation de la fertilité pour prémutation du gène *FMR1*, un éventuel recours à une technique de DPI avec les ovocytes cryoconservés est une problématique

supplémentaire. En effet, se rajoute la question du nombre d'ovocytes à cryoconserver afin d'obtenir un embryon sain après DPI.

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons utilisé les données issues des patientes présentant une anomalie du gène *FMR1* ayant eu recours à une technique de DPI.

Nous avons évalué le nombre d'ovocytes matures permettant d'obtenir un embryon sain après DPI. D'après nos résultats, la cryopréservation de moins de 3 ovocytes matures ne permet pas l'obtention d'embryon sain à transférer quel que soit l'âge de la patiente.

Nous avons également montré que l'obtention d'au moins 13 ovocytes permettait, dans 67% des cas, d'obtenir au moins un embryon sain à transférer.

L'analyse en sous-groupe en fonction de l'âge a mis en évidence que ce seuil était de 6 ovocytes matures pour les patientes de plus de 35 ans.

Dans notre population XFRA PF, toutes les patientes avaient moins de 35ans au moment de leur préservation de fertilité. Sur les 14 patientes, une seule n'a pas obtenu d'ovocyte mature du fait d'une réserve ovarienne trop altérée. Une autre patiente n'a bénéficié que d'un seul cycle car sa réserve était trop basse et a conservé seulement 2 ovocytes matures. Quatre patientes ont obtenus entre 7 et 12 ovocytes en un ou plusieurs cycles et 8 patientes ont conservé plus de 16 ovocytes matures sur une moyenne de 3 cycles de stimulation. Ainsi, il semblerait que la grande majorité de ces patientes pourraient avoir un embryon sain si elles souhaitent avoir recours au DPI au moment de la réutilisation des ovocytes cryopréservés.

Cependant, l'extrapolation des résultats obtenus chez les patientes XFRA DPI aux patientes de XFRA PF n'est pas tout à fait exacte. Tout d'abord, tous les ovocytes matures cryoconservés ne résisteront pas totalement à la décongélation. De plus, les ovocytes matures obtenus décongelés ne donneront pas tous un embryon d'assez bonne qualité pour être biopsié pour le DPI. Il y a donc probablement une nécessité d'obtenir plus d'ovocytes matures en préservation de fertilité qu'en DPI

D'autre part, les patientes ayant recours à une technique de préservation de fertilité ont souvent une altération de la réserve ovarienne ce qui pourrait être associée à une baisse de la qualité ovocytaire. En effet, Santos *et al* a montré (84), que les patients présentant des taux élevés de FSH présentaient des ovocytes de qualité inférieure à celles des témoins. D'autre part, une étude suggérant des taux de développement de blastocystes plus faibles chez les patients présentant un statut de pré-mutation de *FMR1* et une corrélation inverse entre le nombre de répétitions de CGG du gène *FMR1* et le développement de blastocystes a été publiée en 2018 (85).

Notre étude est une analyse rétrospective et monocentrique mais effectuée dans un des centres de référence pour la préservation de la fertilité et pour le DPI. Cette étude regroupe 85 cycles de DPI et 41 de préservation de fertilité ce qui est un nombre faible pour obtenir une bonne puissance statistique. Cependant, ce nombre raisonnable du fait de la rareté de cette pathologie en DPI et préservation de fertilité. Les statistiques, notamment par sous-groupes d'âge, n'ont pas une forte puissance statistique du fait du faible nombre de patientes. Toutefois, l'information sur le pourcentage de chance d'obtenir un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures est novatrice et très intéressante pour

l'information du couple. En effet, avec ce nombre faible de patientes et donc de puissance, il n'a pas été possible de travailler sur les chances de grossesses et de naissances vivantes ce qui apporterait plus de réponses à nos patientes.

CONCLUSION

Nos résultats ont permis de montrer que la préservation de fertilité pour pré-mutation *FMR1* était réalisable et qu'il fallait au moins 3 ovocytes matures après décongélation chez les femmes de moins de 35ans afin d'obtenir au moins un embryon sain transférable si le couple souhaite réutiliser les ovocytes matures pour du DPI.

