



RAPPORT ANNUEL 2012 – 2014

Commission **F**édérale
pour la recherche médicale et scientifique
sur les **E**mbryons in vitro (**CFE**)



Préambule

Nous avons le plaisir de vous présenter le nouveau rapport annuel de la Commission fédérale Embryons. Le présent rapport couvre la période du 1er janvier 2012 au 31 décembre 2014.

Conformément aux dispositions de la loi du 11 mai 2003, la « Commission fédérale pour la recherche médicale et scientifique sur les embryons in vitro » (dorénavant appelée CFE) est tenue de remettre un rapport annuel de ses activités au Sénat. Depuis la loi du 06/01/2014, le rapport annuel doit être déposé au Sénat ainsi qu'à la Chambre des Représentants.

Il s'agit ici du quatrième rapport annuel de la CFE.

- Le premier rapport annuel portait sur la période 2006-2008.*
- Le deuxième rapport annuel traitait de la période allant de 2008 au 30 juin 2010.*
- Le troisième rapport annuel concernait la période de juillet 2010 au 31 décembre 2011.*

Le rapport annuel 2012-2014 a été établi par le président, la vice-présidente et le secrétaire scientifique, et a été approuvé par la CFE en sa séance du 07/12/2015.

Nous vous en souhaitons bonne lecture.



André Van Steirteghem
Président



Bénédicte Jacobs
Vice-présidente

Table des matières

I. COMPOSITION DE LA CFE EN 2012-2014	7
I.1. Le Bureau exécutif.....	7
I.2. Les membres de la Commission.....	7
I.3. Secrétariat.....	8
II. LA CFE EN PRATIQUE	9
II.1. Réunions de la CFE	9
II.2 Rapport financier	9
II.3 Communication interne	9
III. FONCTION D'INFORMATION DE LA CFE	10
IV. FONCTION D'AVIS DE LA COMMISSION	11
IV.1. Avis de la CFE pendant la période 2012-2014	11
IV.2. Questions posées à la CFE	26
V. FONCTION DE SUIVI DE LA CFE	29
V.1. Suivi scientifique.....	29
V.2. Suivi éthique.....	30
V.3. Suivi juridique	30
V.4. Participation aux séminaires, colloques et conférences.....	65
VI. SYMPOSIUMS DE LA CFE.....	66
VII. POINTS D'ATTENTION.....	67
VIII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	67
IX. ANNEXES	69
Annexe 1. Présences aux réunions de la Commission fédérale pour la recherche médicale et scientifique sur les embryons in vitro en 2008 – 2011	70
Annexe 2. Composition de la Commission fédérale (Avis officiels au Moniteur belge des 31/03/2006 et 05/12/2008).....	74
Annexe 3. Aperçu des avis de la CFE au cours de la période 2008-2011	75
Annexe 4. Aperçu de l'utilisation d'embryons et d'ovules à des fins de recherche scientifique, sur la base de formulaires de suivi.....	80



I. Composition de la CFE en 2012-2014

La Commission doit se composer de 14 membres effectifs, tel que prévu par la loi du 11 mai 2003, art. 9 §2. Les membres sont désignés par le Sénat (MB 31/03/2006, p. 18045 ; 5/12/08, p. 124) et sont répartis comme suit, conformément à la loi : 4 docteurs en médecine, 4 docteurs en sciences, 2 juristes et 4 experts en questions éthiques et en sciences sociales. Il convient de désigner, pour chaque membre effectif, un membre suppléant qui possède les mêmes qualifications.

Depuis la loi du 06/01/2014, ce n'est plus le Sénat mais la Chambre des Représentants qui désigne les membres et les suppléants de la CFE.

Il est veillé, dans la composition de la commission, à la représentation équilibrée des différentes tendances idéologiques et philosophiques. La commission ne peut compter moins d'un tiers des membres de chaque sexe et doit comporter autant de membres d'expression française que de membres d'expression néerlandaise. Leur mandat a une durée de 4 ans.

Le président et le vice-président, pour la période couverte par le présent rapport, ont été élus en séance plénière du 10 juin 2012 (RP 47).

L'AR du 22/09/2004 fixant les moyens administratifs et financiers qui sont attribués à la CFE a été publié le 21/10/2004 (2004/22801). Depuis son installation en 2006, la CFE prend à cœur les missions qui lui ont légalement été attribuées.

1.1. Le Bureau exécutif

Le Bureau exécutif se compose des membres suivants :

Président :

André Van Steirteghem, professeur émérite à la Vrije Universiteit Brussel

Vice-présidente :

Bénédicte Jacobs, juriste

Le secrétariat se compose de secrétaires scientifiques et administratives. Conformément à la loi, le président et le vice-président appartiennent à un rôle linguistique différent et exercent leur fonction pour une durée de deux ans.

1.2. Les membres de la Commission

Les membres tant effectifs que suppléants sont invités aux réunions plénières. Les membres suppléants sont encouragés à participer de manière effective à toutes les activités de la CFE.

Comme déjà dit précédemment, les membres de la Commission sont nommés pour un mandat de 4 ans. Leur mandat est renouvelable (article 9, § 3 de la loi du 11 mai 2003 relative à la recherche sur les embryons in vitro).

En 2008, 9 nouveaux membres furent nommés. Voir publication au Moniteur belge du 05/12/2008, Éd.3, p. 124, annexe 1.

Le mandat des membres de la CFE nommés en 2006 expirait en 2010 et, conformément aux dispositions légales, une nouvelle Commission devait donc être constituée en 2010.

En raison d'un nombre insuffisant de candidatures et d'un retard administratif au niveau du Sénat, les nouveaux membres de la CFE furent nommés le 21/06/2012.

Après un nouvel appel, les candidats manquants – deux médecins d'expression française, un docteur en sciences d'expression française, un juriste d'expression française et trois experts en questions éthiques et en sciences sociales (2 NL. et 1 Fr.) – furent nommés le 27/11/2013.

Des appels à candidatures furent publiés au Moniteur belge les 18/11/2009, 18/03/2010, 09/08/2011 et 16/10/2012. En dépit de ces quatre appels, le nombre de candidatures introduites ne fut jamais suffisant pour nommer tous les membres effectifs et suppléants.

Le tableau 1 donne la composition de la CFE pour la période couverte par le présent rapport.

Tableau 1 : Composition de la Commission fédérale (Avis officiels au Moniteur belge du 27/11/2013)

Docteurs en médecine - Artsen	
André VAN STEIRTEGHEM - Président (NL)	Paul COSYNS (FR)
Jean-Jacques CASSIMAN (NL)	Thomas D'HOOGHE (NL)
Fabienne DEVREKER (FR)	Marc DHONT (NL)
Sophie PERRIER d'HAUTERIVE (FR)	
Docteurs en Sciences – Doctors in Wetenschappen	
Usha Rani PUNJABI (NL)	Björn HEINDRICKX (NL)
Sophie DEBROCK (NL)	Karen SERMON (NL)
Caroline JOUAN (FR)	Henri ALEXANDRE (FR)
Yves SZNAJER (FR)	
Juristes – Juristen	
Herman NYS (NL)	Diego FORNACIARI (NL)
Bénédicte JACOBS – Vice-présidente (FR)	Jean-Marc HAUSMAN (FR)
Experts en questions éthiques et en sciences sociales Deskundigen in de ethische problemen en de sociale wetenschappen	
Guido PENNINGES (NL)	Heidi MERTES (NL)
Robert RUBENS (NL)	Hilde VAN DEVELDE (NL)
Marie-Geneviève PINSART (FR)	Mme Françoise CAILLEAU (FR)
M. Laurent RAVEZ (FR)	Tatjana POPLAZAROVA (FR)

I.3. Le secrétariat

Conformément à la loi du 03/10/2008, le secrétariat devrait se composer d'un secrétaire scientifique de niveau A3 et d'un secrétaire adjoint de niveau B.

Depuis le début de la CFE, la situation relative au secrétariat était instable, donnant ainsi lieu à plusieurs changements au niveau du personnel. En l'espace de cinq ans, cinq personnes différentes ont en effet occupé ces deux fonctions.

II. La CFE dans la pratique

II.1. Réunions de la CFE

La CFE se réunit tous les mois, à l'exception de juillet et août. Toutes les réunions ont lieu à Eurostation, Bloc II, Place Victor Horta 40 à 1060 Bruxelles. La CFE y dispose de salles de réunion en suffisance. À l'avenir, la CFE souhaite qu'il en soit de même.

La participation aux réunions (du 1er janvier 2012 au 31 décembre 2014) est décrite en annexe 1.

Outre les réunions plénières, il y a aussi les réunions du Bureau. Au cours de la période visée ici, le Bureau s'est réuni à 28 reprises.

II.2 Rapport financier

Le fonctionnement de la CFE est supporté par le budget du SPF Santé publique ;

Les dépenses de 2012, 2013 et 2014 s'élèvent respectivement à :

Budget en 2012 : 14.539 €
en 2013 : 21.609 €
en 2014 : 17.974 €

Les frais inhérents à l'utilisation d'e-Comm (Be-Connected) ont également été comptabilisés. Les publications et les traductions officielles des rapports pour le site web de la CFE réduiront davantage encore le budget.

II.3. Communication interne

Le portail électronique Be-Connected permet aux membres de la CFE de bénéficier d'une communication sécurisée et de consulter des fichiers parfois très importants qui bloquent les boîtes de courrier électronique lorsqu'on les envoie. Cette application étant peu utilisée, elle a été fermée en 2014 pour la CFE.

Le secrétariat dispose du logiciel EndNote. Celui-ci permet un classement et une mise en page rapides d'une partie des informations du suivi scientifique. Afin de rendre le fonctionnement de la CFE plus transparent, le secrétariat renouvelle régulièrement le site web (www.FCE-CFE.be; www.embryos.be).

Pas connecté. » Se connecter Home | A propos de nous | Nouvelles | RSS | Site map | Contact



Commission Fédérale
pour la recherche médicale
et scientifique sur les
embryons *in vitro*

Ma santé | Sécurité alimentaire | Soins de santé | Animaux et végétaux | Environnement

Home / Soins de santé / Structures de concertation / Commissions / Embryon in vitro

Chercher

dans "Embryon in vitro"
 Recherche avancée

Mission, composition et fonctionnement de la Commission

Focus sur les Comités d'éthique locaux

Rapports annuels d'activités

Documents associés

- Législation (4)
- FAQ (1)
- Formulaires (2)

Plus sur ce thème

- [Demande d'un avis \(HTML\)](#)
- [Emission d'un avis \(HTML\)](#)
- [Symposium 8 novembre 2013](#)

La Commission Fédérale Embryons (CFE)

Réunions plénières agenda 2014

- Lundi 24 mars 2014
- Lundi 28 avril 2014
- Lundi 26 mai 2014
- Lundi 23 juin 2014
- Lundi 15 septembre 2014
- Lundi 20 octobre 2014
- Lundi 08 décembre 2014

III. Fonction d'information de la CFE

La fonction d'information de la CFE est double :

1. Informer le Gouvernement, le Parlement les Conseils des Communautés et le public
2. Élaborer et tenir à jour un système de documentation et d'information

La mission d'information que la Commission fédérale Embryons doit remplir à l'égard des Autorités a donné lieu au présent rapport annuel.

Les questions posées à la Commission sont traitées par le secrétariat, après avis de la CFE.

En ce qui concerne la centralisation de la documentation et des informations relatives à la recherche sur les embryons in vitro en Belgique, un inventaire le plus exhaustif possible est réalisé quant aux études en cours et des études terminées, et ce en vue d'une transparence totale.

IV. Fonction de la Commission

IV.1. Avis de la CFE pour la période 2012-2014

La commission a mis en place un protocole précis pour l'examen des divers avis qui lui sont soumis :

- Le projet est adressé au secrétariat de la commission qui demande ensuite au bureau de désigner un ou deux rapporteur(s) par projet, ces rapporteurs étant choisis en fonction de leur compétences personnelles. Ils peuvent ainsi examiner le projet avant la séance plénière et faire part, lors de cette réunion, de leurs éventuelles observations quant au respect ou non des conditions imposées par la loi pour pouvoir précéder à la validation ou non du projet.
- Lors de la séance plénière, les chercheurs sont invités à venir présenter personnellement leur projet. À l'occasion de cette présentation, les membres de la commission peuvent poser toutes les questions qu'ils estiment utile pour être en mesure d'examiner le bienfondé du projet de recherche. Le cas échéant, il leur est fait part des éléments supplémentaires susceptibles de devoir être apportés pour permettre à la commission de prendre sa décision valablement.
- Après la présentation, en l'absence des chercheurs et des membres qui seraient éventuellement liés au projet, la commission débat du projet et prend sa décision. Si le dossier est complet, l'avis sera envoyé immédiatement. Si le dossier doit être complété, le vote peut être reporté à une réunion ultérieure. Le cas échéant, la commission peut également valider temporairement le projet à la condition de recevoir rapidement les quelques éléments manquants lorsque ces derniers ne sont pas significatifs et n'empêchent pas la prise de décision.
- Il convient de rappeler que les avis de la commission sont liants : un projet qui reçoit un avis négatif ne pourra pas être exécuté.

En 2012-2014, la CFE a reçu 9 nouvelles demandes d'avis. Vous trouverez ci-dessous une brève description de ces demandes d'avis.

Les avis de la CFE sont numérotés et répertoriés comme suit : « ADV_xxx », où xxx représente le numéro de l'avis.

Pour chaque avis, le rapport reprend les informations suivantes :

- Titre du projet
- Nom des chercheurs
- Institution où la recherche est réalisée
- Durée du projet : date de début et de fin. La date de début est la date à laquelle le projet est approuvé
- Description du projet

Adv041 UZBRUSSEL et UZANTWERPEN et UZGENT

Titre du projet :

« Anecova NCvd19H study: A prospective, multicentre, randomized, open study to assess the effect of in vivo development using the Anecova technology as compared to in vitro culture in patients with subfertility undergoing assisted reproductive medical treatment »

Nom des chercheurs :

Pr Christophe Blockeel, Pr Luc Delbeke, Pr Petra De Sutter

Institution :

Centre de génétique médicale, 1) Centre de Reproduction Humaine (CRG); Département Embryologie et Génétique (EMGE), UZ Brussel, UZAntwerpen

Durée du projet :

05/2012 – 09/2013

Description du projet :

NCvd19H is a performance study aiming to assess the feasibility and the effect of the in vivo development of embryos using the Anecova technology in terms of implantation rate with a sibling oocyte randomization distribution in 2 arms: one in vivo culture arm and one in vitro culture arm.

The primary objective of the study is to determine the effect of using Anecova-d device on embryo developmental competency, through the observation of the implantation rate, for subjects with subfertility as compared to standard in vitro culture. The secondary objectives are to assess the embryo quality at the transfer day, the proportion of good-quality embryos available for transfer, the fertilization rate (when possible, depending the step or arm of the study), the cleavage rate (when possible, depending the step or arm of the study), the chemical and clinical pregnancy rates and the safety in this population.

Avis de la commission favorable rendu le 10/07/2012.

Titre du projet :

« Understanding embryonic chromosome instability and the origins of genetic variation by genome and transcriptome sequencing of human in vitro fertilised preimplantation embryos. »

Nom des chercheurs :

Thomas D'Hooghe, Thierry Voet, Sophie Debrock, Joris Vermeesch, Niels Van der Aa

Institution :

UZ-KU Leuven, Centre de Fertilité universitaire (LUFC)
Centre de Génétique humaine (CME)

Durée du projet :

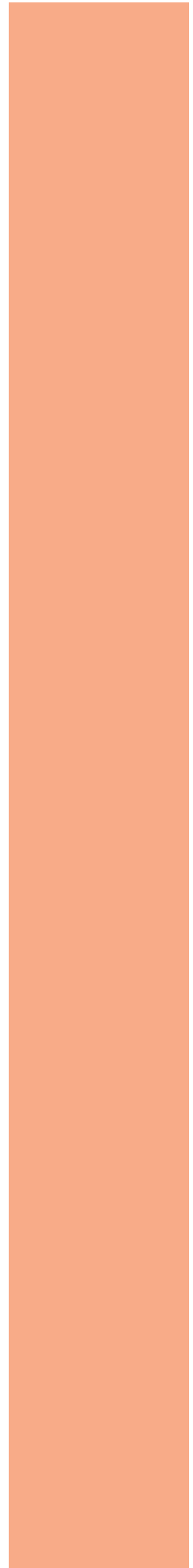
26/6/2012– 26/06/2016

Description du projet :