Ces résultats permettent de mieux informer les patientes de XFRA PF sur l'utilisation de leurs ovocytes cryoconservés, et leur probabilité d'obtenir un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures obtenus après décongélation. Sachant que le DPI permet de savoir si le chromosome X maternel muté ou pré-muté a été transmis à l'embryon mais pas de savoir le nombre de triplets CGG du gène *FMR1* de l'embryon, de nombreux embryons pré-mutés sont détruits car considérés comme atteints. A l'inverse, le DPN permet de savoir le sexe et le nombre de triplets CGG du gène *FMR1* du fœtus ce qui permet au couple de demander, si il le souhaite, une interruption médicale de grossesse en cas de mutation complète. Mais la difficulté psychologique de l'IMG peut être décisive dans le choix des couples à s'orienter vers le DPI même si le nombre d'ovocytes cryoconservés est faible. Quelle que soit la probabilité d'obtenir un embryon sain, le choix revient au couple et notre rôle est de leur donner un maximum d'informations pour leur permettre de faire un choix éclairé.

Enfin, il est nécessaire d'informer les patientes porteuses d'une pré-mutation de consulter tôt, dès le diagnostic de XFRA afin d'effectuer une cryoconservation ovocytaire avant l'altération de la RO si possible et avant 35 ans.

Des études complémentaires avec plus d'effectifs permettant une analyse du taux de grossesse en fonction du nombre d'ovocytes cyroconservés seraient plus informatives pour les couples.

REFERENCES

1. Martin JP, Bell J. A PEDIGREE OF MENTAL DEFECT SHOWING SEX-LINKAGE. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1 juill 1943;6(3-4):154-7.
2. Lubs HA. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet*. mai 1969;21(3):231-44.
3. Turner G, Daniel A, Frost M. X-linked mental retardation, macro-orchidism, and the Xq27 fragile site. *J Pediatr*. mai 1980;96(5):837-41.
4. Krawczun MS, Jenkins EC, Brown WT. Analysis of the fragile-X chromosome: localization and detection of the fragile site in high resolution preparations. *Hum Genet*. 1985;69(3):209-11.
5. Yang W, Fan C, Chen L, Cui Z, Bai Y, Lan F. Pathological Effects of the FMR1 CGG-Repeat Polymorphism (5-55 Repeat Numbers): Systematic Review and Meta-Analysis. *Tohoku J Exp Med*. 2016;239(1):57-66.
6. Reyniers E, Vits L, De Boulle K, Van Roy B, Van Velzen D, de Graaff E, et al. The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nat Genet*. juin 1993;4(2):143-6.
7. Nolin SL, Lewis FA, Ye LL, Houck GE, Glicksman AE, Limprasert P, et al. Familial transmission of the FMR1 CGG repeat. *Am J Hum Genet*. déc 1996;59(6):1252-61.
8. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*. 20 déc 1991;67(6):1047-58.
9. Maddalena A, Richards CS, McGinniss MJ, Brothman A, Desnick RJ, Grier RE, et al. Technical standards and guidelines for fragile X: the first of a series of disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. Quality Assurance Subcommittee of the Laboratory Practice Committee. *Genet Med*. juin 2001;3(3):200-5.
10. Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science*. 24 mai 1991;252(5009):1179-81.
11. Hunter J, Rivero-Arias O, Angelov A, Kim E, Fotheringham I, Leal J. Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet A*. juill 2014;164A(7):1648-58.
12. Sullivan SD, Welt C, Sherman S. *FMR1* and the continuum of primary ovarian insufficiency. *Semin Reprod Med*. juill 2011;29(4):299-307.
13. Banks N, Patounakis G, Devine K, DeCherney AH, Widra E, Levens ED, et al. Is *FMR1* CGG repeat length a predictor of in vitro fertilization stimulation response or outcome? *Fertil Steril*. 2016;105(6):1537-1546.e8.
14. Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, McConkie-Rosell A, Welt CK, Rebar RW, et al. The *FMR1* premutation and reproduction. *Fertil Steril*. mars 2007;87(3):456-65.
15. Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C, et al. IOP. *Am J Med Genet*. 2 avr 1999;83(4):322-5.
16. Sherman SL. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 2000;97(3):189-94.
17. De Caro JJ, Dominguez C, Sherman SL. Reproductive health of adolescent girls who carry the *FMR1* premutation: expected phenotype based on current knowledge of

- fragile x-associated primary ovarian insufficiency. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1135:99- 111.
18. Sullivan SD, Welt C, Sherman S. *FMR1* and the continuum of primary ovarian insufficiency. *Semin Reprod Med.* juill 2011;29(4):299- 307.
 19. Męczekalski B, Maciejewska-Jeske M, Podfigurna A. Reproduction in premature ovarian insufficiency patients - from latest studies to therapeutic approach. *Prz Menopauzalny.* sept 2018;17(3):117- 9.
 20. Daan NMP, Hoek A, Corpeleijn E, Eijkemans MJC, Broekmans FJ, Fauser BCJM, et al. Reproductive characteristics of women diagnosed with premature ovarian insufficiency. *Reprod Biomed Online.* févr 2016;32(2):225- 32.
 21. Hipp HS, Charen KH, Spencer JB, Allen EG, Sherman SL. Reproductive and gynecologic care of women with fragile X primary ovarian insufficiency (FXPOI). *Menopause.* 2016;23(9):993-9.
 22. Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein MP, et al. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the *FMR1* premutation. *Hum Reprod.* août 2007;22(8):2142- 52.
 23. Mailick MR, Hong J, Greenberg J, Smith L, Sherman S. Curvilinear association of CGG repeats and age at menopause in women with *FMR1* premutation expansions. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* déc 2014;165B(8):705- 11.
 24. Ennis S, Ward D, Murray A. Nonlinear association between CGG repeat number and age of menopause in *FMR1* premutation carriers. *Eur J Hum Genet.* févr 2006;14(2):253- 5.
 25. Allen EG, Glicksman A, Tortora N, Charen K, He W, Amin A, et al. FXPOI: Pattern of AGG Interruptions Does not Show an Association With Age at Amenorrhea Among Women With a Premutation. *Front Genet.* 2018;9:292.
 26. Elizur S, Berkenstadt M, Ries-Levavi L, Gruber N, Pinhas-Hamiel O, Hassin-Baer S, et al. [*FMR1* PREMUTATION CARRIERS - ARE THEY REALLY ASYMPTOMATIC?]. *Harefuah.* avr 2018;157(4):241-4.
 27. Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein MP, et al. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the *FMR1* premutation. *Hum Reprod.* août 2007;22(8):2142- 52.
 28. Fragile X premutation RNA is sufficient to cause primary ovarian insufficiency in mice. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 3 juin 2019]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=%3A+Fragile+X+premutation+RNA+is+sufficient+to+cause+primary+ovarian+insufficiency+in+mice>
 29. Coffey SM, Cook K, Tartaglia N, Tassone F, Nguyen DV, Pan R, et al. Expanded clinical phenotype of women with the *FMR1* premutation. *Am J Med Genet A.* 15 avr 2008;146A(8):1009- 16.
 30. Salcedo-Arellano MJ, Hagerman RJ, Martinez-Cerdeno V. [Fragile X associated tremor/ataxia syndrome: its clinical presentation, pathology, and treatment]. *Rev Neurol.* 1 mars 2019;68(5):199- 206.
 31. Wang Z, Khemani P, Schmitt LM, Lui S, Mosconi MW. Static and dynamic postural control deficits in aging fragile X mental retardation 1 (*FMR1*) gene premutation carriers. *J Neurodev Disord.* 21 janv 2019;11(1):2.
 32. Alvarez-Mora MI, Podlesniy P, Gelpi E, Hukema R, Madrigal I, Pagonabarraga J, et al. FXTAS: regional decrease of mitochondrial DNA copy number relates to clinical manifestations. *Genes Brain Behav.* 18 mars 2019;e12565.
 33. Hessel D, Tassone F, Loesch DZ, Berry-Kravis E, Leehey MA, Gane LW, et al. Abnormal elevation of *FMR1* mRNA is associated with psychological symptoms in