Pendant les divisions cellulaires d'embryons humains consécutives à la fertilisation in vitro (FIV), les blastomères développent fréquemment des aneuploïdies et des anomalies structurales de l'ADN de plusieurs mégabases, dont souvent des délétions chromosomiques terminales. Cette instabilité chromosomique (CIN) a été observée au moyen d'une technologie basse résolution qui étudie le génome d'une cellule. Nous formulons l'hypothèse que, pendant les divisions cellulaires d'embryogenèse humaine, une CIN peut également provoquer de (très) petites variantes d'ADN structurales de novo déséquilibrées, voire équilibrées, et autres mutations de point. Une CIN embryonnaire peut par conséquent contribuer à un spectre de situations, allant de la stérilité et la fausse couche à des maladies génomiques, à des variations génétiques, à un mosaïcisme génétique et une évolution du génome. Le projet a pour but de vérifier cette hypothèse et de déterminer les mécanismes et causes (moléculaires) sous-jacentes de la CIN embryonnaire. Pour ce faire, nous étudierons le génome et le transcriptome de cellules individuelles d'embryons humains préimplantatoires, en faisant appel à des technologies de séquençage ADN/ARN massif en parallèle haute résolution. Nous analyserons des embryons FIV de couples issus du programme de diagnostic génétique préimplantatoire (DPI) du Centre de Fertilité universitaire de Leuven (LUFC) et du Centre de Génétique humaine (CME) de la KU/UZ Leuven. L'utilisation de technologies de séquençage ADN massif en parallèle et les analyses de données bioinformatiques permettront d'établir la carte du génome des blastomères individuels de ces embryons. Les blastomères seront d'abord séquencés de manière « superficielle » pour déterminer les variations du nombre de copies ADN de manière mosaïque dans l'embryon. Ensuite, une sélection de cellules de ces embryons seront séquencées plus en profondeur afin d'examiner la variation structurale et la séquence ADN jusqu'au niveau de la paire de bases. L'analyse de ces données nous permettra de prouver que

la CIN embryonnaire provoque des variations génétiques, des maladies génétiques et une évolution du génome. Cela nous permettra de découvrir les mécanismes de la CIN embryonnaire. Les données de séquençage serviront également à prouver et étudier l'étiologie de syndromes de délétion terminale pendant l'embryogenèse humaine. Enfin, nous dresserons la carte du transcriptome de blastomères individuels dans le but de décoder les mécanismes moléculaires. Nous supposons que des transcrits importants pour la stabilité du génome sont sous- ou surexprimés dans des blastomères appartenant à plusieurs embryons d'un même couple, voire à un même embryon.

Avis de la commission favorable rendu le 17/09/2012.



Titre du projet :

« Evaluation and Implementation of Simulated Physiological Oocyte Maturation as cost-effective and safe assisted reproduction technology »

Nom des chercheurs :

Smitz Johan, Devos Michel, Anckaert Ellen, Guzman Luis, Verheyen Greta

Institution :

UZ Brussel, Centre de Reproduction humaine.

Durée du projet :

10/2012 – 09/2015

Description du projet :

UZ Brussel is investigating a novel in vitro culture method of In Vitro Maturation (IVM), using a Simulated Physiological Oocyte Maturation (SPOM) system, which has proven to result in significantly improved outcomes already in three animal models (Albuz et al, 2010; Smitz et al, 2011). SPOM is based on state of the art knowledge from the last 5 years, generated by highly recognized basic science laboratories (Conti, Eppig) and translational oocyte biology laboratories for veterinary (Univ. Adelaide) and human applications (VUB, Brussel). This SPOM system was introduced in IWT 70719 (2009-2012) and running under research lab conditions, but its safety and benefit over current IVM systems needs to be properly validated. In order to achieve improvements with SPOM, the project has a double aim: 1) in the Follicle Biology Laboratory (FOBI) additional science-based changes are implemented stepwise in the SPOM maturation medium, 2) the clinical center will include patients with different indications who sign consent (to donate part of their immature oocytes) in order to compare SPOM to conventional IVM (routinely used at UZ Brussel). To tackle both aims we will investigate the effect of changes in the composition of the IVM culture media and perform gene expression studies in granulosa and cumulus cells to identify key pathways of oocyte maturation and developmental potential. The molecular configuration of granulosa and cumulus cells should enable us to tailor the maturation system to the specific needs of oocytes from divergent follicular sizes, with the aim to increase the utilization rate of oocytes retrieved from ovaries without the use of high doses of gonadotropins.

The laboratory part of the clinical study will be done in the Assisted Reproduction Laboratory (head Mrs Greta Verheyen, PhD) of UZ Brussel. This laboratory is accredited. Hence, the laboratory functions following preset strict criteria. All procedures of this trial which are related to any optional transfer of biological material back to the patient will be performed in a strictly controlled environment. For the investigatio-

nal part of the project there are several experienced scientists who consented to provide their expertise: Dr. Ellen Anckaert, MD, PhD, to set up the methods for testing gene imprinting in human oocytes and embryos in collaboration with Dr Ir Martine Dereycke, Mr Luis Guzman, ESHRE certified clinical embryologist will do FISH and CGH on all blastomeres of 6-8 cell embryos (donated for research) to exclude any adverse influences of media components on nuclear and cytoplasmic maturation (under supervision of Prof Karen Sermon).

Justification de la création d'embryons aux fins de recherche :

The aim of the study is to improve the In Vitro Maturation Protocol for GV-oocytes (i.e. immature oocytes) aspirated from 2-10mm follicles in minimally stimulated cycles. The maturation medium contains pharmacological c-AMP modulators (Phosphodiesterase inhibitors, adenylylcyclase stimulators, recombinant-FSH and in near future potentially other oocyte secretion factors) to retard meiosis progression by a few hours to increase maturation. As in the human phosphodiesterases are differently expressed than in animals, there is a need in human to evaluate with the most sensitive available methods today the frequency of aneuploidy (FISH, CGH), and compare this rate to control human embryos (already established data obtained by VUB Genetics Department, Prof Karen Sermon).

For this reason the Ethics Committee granted us the permission to mature and fertilize oocytes from volunteering IVM patients (consenting patients who donated part of their immature oocytes). From these embryos (at Day 3) all blastomeres will be fixed and analyzed by CGH, the currently most sensitive method available. Embryos at day 5 will be biopsied (trophectoderm) to check if the correct imprinting patterns are present (estimated amount of blastocysts to be used: 25). As detailed in the research (TBM-IWT protocol in addendum) current and future follow-up studies in children will focus on obstetrical outcome and health of children born after modified IVM systems (by Clinical Genetics department at UZ Brussel).

The number of embryos to include will not exceed the minimal amount needed to convincingly evaluate the new maturation technique for meiotic (nuclear maturity) and mitotic errors (cytoplasmic maturity). It is expected that for each new combination of factors in culture medium we might need between 20 to 25 cleaving embryos in total (for CGH) coming from at least 10 different patients. The number of cases to be included will depend on the frequency whereby the culture medium composition needs to be optimized. Therefore the numbers in our table are an approximation. Planning that two media adaptations might be done the first year, and two the second year, requesting maximally 50 day 3 embryos for CGH analysis per year. For testing imprinting in blastocysts, 25 units are planned per media type: for 2 media compositions per year this means 50 embryos per year. For year 3 the planning will depend on two first years' results. Exact amounts will be yearly updated in our report to CFE-FCE and if a deviation is planned we will inform on beforehand.



Références:

- Albus FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG, Gilchrist RB. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. Hum Reprod. 2010 Dec;25(12):2999-3011. Epub 2010 Sep 24.
- Smitz JE, Thompson JG, Gilchrist RB. Semin Reprod Med. 2011 Jan;29(1):24-37. Epub 2011 Jan 4. The promise of in vitro maturation in assisted reproduction and fertility preservation.

Avis de la commission favorable rendu le 12/11/2012.

Titre du projet :

« De immunologie van implantatie »

Nom des chercheurs :

Van de Velde Hilde, Mackens Shari

Institution :

Universitair Ziekenhuis Brussel – Vrije Universiteit Brussel, Centre de Reproduction humaine (CRG), Immunologie de la Reproduction et Implantation (REIM)

Durée du projet :

04/2013 – 04/2017

Description du projet :

Embryo implantation has fascinated researchers for several decades. It is astonishing that an embryo with half its DNA material being foreign to the mother can implant and is tolerated throughout pregnancy without being rejected. It is clear that the immune system plays a crucial role, but the working mechanisms allowing implantation and pregnancy remain largely unknown. At the CRG of the UZBrussel, we have identified a patient population that has difficulties getting pregnant after repeated transfers of very good quality embryos, the so-called repeated implantation failure (RIF) patients. We believe that an inappropriate regulation of the uterine immune system at the moment of implantation might be responsible for these RIF. Mice studies recently pointed out an orchestrating role in implantation of a specific subset of uterine immunological cells: uterine dendritic cells (uDCs). In this project we will try to decode the involvement of the uDCs in normal implantation, as well as in implantation failure and recurrent miscarriage (RM) in the human. We will investigate the presence of cytokines in endometrial fluid and the expression of genes associated with implantation in endometrial biopsies. Samples will be obtained from fertile patients and RM/RIF patients in natural cycles and stimulated cycles close to the window of implantation. Finally we will develop an in vitro model for implantation using human embryos and endometrial tissue to further explore the role of DC-derived cytokines and steroids. Understanding the immunology of implantation will give new insights into the pathophysiology of RIF, recurrent miscarriage, intra-uterine growth restriction and preeclampsia.

Avis de la commission favorable rendu le 22/04/2013.

Titre du projet :

« Investigation of implantation regulators in the human embryo »

Nom des chercheurs :

Hilde Van de Velde, Asma Aberkane

Institution :

Universitair Ziekenhuis Brussel – Vrije Universiteit Brussel, Centre de Reproduction humaine (CRG), Immunologie de la Reproduction et Implantation (REIM)

Durée du projet :

01/04/2013 – 31/12/2016

Description du projet :

Implantation is a crucial process involving a highly regulated genetic and cellular interaction between the endometrium and the embryo and has to be carried out in an optimal time frame. In humans, implantation of the embryo occurs around day 7 after ovulation and involves three stages: apposition, adhesion and invasion. The mechanisms by which the human embryo implants remain poorly understood and represent a fundamental problem in reproductive biology. Human implantation is difficult to study seen the ethical and legal restrictions. According to the Belgian law, embryos can be cultured in vitro up to day 14 of development. We aim to set up an in vitro adhesion model to study molecular pathways involved in human implantation and establish markers with a clinical significance. These modulators may include adhesion molecules, cytokines, chemokines, immunological factors and hormones. Our established markers may become specific targets for implantation modulation (to improve or avoid (contraceptiva)) in the clinics. Also pathogenesis of repeated implantation failure (RIF) and recurrent miscarriage (RM) can be studied, which may lead to new diagnostic or maybe even therapeutic options. Human preimplantation embryos will be obtained for research at the Centre for Reproductive Medicine UZ Brussel (CRG) with the informed consent of the patients. We will mainly use embryos cryopreserved after preimplantation genetic diagnosis (PGD); they represent a unique cohort of embryos with a potential high implantation capacity since the parents are fertile. Also fresh PGD blastocysts affected after diagnosis on day 5 are an additional source of research material. In order to reduce the number of human embryos needed, we aim to use mouse embryos for the optimisation of the standard adhesion model.

Avis de la commission favorable rendu le 22/04/2013.

Titre du projet :

« Isolation of Hypoblast Stem Cells (HypoSC) from human embryos »

Nom des chercheurs :

Catherine Verfaillie, Thomas D'Hooghe, Antonio Lo Nigro

Institution :

KU Leuven, Institut de recherche sur les cellules souches

Durée du projet :

01/05/2013 – 30/04/2015

Description du projet :

Mammalian development involves the specification of three main cell lineages: trophoblast, hypoblast and epiblast. Trophoblast give rise to all trophoblast cell types, hypoblast forms the extraembryonic endoderm of the yolk sac and epiblast will form the amnion and the embryo proper, i.e. the "somatic" cells.

We have isolated and characterized new cell lines from rodent blastocysts, named Hypoblast Stem Cells (HypoSC), as they are derived as an Oct4+ population directly from blastocysts and resemble the nascent hypoblast, as confirmed by in vitro studies and in vivo studies (rodent HypoSC contributed to chimeric embryos after morula aggregation in mice). Importantly, rodent HypoSC can differentiate in vitro to hepatocyte- and Beta cell-like cells.

To date, there are no reports regarding isolation of equivalent cells from human blastocysts. We strongly believe that the isolation of human HypoSC may be an important tool for studying the extraembryonic compartment during human development. Importantly, based on new findings in developmental biology and our preliminary results from rodent isolations, we also believe that human HypoSC could be an alternative source, to the already available human ESC lines, for in vitro differentiation to endodermal cell-types, which may be useful for regenerative medicine and drug screening.

Avis de la commission favorable rendu le 27/05/2013.

Titre du projet :

« Evaluatie van groeps cultuur van humane embryo's volgens het run-dermodel met als doel de optimalisatie van de « Single Embryo Transfer » (SET) strategie »

Nom des chercheurs :

Petra De Sutter, Usha Punjabi, Goovaerts Ilse, Van Soom Ann, Wydoo-
ghe Eline

Institution :

Universitair Ziekenhuis Gent // Universitair Ziekenhuis Antwerpen,
Service Médecine de la Reproduction // Centre de Reproduction hu-
maine

Durée du projet :

01/10/2013 – 31/10/2015

Description du projet :

Depuis des années, la culture groupée d'embryons est appliquée en tant que méthode de référence pour certaines espèces animales dont les bovins, les porcs, les souris et les chats, mais un certain nombre de publications démontrent aussi que les embryons humains peuvent également tirer profit de cette culture en groupe. Dans la plupart des centres FIV européens, le suivi individuel des embryons prime, de sorte que la culture individuelle y est la norme. Récemment, deux systèmes de culture groupée ont été mis sur le marché, tous deux labellisés CE, à savoir Corral et WOW. Ces deux systèmes, de par leur configuration spécifique, permettent un suivi individuel des embryons. Les plaques Corral, mis dans le commerce par Sun IVF, Guelph, Canada, se composent de deux puits centraux, chacun divisé en quatre quadrants séparés d'une trame. Les pores de la trame sont d'une grandeur telle qu'ils permettent d'échanger le milieu tout en empêchant l'embryon humain de passer, ce qui garantit un suivi individuel des embryons. En 2000, Vajta et al. ont développé un système de culture groupée appelé 'Well of the Well' ou WOW : de petites échancrures en forme de V se forment suite à la pression délicate d'une aiguille chauffée sur le fond d'une boîte de Petri, et permettent de cultiver des embryons. L'avantage de ces plaques WOW est d'offrir un bon équilibre entre la nécessité d'avoir une concentration élevée en facteurs autocrines, une quantité suffisante de substances nutritives et une dilution suffisante de métabolites toxiques. Des plaques WOW munies d'un label CE ont récemment été mises dans le commerce (Primo Vision, Cryo Innovation et Vitrolife), avec 9 puits fabriqués dans une trame 3x3.

En raison d'un nombre limité d'embryons humains disponibles pour la recherche, il convient de commencer par des études sur l'amélioration des conditions de culture avec des embryons d'une autre espèce. C'est pourquoi on a d'abord procédé à une étude comparative de deux sys-

tèmes de culture groupée d'embryons bovins disponibles dans le commerce. Les résultats ont clairement montré que la culture sur plaques WOW, par rapport aux plaques Corral et à la culture individuelle, donne lieu à un meilleur développement embryonnaire jusqu'au stade du blastocyste 8 jours après la fécondation, duele cultuur, et ne présente pas de différences significatives avec le groupe de contrôle, la culture de groupe classique. Partant de ces résultats, il a été décidé de vérifier, à l'aide d'une « randomized sibling oocyte study », s'il est possible d'augmenter le nombre de blastocystes utilisables pour le traitement de la patiente (blastocystes susceptibles d'être implantés et/ou congelés) en ayant recours à la culture groupée sur plaques WOW, en comparaison avec la traditionnelle culture individuelle d'embryons humains. Un plus grand nombre de blastocystes utilisables signifierait un taux de grossesse cumulatif plus élevé.

Cette étude randomisée, qui se déroulera simultanément au Service de Reproduction humaine de l'UZ Gand et au centre de reproduction humaine de l'UZA Anvers, inclura 158 patients, après accord du comité d'éthique et après consentement éclairé du patient. Ne seront pris en compte que les patientes qui ont au minimum 10 ovules fécondés (2PN). Seul le sperme obtenu après éjaculation sera utilisé pour l'insémination/ICSI. Les patientes doivent également avoir moins de 40 ans. La moitié des ovules de ces patientes sera allouée, de manière aléatoire, à la culture individuelle classique et l'autre moitié à la culture groupée sur plaques WOW, et ce durant cinq jours. La finalité primaire de l'étude est le nombre de blastocystes utilisables après cinq jours de culture, avec pour objectif ultime d'augmenter ce nombre de 40% en moyenne (blastocystes/ovules fécondés) en culture individuelle à 60% 3/5 (blastocystes/ovules fécondés) en culture groupée. On examinera aussi le développement embryonnaire et la qualité morphologique pendant toute la période de culture et l'issue de grossesse.

Avis de la commission favorable rendu le 27/05/2013

Titre du projet :

« Kennis- en onderzoeksgedreven aanmaak van humane embryonale stamcellen in een naïeve grondtoestand van pluripotentie »

Nom des chercheurs :

Carl Spiessens, Sophie Debrock, Elia Fernandez Gallardo

Institution :

Leuvens Universitair Fertiliteitscentrum, UZ-KU Leuven Campus Gasthuisberg

Durée du projet :

01/03/2014 – 29/02/2016

Description du projet :

This observation study aims to describe morphometric and morphokinetic parameters of thawed human embryos after freezing (slow freezing vitrification). The study will focus on the evolution of the blastomere volume, the evolution of the contact surfaces between surviving blastomeres and the development of the embryo using time lapse imaging. Embryo morphogenetics and morphokinetic parameters will be analyzed together with the patient characteristics and clinical parameters using cluster analysis techniques. The correlation between morphometrics/morphocinetics and the implantation potential of frozen-thawed embryos will be studied in cycles with single embryo transfer and in cycles with dual implantation after double embryo transfer.

Cryopreserved embryos donated for scientific research will also be used for this study. According to the Belgian law of July 6th 2007 concerning ART and the destination of supernumerary embryos and gametes, all patients sign an agreement in which they indicate the destination of their supernumerary embryos when the storage period of 5 years expires. After this storage period of 5 years, embryos donated for research can be used for this project.

This research fits into the PhD project of Elia Fernandez Gallardo (PhD project 2013-2017).