- individuals with the fragile X premutation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 5 nov 2005;139B(1):115- 21.
34. Shelton AL, Cornish K, Fielding J. Long term verbal memory recall deficits in fragile X premutation females. *Neurobiol Learn Mem.* oct 2017;144:131-5.
35. Tonnsen BL, Wheeler AC, Hamrick LR, Roberts JE. Infant Temperament in the *FMR1* Premutation and Fragile X Syndrome. *J Clin Child Adolesc Psychol.* 5 nov 2018;1-11.
36. Chonchaiya W, Tassone F, Ashwood P, Hessler D, Schneider A, Campos L, et al. Autoimmune disease in mothers with the *FMR1* premutation is associated with seizures in their children with fragile X syndrome. *Hum Genet.* nov 2010;128(5):539- 48.
37. Richardson MC, Guo M, Fauser BCJM, Macklon NS. Environmental and developmental origins of ovarian reserve. *Hum Reprod Update.* juin 2014;20(3):353- 69.
38. Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science.* 24 mai 1991;252(5009):1097- 102.
39. Bell MV, Hirst MC, Nakahori Y, MacKinnon RN, Roche A, Flint TJ, et al. Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell.* 22 févr 1991;64(4):861- 6.
40. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, et al. Identification of a gene (*FMR-1*) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell.* 31 mai 1991;65(5):905- 14.
41. Vincent A, Heitz D, Petit C, Kretz C, Oberlé I, Mandel JL. Abnormal pattern detected in fragile-X patients by pulsed-field gel electrophoresis. *Nature.* 14 févr 1991;349(6310):624- 6.
42. Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, et al. Microarray identification of *FMRP*-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell.* 16 nov 2001;107(4):477- 87.
43. Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell.* 16 nov 2001;107(4):489- 99.
44. Jiraanont P, Kumar M, Tang H-T, Espinal G, Hagerman PJ, Hagerman RJ, et al. Size and methylation mosaicism in males with Fragile X syndrome. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(11):1023- 32.
45. Brasa S, Mueller A, Jacquemont S, Hahne F, Rozenberg I, Peters T, et al. Reciprocal changes in DNA methylation and hydroxymethylation and a broad repressive epigenetic switch characterize *FMR1* transcriptional silencing in fragile X syndrome. *Clin Epigenetics.* 2016;8:15.
46. Devys D, Biancalana V, Rousseau F, Boué J, Mandel JL, Oberlé I. Analysis of full fragile X mutations in fetal tissues and monozygotic twins indicate that abnormal methylation and somatic heterogeneity are established early in development. *Am J Med Genet.* 15 mai 1992;43(1- 2):208- 16.
47. Musci TJ, Moyer K. Prenatal carrier testing for fragile X: counseling issues and challenges. *Obstet Gynecol Clin North Am.* mars 2010;37(1):61- 70, Table of Contents.
48. Mak AS, Leung KY. Challenges in prenatal screening and counselling for fragile X syndrome. *Hong Kong Med J.* 2017;23(2):108- 9.
49. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature.* 19 avr 1990;344(6268):768- 70.