Avis de la commission négatif rendu le 24/02/2014.

Titre du projet :

« Investigation of trophoctoderm regulators playing a role in human embryo implantation »

Nom des chercheurs :

Herman Tournaye, Hilde Van de Velde, Essahib Wafaa

Institution :


Centre de génétique médicale, Centre de Reproduction humaine UZ Brussel

Durée du projet :

02/01/2014 – 31/12/2017

Description du projet :

Embryo selection in IVF clinics is primarily based on morphological scoring: a high-quality blastocyst displays a cohesive trophoctoderm (TE) and a compact inner cell mass (ICM). During the past decade, numerous efforts have been made to improve the ART outcome by developing better embryo culture conditions and searching for additional information on embryo potential (Lédée et al. 2010; Vergouw et al. 2011). So far, none of these markers were proven to be useful. Much (but not all) of the implantation failure and early pregnancy loss is due to genetic abnormalities in the early embryos. Subsequently preimplantation genetic screening (PGS) is an interesting approach to significantly improve the implantation rate using comprehensive chromosomal screening on TE cells (Scott et al. 2013). The future for PGS is definitely TE biopsy on day 5, because it is semi-invasive, more cells are available for testing, less embryos are tested and the aneuploidy rate is much lower. In addition, the quality of the TE cells has been recognized in the blastocyst scoring for embryo selection (Ahlström et al. 2011). However, not much is known on the pathways involved in the functionality of this layer. Research on gene expression in the TE cells will contribute to the understanding and treatment of implantation failure. In our study we aim to investigate the role of genes specifically expressed in TE cells that play a major role in implantation. In order to mimic as much as possible the in vivo implantation mechanism we have chosen to use the 3D endometrial culture system (Wang et al. 2013). We will use human stromal cells (biopsy after informed consent) embedded in fibrin-agarose to form the matrix and Ishikawa cells will be added on top of the matrix to mimic the epithelium. We aim to have a co-culture with human blastocysts, from day 6 to day 10, and analyze their invasion capacity. We will perform large scale gene expression analysis on human day 6 biopsied TE cells to obtain a more defined understanding of pathways involved in TE functionality and implantation. These results will help us with the identification of potential markers for implantation capacity. RNA-sequencing results will be validated by qRT-PCR and immunocytochemistry. In order to



analyse the role played by genes previously selected, we will modulate the expression of implantation competent embryos with specific chemical pathway modulators or by knocking down the function with morpholinos. If this project leads to a clinical RCT, the development of a gene expression array can lead to an additional and objective tool for embryo selection in the clinic.

Avis de la commission favorable rendu le 24/03/2014.

Titre du projet :

« Totipotency versus fate determination in human embryonic cells »

Nom des chercheurs :

Herman Tournaye, Hilde Van de Velde, Caroline De Paepe

Institution :

Centrum de Génétique médicale, Centre de Reproduction humaine UZ Brussel

Durée du projet :

03/2014 – 03/2018

Description du projet :

Het onderzoek bestaat uit twee delen (FWO project in bijlage).

De hypothese van het eerste deel van het onderzoek is dat menselijke trofocytoderm cellen pluripotent zijn (De Paepe et al. 2013). Om dit te bewijzen zullen we trachten humane embryonale stamcellijnen af te leiden van trofocytoderm cellen. We zullen ook bepalen of de positie van een cel in het embryo (buiten versus binnen) bepalend is voor de ontwikkelingsrichting die de cel zal volgen (trofocytoderm of kiemknop). Daarom zullen we de buitenste cellen van menselijke blastocysten labelen met een kleurstof, de blastocysten disaggregeren en na re-aggregatie de positie van de gelabelde cellen bepalen om te onderzoeken of hun ontwikkelingsrichting vastligt of nog omkeerbaar is. De hypothese van het tweede deel van het onderzoek is dat BMP4 een belangrijke rol speelt tijdens de eerste differentiatie in de menselijke blastocyst (trofocytoderm versus kiemknop). We zullen belangrijke componenten van de «TGFbeta signaling pathway» en de «Hippo signaling pathway» bestuderen dmv functionele testen (morpholino's en specifieke inhibitoren van pathways). We zullen ook trachten nieuwe factoren te identificeren die een rol spelen tijdens de eerste differentiatie in het menselijke embryo.

Een beperkt aantal embryo's zal gecreëerd worden voor onderzoek om de resultaten van de functionele studies te bevestigen alsook voor "gene knockdown" experimenten. Dit omdat voor deze experimenten vroege ontwikkelingsstadia (vnl. zygoten) nodig zijn die in normale omstandigheden niet voor onderzoek beschikbaar zijn omdat ze bestemd zijn voor de patiënt zelf.

Avis de la commission favorable rendu le 24/03/2014.

IV.2. Questions posées à la CFE

La Commission a eu à se pencher ces dernières années sur plusieurs questions, dont certaines pour lesquelles elle n'était pas directement compétente (voir annexe 2).

Le suivi de la recherche sur les embryons relève de la mission de la CFE. Pourtant, de nombreuses questions qui n'ont pas toujours trait à son champ d'action lui sont soumises.

La CFE essaie, dans la mesure du possible, de respecter les limites de son mandat. Elle ne peut donc pas traiter toutes les questions soumises, notamment quand elle ne dispose pas des compétences ou données nécessaires à cette fin.



V. Fonction de suivi de la CFE

Le suivi scientifique, juridique et éthique est assuré par le secrétariat de la CFE, sur base de nombreuses sources et moteurs de recherche. Les résultats de ces recherches sont régulièrement communiqués aux membres de la CFE lors des réunions plénières.

V.1. Suivi éthique

Dans un souci de garantir une couverture la plus large possible des questions éthiques en rapport avec les embryons, les sources d'information suivantes font l'objet d'un suivi régulier :

CCB (BE)	https://portal.health.fgov.be/portal/page?_pageid=56,512676&_dad=portal&_schema=PORTAL
REVUE DE PRESSE DU SPF (BE)	
SHS (INT)	http://portal.unesco.org/shs/fr/ev.php-URL_ID=1372&URL_DO=DO_TOPIC&URL_SECTION=201.html
CDBI (EU)	http://www.coe.int/t/dg3/healthbioethic/cdbi/default_FR.asp
EGE (EU)	http://ec.europa.eu/european_group_ethics/index_fr.htm
ESHRE (EU)	http://www.eshre.eu/ESHRE/English/Specialty-Groups/SIG/Ethics-and-Law/Welcome/page.aspx/134
CCNE (FR)	http://www.ccne-ethique.fr/
ABM (FR)	http://www.agence-biomedecine.fr/
HFEA (UK)	http://www.hfea.gov.uk/
Bionews (UK)	http://www.bionews.org.uk/
ASRM (USA)	http://www.asrm.org/
BSRM (BE)	http://www.bsrn.be/Boardmembers.html
VVOG (BE)	http://www.vvog.be
GGOLFB (BE)	http://www.ggolfb.be/public/Default.aspx?doc=3012607b-699e-4ce2-a8b0-55185eb802d9

V.2. Suivi juridique

Les principales sources d'information en matière de suivi juridique sont les suivantes :

- www.moniteur.be/index_fr.htm ;
- www.senat.be ;
- www.lachambre.be ;
- justice.belgium.be.

V.3. Suivi scientifique

Des vérifications sont faites tous les mois par le secrétariat dans les bases de données PubMed et ScienceDirect et dans le programme EndNote.

V.3.1 Suivi scientifique des avis

En ce qui concerne la fonction de suivi de la CFE, nous renvoyons à la base de données établie par le secrétariat.

Le suivi scientifique des projets en cours en 2012-2014, approuvés par la CFE, est présenté ci-dessous.

Adv010 UZ –KU LEUVEN

Titre du projet :

« Karakterisatie van de verharding van de Zona Pellucida door Cryo-preserved »

Nom des chercheurs :

Sophie Debrock, Carl Spiessens, Dorien Willemen, Thomas D'Hooghe

Institution :

UZ-KU Leuven, Centre de Fertilité universitaire (LUFC)
Centre de Génétique humaine (CME)

Durée du projet :

2008-2012

État d'avancement du projet :

La collecte d'embryons a été arrêtée. Les résultats ont été analysés.
16/07/2013 : Cette recherche a été réalisée dans le cadre d'une thèse de master en sciences biomédicales.
L'étude n'a pas été publiée en tant qu'abstract ou manuscrit.
L'étude est entièrement terminée.

Titre du projet :

« Optimalisatie van cryopreservatie van gebiopseerde embryo's na preimplantatie genetische diagnose (PGD) »

Nom des chercheurs :

Sophie Debrock, Carl Spiessens, Dorien Willemen, Thomas D'Hooghe

Institution :

UZ-KU Leuven, Centre de Fertilité universitaire (LUFC)
Centre de Génétique humaine (CME)

Durée du projet :

2008-2012

16/07/2013 :

L'étude n'a pas été publiée en tant qu'abstract ou manuscrit. L'étude est entièrement terminée.

Titre du projet :

« Epigenetic stability in gametes, preimplantation embryos and human embryonic stem cells with a focus on the behaviour of dynamic mutations causing myotonic dystrophy and fragile X syndrome »

Nom des chercheurs :

Karen Sermon, Claudia Spits

Institution :

Vrije Universiteit Brussel, Centre de Génétique médicale (CMG)

Durée du projet :

13/09/2010 - 13/09/2014

État d'avancement du projet :

This project involved two main lines of research.

- A. *Our first aim was to study the genomic stability of human embryonic stem cells (hESC). If these cells are to be used in cell therapy, all precautions must be taken to guarantee the safety of the recipient.*
- B. *Our second aim was to contribute to the unraveling of the mechanisms of instability in dynamic mutations, by studying hESCs and embryos.*

A. Genomic stability of hESC

A1. Array-CGH

Regular monitoring of the karyotype of hESC is essential. Chromosomal abnormalities have an impact on the reproducibility and reliability of experimental results and hamper the clinical usefulness of hESC. We implemented array-CGH for a systematic study of different passages of the hESC lines derived and cultured in our laboratory. Our results showed three different types of chromosomal changes. First, the hESC lines presented single trisomies and monosomies. Secondly, submicroscopic duplications were frequently detected. Five lines showed gain of 20q11.21 after long-term culture. Finally, a derivative chromosome 18 appeared in three independent hESC lines at relatively early passages. This work was published in *Nature Biotechnology* (Spits et al., 2008). We now use array-CGH to routinely monitor our hESC lines; many other groups working with hESC have followed our example. Furthermore, we used array-CGH to characterize the cells for the experiments published by Mateizel et al., 2009 and 2010, and Geens et al., 2009. Recently we participated in a large international collaboration to characterize the genome instability of a large number of hESC lines from many laboratories worldwide (International Stem Cell Initiative, ISCI). This work was also published in *Nature Biotechnology* (Amps et al., 2011).

A2. Mitochondrial mutations

Mitochondria play an important role in early embryogenesis and are one of the key elements of the unique biology of stem cells. Despite the increasing number of reports on the high instability of the nuclear genome of hESC, the integrity of the mitochondrial genome has received little attention. In this study, we screened for mtDNA deletions in one to six different passages of sixteen hESC lines, ranging from passage three to 334. All studied hESC lines showed deletions, both at the undifferentiated and differentiated state, at an average mutation load of 23%. This work has been published in *Nature Biotechnology*.

B. Dynamic mutations in gametes and preimplantation embryos and hESC

B1. CGG repeat in the FMR1 gene in preimplantation embryos and gametes

We intended to investigate if the CGG repeat causing Fragile X syndrome is stable or unstable during the first stages of human development, as we have previously done for the CAG repeat in DMPK. For this, it is necessary to amplify the CGG repeat by PCR, and analyze the results by Southern blot. The CGG repeat is highly resilient to amplification by PCR, especially the longer CGG tracks, and we need to perform

this PCR on single blastomeres or single embryos (rather than on genomic DNA) which makes this a difficult task. We first used multiple displacement amplification (MDA) as a preamplification step, followed by a specific PCR for the CGG repeat. Our preliminary results looked rather promising, but later PCR controls revealed that the apparent instability we detected in the blastomeres was due to amplification artifacts induced by the MDA. Recently a new promising method of whole genome amplification (GenomePlex, Sigma) became available. We have also tested this method, and concluded that it also induced amplification artifacts. Therefore, this research line was stopped.

B2. CTG repeat in the DMPK gene in hESC

The dynamic mutations causing Huntington's disease (HD) and myotonic dystrophy (DM1) show different instability patterns according to the disorder, cell type and developmental stage. In this research line we studied the behavior of these repeats in DM1- and HD-derived hESCs before and after differentiation, and its relationship to the DNA mismatch repair (MMR). While the HD repeat was stable in undifferentiated HD hESCs, the DM1 repeat showed instability from the earliest passages onwards in DM1 hESCs. Upon differentiation, the HD repeat remained stable, whereas the DM1 repeat was stabilized. MMR genes were assessed at the transcript and protein levels in differentiated cells. The coincidence of differentiation-induced down-regulated MMR expression with reduced instability of the long expanded repeats in hESC is consistent with a known requirement of MMR proteins for repeat instability in transgenic mice. This is the first demonstration of altered repeat instability of an endogenous DM1 locus by natural MMR down-regulation, in contrast to the commonly used murine knock-down systems. This work was published in *Human Molecular Genetics* (see publication list). As a side-track of this project, we obtained interesting results on the methylation patterns of the DM1 locus in DNA of patients. We originally intended to study the methylation patterns in the hESC lines, but during the preliminary control tests, we found results that contradicted the generally accepted report by Steinbach and collaborators (1988, *Am.J.Hum.Genet.* 62:278-285). This paper was one of the very few on methylation in the DM1 locus, and has been widely cited. As a consequence, we studied the methylation status of the sequence upstream of the CTG repeat of the DM1 locus in patient's peripheral blood. Contrary to previous findings, the methylation was often but not always present in expanded CTG alleles. Importantly, this methylation was not restricted to congenital DM1, nor long expansions. This work has been published in the *Journal of Medical Genetics* (see publication list).

Références:

Papers in journals included in the ISI Web of Science

- Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. International Stem Cell Initiative, Amps K, Andrews PW, Anyfantis G, Armstrong L, Avery S, Baharvand H, Baker J, Baker D, Munoz MB, Beil S, Benvenisty N, Ben-Yosef D, Biancotti JC, Bosman A, Brena RM, Brison D, Caisander G, Camarasa MV, Chen J, Chiao E, Choi YM, Choo AB, Collins D, Colman A, Crook JM, Daley GQ, Dalton A, De Sousa PA, Denning C, Downie J, Dvorak P, Montgomery KD, Feki A, Ford A, Fox V, Fraga AM, Frumkin T, Ge L, Gokhale PJ, Golan-Lev T, Gourabi H, Gropp M, Lu G, Hampl A, Harron K, Healy L, Herath W, Holm F, Hovatta O, Hyllner J, Inamdar MS, Irwanto AK, Ishii T, Jaconi M, Jin Y, Kimber S, Kiselev S, Knowles BB, Kopper O, Kukharensko V, Kuliev A, Lagarkova MA, Laird PW, Lako M, Laslett AL, Lavon N, Lee DR, Lee JE, Li C, Lim LS, Ludwig TE, Ma Y, Maltby E, Mateizel I, Mayshar Y, Mileikovsky M, Minger SL, Miyazaki T, Moon SY, Moore H, Mummery C, Nagy A, Nakatsuji N, Narwani K, Oh SK, Oh SK, Olson C, Otonkoski T, Pan F, Park IH, Pells S, Pera MF, Pereira LV, Qi O, Raj GS, Reubinoff B, Robins A, Robson P, Rossant J, Salekdeh GH, Schulz TC, Sermon K, Sheik Mohamed J, Shen H, Sherrer E, Sidhu K, Sivarajah S, Skottman H, Spits C, Stacey GN, Strehl R, Strelchenko N, Suemori H, Sun B, Suuronen R, Takahashi K, Tuuri T, Venu P, Verlinsky Y, Ward-van Oostwaard D, Weisenberger DJ, Wu Y, Yamanaka S, Young L, Zhou Q. *Nat Biotechnol.* 2011, 29:1132-44. Impact factor 2010: 31.09. Number of pages: 13.
- Huntington's and myotonic dystrophy hESCs: down-regulated trinucleotide repeat instability and mismatch repair machinery expression upon differentiation. Seriola A*, Spits C*, Simard JP, Hilven P, Haentjens P, Pearson CE, Sermon K. *Hum Molecular Genetics* 2011, 20:176-85. * Joint first authorship. Impact factor 2010: 8.058. Number of pages: 10.
- Methylation of the CpG sites in the myotonic dystrophy locus does not correlate with CTG expansion size or with the congenital form of the disease. Spits C, Seneca S, Hilven P, Liebaers I, Sermon K. *J. Med. Genet.* 2010. 47:700-3. Impact factor 2010: 7.037. Number of pages: 4.
- Derivation, culture, and characterization of VUB hESC lines. Mateizel I*, Spits C*, De Rycke M, Liebaers I, Sermon K. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010, 46:300-8. * Joint first authorship. Impact factor 2010: 0.914. Number of pages: 9.
- Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos. Geens M, Mateizel I, Sermon K, De Rycke M, Spits C, Cauffman G, Devroey P, Tournaye H, Liebaers I, Van de Velde H. *Hum Reprod.* 2009, 11:2709-17. Impact factor 2009: 3.859. Number of pages: 9.