50. Handyside AH. Preimplantation genetic diagnosis after 20 years. *Reprod Biomed Online*. sept 2010;21(3):280-2.
51. Harper JC, Wells D, Piyamongkol W, Abou-Sleiman P, Apessos A, Ioulianos A, et al. Preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders: experience with five single gene disorders. *Prenat Diagn*. juin 2002;22(6):525-33.
52. Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RM, Handyside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod*. août 1990;5(6):708-14.
53. Brezina PR. Preimplantation genetic testing in the 21st century: uncharted territory. *Clin Med Insights Reprod Health*. 10 févr 2013;7:17-21.
54. Liss J, Chromik I, Szczyglińska J, Jagiełło M, Łukaszuk A, Łukaszuk K. Current methods for preimplantation genetic diagnosis. *Ginekol Pol*. 2016;87(7):522-6.
55. Piyamongkol W, Bermúdez MG, Harper JC, Wells D. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod*. juill 2003;9(7):411-20.
56. Reyniers E, Vits L, De Boulle K, Van Roy B, Van Velzen D, de Graaff E, et al. The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nat Genet*. juin 1993;4(2):143-6.
57. Dreesen JC, Geraedts JP, Dumoulin JC, Evers JL, Pieters MH. RS46(DXS548) genotyping of reproductive cells: approaching preimplantation testing of the fragile-X syndrome. *Hum Genet*. sept 1995;96(3):323-9.
58. Sermon K, Seneca S, Vanderfaeillie A, Lissens W, Joris H, Vandervorst M, et al. Preimplantation diagnosis for fragile X syndrome based on the detection of the non-expanded paternal and maternal CGG. *Prenat Diagn*. déc 1999;19(13):1223-30.
59. Harper JC, Wells D, Piyamongkol W, Abou-Sleiman P, Apessos A, Ioulianos A, et al. Preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders: experience with five single gene disorders. *Prenat Diagn*. juin 2002;22(6):525-33.
60. Sermon K, Seneca S, Vanderfaeillie A, Lissens W, Joris H, Vandervorst M, et al. Preimplantation diagnosis for fragile X syndrome based on the detection of the non-expanded paternal and maternal CGG. *Prenat Diagn*. déc 1999;19(13):1223-30.
61. Apessos A, Abou-Sleiman PM, Harper JC, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis of the fragile X syndrome by use of linked polymorphic markers. *Prenat Diagn*. juin 2001;21(6):504-11.
62. Malcov M, Naiman T, Yosef DB, Carmon A, Mey-Raz N, Amit A, et al. Preimplantation genetic diagnosis for fragile X syndrome using multiplex nested PCR. *Reprod Biomed Online*. avr 2007;14(4):515-21.
63. Reches A, Malcov M, Ben-Yosef D, Azem F, Amit A, Yaron Y. Preimplantation genetic diagnosis for fragile X syndrome: is there increased transmission of abnormal *FMR1* alleles among female heterozygotes? *Prenat Diagn*. janv 2009;29(1):57-61.
64. Burlet P, Frydman N, Gigarel N, Kerbrat V, Tachdjian G, Feyereisen E, et al. Multiple displacement amplification improves PGD for fragile X syndrome. *Mol Hum Reprod*. oct 2006;12(10):647-52.
65. Kieffer E, Nicod J-C, Gardes N, Kastner C, Becker N, Celebi C, et al. Improving preimplantation genetic diagnosis for Fragile X syndrome: two new powerful single-round multiplex indirect and direct tests. *Eur J Hum Genet*. févr 2016;24(2):221-7.
66. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res*. 2004;6(3):R149-

156.