- Characterization of CD30 expression in hESC lines cultured in serum free media and mechanically passaged. Mateizel I, Spits C, Verloes A, Mertzaniidou A, Liebaers I, Sermon K. Hum Reprod 2009,24:2477-89.
- Impact factor 2009: 3.859. Number of pages: 13.
- Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. Spits C, Mateizel I, Geens M, Mertzaniidou A, Staessen C, Vandesselde Y, Van der Elst J, Liebaers I, Sermon K. Nat Biotech. 2008, 26:1361-3. Impact factor 2008: 22.297. Number of pages: 4.

Other publications, conference abstracts:

- 26th Annual meeting of ESHRE. 27/06/2010-30/06/2010, Rome (Italy). "Genomic instability of human pluripotent cells". Claudia Spits, invited speaker.
- Master Class/ Minisymposium on Stem cells in cancer biology and treatment. 03/07/2009. Claudia Spits, invited speaker.
- UZM, Maastricht. "Genomic instability in human embryonic stem cells. Claudia Spits, invited speaker.
- International Course on Reproductive Medicine, 17/04/2009, Santiago (Chile). "How to select the best embryo?", "Preimplantation genetic diagnosis" and "Stem cells: hope or hype?". Claudia Spits, invited speaker.
- 24th Annual meeting of ESHRE. 6/07/2008-9/07/2008, Barcelona (Spain). Oral communication: "Molecular karyotyping and genetic stability of human embryonic stem cell lines". Spits, C.; Mateizel, I.; Geens, M.; Mertzaniidou, A.; Van der Elst, J.; Liebaers, I.; Sermon, K.
- 6th ISSCR Annual Meeting. 11/06/2008-14/06/2008, Philadelphia (USA). Poster presentation: "Molecular karyotyping and genetic stability of human embryonic stem cell lines". Spits, C.; Mateizel, I.; Geens, M.; Mertzaniidou, A.; Van der Elst, J.; Liebaers, I.; Sermon, K.
- 7th Annual meeting of the ISSCR, 8/07/2009-11/07/2009, Barcelona (Spain). Poster presentation "Characterization of CD30 expression in hESC lines cultured in serum free media and mechanically passaged".
- Mateizel I, Spits C, Verloes A, Mertzaniidou A, Liebaers I, Sermon K.
- 24th Annual meeting of ESHRE. 6/07/2008-9/07/2008, Barcelona (Spain). Oral communication: "Trinucleotide repeat instability in human embryonic stem cells: the role of the mismatch repair machinery". Seriola A, Spits C, Mateizel I, De Temmerman N, Hilven P, Van der Elst J, Liebaers I, Sermon K.
- 24th Annual meeting of ESHRE. 6/07/2008-9/07/2008, Barcelona (Spain). Oral communication: «A human embryonic stem cell line derived from a single blastomere of a 4-cell stage embryo" Van de Velde H, Geens M, Mateizel I, Spits C, Sermon K, De Rycke M, Van der Elst J, Devroey P, Tournaye H, Liebaers I.

Titre du projet :

« Detectie van chromosomale afwijkingen in preimplantatie embryo's door middel van array CGH »

Nom des chercheurs :

Karen Sermon, Catherine Staessen, Claudia Spits, Afroditi Mertzani

Institution :

Vrije Universiteit Brussel, Centre de Génétique médicale (CMG)


Durée du projet :

01/10/2007- 30/09/2011

État d'avancement du projet :

A final report was sent to the funding agency (IWT Flanders). This is an excerpt of this report. The study design was blinded, including two operators. Good quality Day-3 frozen - thawed embryos donated for research were disaggregated by the first operator (Dr Leeanda Wilton, Australia) and each blastomere was tubed separately and subjected to MDA. MDA amplified sufficiently the DNA of 101 blastomeres. The second operator (REGE-VUB) continued with the array-CGH of the MDA products. The MDA-DNA samples were labelled along with reference genomic DNA samples hybridized and analysed using the Agilent G2565AA Microarray Scanner System and Feature extraction software (Agilent). The log₂ of the Cy5 to Cy3 intensity ratios was calculated and plotted on excel sheets. The statistical analysis of the raw data was performed in collaboration with the research group in Leuven (CME-UZ) and KU LEUVEN ESAT-SCD, using the newly developed methodology for the analysis of single-cell array data (Cheng et al., 2013).

Improved data processing of single cell aCGH We completed a workflow for the analysis of copy number variation using single cell array CGH and single cell SNP arrays that allows the reliable detection of copy number variation in single cells. This workflow corresponds to the strategy we have developed for the assessment of chromosomal imbalances in human cleavage stage embryos (Vanneste et al., 2009). Mixture Models and Hidden Markov Models enable the detection of amplifications and deletions on a genome-wide basis. The tools and models were consolidated in an R package called CMEmisc. A detailed description of the single cell protocol has been submitted to Nature Protocols as Konings et al. The CMEmisc package also provides an implementation of the mixture model described in Ampe et al. This model offers the advantage of providing a probabilistic assignment to the clone differential intensity signals as compared to most current strategies that carry out only hard assignment.



We continued work on normalization for interchannel variability in aCGH, specifically targeted to single-cell applications. Normalization is an important step of microarray data analysis that attempts to remove the technical and experimental artefacts in microarray signals. Different normalization strategies have been developed improving the data analysis for experiments in which both test and reference samples are of the same nature. However, single-cell array CGH experiments have the particular property that the reference sample is of a different biological nature compared to the test sample because of the necessary DNA amplification step. Consequently, the spread of the distribution of intensities in both channels are different from each other. Unfortunately, current available algorithms have not taken this property into account and only normalize data over the ratio of both channels. Two normalization methods based on channel and clone-specific correction were developed to handle this problem. The performance of the single-cell copy number variation detection using our two proposed normalization methods is superior to that of four commonly used loess-based normalization methods in terms of Area Under the Curve (AUC) for the detection of known aberrations in single-call aCGH. Consequently, channel specific procedures significantly improve the detection of relevant biological variation and therefore should be incorporated as a basic step in those designs that suffer from an inter-channel variation bias.

Références:

- Mertzaniidou Afroditi, Wilton Leeanda, Cheng Jiqui, Spits Claudia, Vanneste E., Moreau Yves, Vermeesch J.R., Sermon Karen. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Human Reproduction*, Volume: 28, N° in volume: 1, pp: 256 – 264
- Mertzaniidou Afroditi, Wilton Leeanda, Spits Claudia, Vanneste E., Staessen C., Mcbain J., Liebaers Ingeborg, Vermeesch Joris, Sermon Karen. Molecular karyotyping by array-CGH on single blastomeres: a pilot study. *Hum Reprod*, Volume: 24, N° in volume: 1, Beginpage: pi209. Poster at ESHRE meeting 2011

Titre du projet :

« Analyse van calcium patroon in humane eicellen en toepassing van diverse activatiestimuli »

Nom des chercheurs :

Petra De Sutter, Björn Heindryckx, Luc leybaert

Institution :

Universitair Ziekenhuis Gent, Service Médecine de la Reproduction, Clinique des Femmes

Durée du projet :

09/07/2009- 09/07/2013

État d'avancement du projet :

Au départ, l'analyse du schéma calcique des ovocytes humains a été optimisée, et aucun embryon n'a été créé.

À partir de fin 2010 et début 2011, la création d'embryons aux fins du présent projet s'est intensifiée.

2011 : aucun embryon n'avait jusque-là été créé pour la recherche. Seuls des ovocytes cédés avaient été injectés avec des spermatozoïdes pour déterminer le schéma calcique. Ces ovocytes fécondés ont ensuite été détruits.

Dans la demande de projet initiale, nous allions examiner le développement embryonnaire dès les premières années. Cela n'a toutefois pas encore démarré et devrait se faire la dernière année (2012-2013).

2012 : Aucun embryon n'a été créé en 2012 pour cette recherche ; seule l'analyse du schéma calcique dans les ovocytes humains a eu lieu.

Pour **2013**, il est prévu de créer des embryons dans le but de tester deux stimuli d'activation différents.