67. Ho JR, Woo I, Louie K, Salem W, Jabara SI, Bendikson KA, et al. A comparison of live birth rates and perinatal outcomes between cryopreserved oocytes and cryopreserved embryos. *J Assist Reprod Genet.* oct 2017;34(10):1359-66.
68. Stoop D, Ermini B, Polyzos NP, Haentjens P, De Vos M, Verheyen G, et al. Reproductive potential of a metaphase II oocyte retrieved after ovarian stimulation: an analysis of 23 354 ICSI cycles. *Hum Reprod.* juill 2012;27(7):2030-5.
69. [In vitro maturation of oocytes: an option for fertility preservation in women]. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 3 juin 2019]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21232880>
70. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 3 juin 2019]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15488215>
71. Donnez J, Dolmans M-M. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet.* août 2015;32(8):1167-70.
72. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* déc 2018;62:2-10.
73. Vabre P, Gatimel N, Moreau J, Gayrard V, Picard-Hagen N, Parinaud J, et al. Environmental pollutants, a possible etiology for premature ovarian insufficiency: a narrative review of animal and human data. *Environ Health.* 07 2017;16(1):37.
74. Vaughan DA, Leung A, Resetkova N, Ruthazer R, Penzias AS, Sakkas D, et al. How many oocytes are optimal to achieve multiple live births with one stimulation cycle? The one-and-done approach. *Fertil Steril.* 2017;107(2):397-404.e3.
75. Lemmen JG, Rodríguez NM, Andreasen LD, Loft A, Ziebe S. The total pregnancy potential per oocyte aspiration after assisted reproduction-in how many cycles are biologically competent oocytes available? *J Assist Reprod Genet.* juill 2016;33(7):849-54.
76. Avraham S, Almog B, Reches A, Zakar L, Malcov M, Sokolov A, et al. The ovarian response in fragile X patients and premutation carriers undergoing IVF-PGD: reappraisal. *Hum Reprod.* 01 2017;32(7):1508-11.
77. Banks N, Patounakis G, Devine K, DeCherney AH, Widra E, Levens ED, et al. Is *FMR1* CGG repeat length a predictor of in vitro fertilization stimulation response or outcome? *Fertil Steril.* 2016;105(6):1537-1546.e8.
78. Morin SJ, Tiegs AW, Franasiak JM, Juneau CR, Hong KH, Werner MD, et al. *FMR1* gene CGG repeat variation within the normal range is not predictive of ovarian response in IVF cycles. *Reprod Biomed Online.* mai 2016;32(5):496-502.
79. Pastore LM, Christianson MS, McGuinness B, Vaught KC, Maher JY, Kearns WG. Does the *FMR1* gene affect IVF success? *Reprod Biomed Online.* avr 2019;38(4):560-9.
80. Gallot V, Berwanger da Silva AL, Genro V, Grynberg M, Frydman N, Fanchin R. Antral follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone administration assessed by the Follicular Output RaTe (FORT) may predict in vitro fertilization-embryo transfer outcome. *Hum Reprod.* avr 2012;27(4):1066-72.
81. Genro VK, Grynberg M, Scheffer JB, Roux I, Frydman R, Fanchin R. Serum anti-Müllerian hormone levels are negatively related to Follicular Output RaTe (FORT) in normo-cycling women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod.* mars 2011;26(3):671-7.
82. Cobo A, García-Velasco JA, Coello A, Domingo J, Pellicer A, Remohí J. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril.* mars

2016;105(3):755-764.e8.

83. Cobo A, García-Velasco J, Domingo J, Pellicer A, Remohí J. Elective and Onco-fertility preservation: factors related to IVF outcomes. *Hum Reprod.* 01 2018;33(12):2222-31.

84. Santos M, Cordts EB, Bianco B, Barbosa CP, Christofolini DM. Oocyte Quality in Patients with Increased FSH Levels. *JBRA Assist Reprod.* 1 nov 2015;19(4):227-9.

85. Hutchinson AP, Pereira N, Lilienthal DP, Coveney S, Lekovich JP, Elias RT, et al. Impact of *FMR1* Pre-Mutation Status on Blastocyst Development in Patients Undergoing Pre-Implantation Genetic Diagnosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2018;83(1):23-8.

ABSTRACT

Preimplantation diagnosis and mutation *FMR1*: what are the chances of obtaining a healthy embryo according to the number of mature oocytes obtained.

Introduction:

Fragile X syndrome is a disease linked to an expansion of CGG triplets of the *FMR1* gene. Women with pre-mutation or complete mutation of the *FMR1* gene are at risk of transmitting the genetic abnormality to their offspring often accompanied by an increase in triplet expansion. They may have recourse, if they wish, to a prenatal diagnosis or a pre-implantation genetic diagnosis (PGD). The main objective of this work is to define the probability of obtaining a healthy embryo to be transferred according to the number of mature oocytes obtained during stimulation for PGD.

Material and methods :

This retrospective study included all patients who had PGD for pre-mutation or complete *FMR1* mutation in our center between 2006 and December 2018. 85 cycles for XFRA DPI were analyzed for 33 patients. For each stimulation cycle for DPI, a number of mature oocytes and healthy embryos obtained. Using this data, we created a VBA analysis to estimate the probability of obtaining at least one healthy embryo given the number of mature oocytes obtained at the puncture only. We then repeated the analysis according to the age of the patient (greater or less than 35 years old).

Results:

Obtaining less than 3 mature oocytes almost makes it impossible to obtain a healthy embryo to be transferred regardless of the age of the patient. For patient over 35 years old, the analysis showed that with less than 6 mature oocytes the chances of getting a healthy embryo to transfer are very low. In addition, at over 35 years of age, there will never be more than a 50% chance of obtaining at least one healthy embryo regardless of the number of mature oocytes collected. The results were in favor of PGD on at least 13 mature oocytes collected fresh or cryopreserved.

Thus, in our XFRA PF population of the Antoine Béclère Hospital, an average of fifteen mature oocytes were obtained and the patients were all less than 35 years old at the time of their preservation, so in theory, they had about a 70% chance of getting at least one healthy embryo

Conclusion:

Our results showed that FP for premutation *FMR1* is feasible. This enables us to inform couples about the chances of obtaining a healthy embryo according to the number of mature eggs that can be used. This information will help couples to choose between DPN and DPI.

Key words: *FMR1*, X fragile, preimplantation genetic diagnosis, fertility preservation, embryo, healthy

Diagnostic préimplantatoire et mutation *FMR1* : Quelles sont les chances d'obtenir un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures obtenus

Introduction :

Le syndrome de l'X fragile est une maladie liée à une expansion de triplets CGG du gène *FMR1*. Les femmes porteuses d'une pré-mutation ou d'une mutation complète du gène *FMR1* présentent un risque de transmission de l'anomalie génétique à leur descendance s'accompagnant fréquemment d'une augmentation de l'expansion de triplets. Elles peuvent avoir recours, si elles le souhaitent, à un diagnostic prénatal ou un diagnostic génétique préimplantatoire (DPI). L'objectif principal de ce travail était de définir la probabilité d'obtenir un embryon sain à transférer en fonction du nombre d'ovocytes matures obtenus lors d'une stimulation pour DPI.

Matériel et méthodes :

Toutes les patientes ayant bénéficié d'un DPI pour pré-mutation ou mutation complète *FMR1* dans notre centre entre 2006 et Décembre 2018 ont été incluses dans cette étude rétrospective. 85 cycles pour XFRA DPI ont été analysés pour 33 patientes. Pour chaque cycle de stimulation pour DPI, un nombre d'ovocytes matures et d'embryons sains obtenus. Grâce à ces données une analyse VBA (visual basic for Applications) sur Excel a permis de déterminer la probabilité d'obtenir au moins un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures obtenu à la ponction, sans tenir compte de l'âge de la patiente puis par analyse en sous-groupe en fonction de l'âge (plus ou moins de 35ans).

Résultats :

Le recueil de moins de 3 ovocytes matures ne permettrait pas d'obtenir d'embryon sain à transférer quel que soit l'âge de la patiente. L'analyse en sous-groupe selon l'âge de plus ou moins 35 ans montre que le recueil de moins de 6 ovocytes matures ne permettrait pas d'obtenir d'embryon sain à transférer pour les patientes de plus de 35 ans. De plus, à plus de 35ans, il n'y aura jamais plus de 50% de chance d'obtenir au moins un embryon sain quel que soit le nombre d'ovocytes matures recueillis. Les résultats sont en faveur du DPI sur au moins 13 ovocytes matures recueillis en frais ou cryoconservés.

Ainsi, dans notre population XFRA PF de l'hôpital Antoine Béchère, il a été obtenu en moyenne une quinzaine d'ovocytes matures et les patientes ont toutes moins de 35 ans au moment de leur préservation, donc en théorie environ 70% de chance d'obtenir au moins un embryon sain.

Conclusion :

Nos résultats ont permis de montrer que la préservation de fertilité pour pré-mutation *FMR1* était réalisable ainsi que d'informer les couples sur les chances d'obtenir un embryon sain en fonction du nombre d'ovocytes matures utilisables après décongélation ovocytaires. Ces informations permettront d'aider les couples à choisir entre DPN et DPI.

Mots-clés: *FMR1*, X fragile, diagnostic préimplantatoire, préservation fertilité, embryon, sain.

Université Paris Descartes
Faculté de Médecine Paris Descartes
15, rue de l'Ecole de Médecine 75270 Paris cedex 06