EINDVERSLAG:

In dit researchproject hebben we het calcium patroon vastgelegd na bevruchting met ICSI in humane eicellen (1). Dit calcium patroon kan nu gebruikt worden als referentie patroon van zaadcellen met normaal activatie vermogen (1). Bijkomend hebben we de invloed van in vitro maturatie en invriezen nagegaan op het calcium patroon in eicellen. Zowel in vitro maturatie, als invriezen hebben een effect op het calcium patroon in humane eicellen na ICSI. De calcium stijgingen zijn minder frequent en duren korter bij in vitro gematureerde eicellen in vergelijking met in vivo gematureerde eicellen. Invriezen van eicellen geeft aanleiding tot een hogere amplitude van de calcium stijgingen, en de calcium stijgingen duren langer, doch met een lagere frequentie

(1). De analyse van calcium stijgingen kan dus gebruikt worden om de eicel kwaliteit na te gaan, of om het activerend vermogen van humane zaadcellen te bepalen. Bij sommige koppels kan een gefaalde bevruchting of abnormaal lage bevruchting na ICSI optreden, en dit kan te wijten zijn aan een verstoord calcium patroon (2). Zo hebben we aangetoond bij een koppel dat de zaadcellen niet in staat waren om een normaal calcium patroon te genereren in humane eicellen (3). Bij dit koppel kwamen in vivo molaire zwangerschappen voor. Onze data toonden aan dat waarschijnlijk 1 zaadcel onvoldoende calcium stijgingen kon veroorzaken om eicelactivatie te induceren, maar dat minstens 2 zaadcellen nodig waren om voldoende calcium stijgingen te veroorzaken om de eicel succesvol te activeren, wat wel aanleiding gaf tot chromosomaal abnormale zwangerschappen (molaire) in vivo (3). Tenslotte hebben ook calcium patroon analyse uitgevoerd in humane eicellen die clusters van smooth endoplasmatisch reticulum (SER) bevatten (4). Er is nog steeds discussie in de literatuur of deze eicellen al of niet klinisch moeten gebruikt worden, daar abnormale zwangerschappen zijn gerapporteerd na het gebruik van dergelijke eicellen, terwijl dit in andere artikels niet het geval was. Onze calcium patroon analyse toonde aan dat ondanks de lagere frequentie van calcium stijgingen in eicellen met clusters van SER, er een grotere hoeveelheid calcium wordt vrijgelaten in eicellen met clusters van SER in vergelijking met normale eicellen (4). Wat de gevolgen zijn hiervan (embryo ontwikkeling, normaliteit zwangerschappen) moet nog verder onderzocht worden.

Initieel was het ook de bedoeling om verschillende artificiële activatie agentia te testen op humane eicellen en na te gaan welke agentia het best de embryonale ontwikkeling ondersteunen. We kunnen echter enkel beroep doen op in vitro gematueerde restecellen, die van lage kwaliteit zijn, en de embryonale ontwikkeling weinig ondersteunen. Daarom hebben we beslist om dit onderzoek voorlopig niet te doen.

Références:

- Nikiforaki D, et al. Oocyte cryopreservation and in vitro culture affect calcium signalling during human fertilization. *Hum Reprod.* 2014 29:29-40.
- Vanden Meerschaut F, Nikiforaki D, Heindryckx B, De Sutter P. Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. *Reprod Biomed Online.* 2014 28:560-71.
- Nikiforaki D, et al. Sperm involved in recurrent partial hydatidiform moles cannot induce the normal pattern of calcium oscillations. *Fertil Steril.* 2014 102:581-588.
- De Gheselle S, Nikiforaki D, De Croo I, Yuechao L, De Sutter P, Van den Abbeel E, Heindryckx B. The effect of smooth endoplasmic reticulum aggregates in human oocytes on calcium signalling and the significance for oocyte collection cycle outcome (under preparation)

Titre du projet :

« Chromosomale afwijkingen in menselijke preimplantatie embryo's en embryonale stamcellen: oorzaken, mechanismen en gevolgen voor in vitro fertilisatie en regeneratieve geneeskunde »

Nom des chercheurs :

Karen Sermon, Claudia Spits, Afroditi Mertzaniidou, Kurt Jacobs

Institution :

Vrije Universiteit Brussel, Centre de Reproduction humaine

Durée du projet :

18/12/2009 - 18/12/2013

État d'avancement du projet :

We hypothesize that human preimplantation embryos have a defective spindle attachment checkpoint (SAC), the mechanism responsible for safeguarding a proper sister chromatid separation during anaphase. If embryos would have a defective SAC during the first cleavages, it would explain how the rapidly cleaving blastomeres accumulate aneuploidies, without being arrested or cleared from the embryo by apoptosis.

To test our hypothesis, we decided to use nocodazole, a drug which interferes with the polymerization of microtubules, to arrest cells in metaphase, a strategy well known to study the SAC in cancer research. We incubated embryos on day 3, 4, 5 or 6 after insemination for 16h in Q2 medium supplemented with 20mM nocodazole or DMSO as negative control. The embryos were fixed and their mitotic index (by staining for phospho-histone 3 (S31)) and apoptotic index (by TUNEL assay) were defined using confocal microscopy. After analyzing a minimum of 10 embryos in each condition, it is clear from the mitotic index that human preimplantation embryos have a functional SAC. After 16h of nocodazole incubation, we see a strong increase in cells in M-phase, which indicates that the blastomeres arrest in pro-metaphase, which is proof of the functional SAC. Also, we don't find a difference between the different days of preimplantation development. Conversely, when analyzing the apoptotic index, we clearly see a different response of the embryo to the mitotic arrest depending on its day of development, with cells only going into apoptosis from day 4 on. This suggests a checkpoint-apoptosis uncoupling, inducing the day 3 and day 4 blastomeres going into a polyploidy G1-phase.



Références:

- ESHRE Annual Meeting Lisbon, Portugal. Precongress course 7 : Genetic and genomic mechanisms and markers associated with gamete and embryo quality. Invited speaker Claudia Spits : Mechanisms and transmission of aneuploidies in human embryos
- Paper in preparation : « Spindle attachment checkpoint is functional in cleavage stage human embryos but is uncoupled from apoptosis», K. Jacobs, H. Van de Velde, C. Staessen, K. Sermon, C. Spits
- Evolution of aneuploidy up to day 4 of human preimplantation development. Mertzaniidou A^{*}, Spits C^{*}, Nguyen H.T., Van de Velde H, Sermon K. Human Reproduction. Hum Reprod. 2013 Mar 22. [Epub ahead of print]. ^{*} Joint first authorship. Impact factor 2011: 4.475.

Titre du projet :

« Invloed van embryomorfolgie op stamcelderivatatie efficiëntie en moleculaire karakterisering / identificatie van intermediaire structuren tussen binnenste celmassa en stamceluitgroei »

Nom des chercheurs :

De Sutter Petra, Heindryckx Björn O'Leary Thomas S. Lierman

Institution :

Universitair Ziekenhuis Gent, Service Médecine de la Reproduction, Clinique des Femmes

Durée du projet :

02/02/2010 02/02/2014

État d'avancement du projet :

Cette étude est actuellement toujours en cours. Notre but est de définir et d'identifier de manière plus précise la « post-intermediate inner cell mass » (PICMI), de vérifier quelles sont les voies moléculaires impliquées dans la mise en place de cette structure PICMI, et de voir s'il est possible de manipuler ces voies afin d'en améliorer l'efficacité.

Eindverslag:

In dit researchproject wilden we enerzijds de invloed van bepaalde embryo en patiënten parameters nagaan op humane embryonale stamcel (hESC) derivatie, en anderzijds ook de progressie van de binnenste celmassa volgen tijdens stamcel derivatie.

In een eerste studie gingen we het effect na van bepaalde "poor quality traits" van restembryo's op de daaropvolgende stamcelderivatatie (1), en vonden we dat het derivatie succes afhankelijk is van het aantal van deze poor quality traits.

In een tweede studie werd de invloed van bepaalde kenmerken van de embryo's en de patiënten (bv. aantal pronuclei, leeftijd van de moeder, ...) op blastocyst vorming, kwaliteit van de binnenste celmassa en succesvolle hESC derivatie nagegaan. Er kon worden aangetoond dat de variabelen die gebruikt worden om de IVF/ICSI uitkomst te voorspellen ook kunnen helpen om te bepalen welke restembryo's de meeste kans hebben om te resulteren in een nieuwe hESC lijn (2).

In een volgende studie gingen we het proces van stamcelderivatatie na, en ontdekten we een intermediaire structuur, die noodzakelijk is voor de afleiding van humane embryonale stamcellen. Deze structuur werd door ons de "post inner cell mass intermediate" (PICMI) genoemd, en we konden aantonen dat deze structuur zowel merker van de vroege als van de late epiblast tot expressie brengt (3). De gedetailleerde bes-

chrijving van de derivatie van hESC via de vorming van een post inner cell mass intermediate of kortweg PICMI werden ook gepubliceerd in Nature Protocols (4).

Dit project (Adv022) werd uitgebreid met twee amendementen, te vinden onder Adv030, waar het onderzoek door ons uitgevoerd in 2013-2014 in kadert.

Dit researchproject heeft in totaal geresulteerd in vier publicaties in hoogstaande wetenschappelijke A1 tijdschriften, een abstract op een internationaal congres en een doctoraatsproefschrift.

Références:

- O'Leary Thomas. Human Embryonic Stem Cell Derivation: Influences and Origin. 26/6/2012
- O'Leary T. et al. (2011) The Influence of Early Embryo Traits on Human Embryonic Stem Cell Derivation Efficiency. Stem Cells Dev. 20:785-93
- O'Leary T. et al. (2012) The influence of patient and cohort parameters on the incidence and developmental potential of embryos with poor quality traits for use in human embryonic stem cell derivation. Human Reproduction 27(6):1581-9.
- O'Leary T. et al. (2012) Tracking the progression of the human inner cell mass during embryonic stem cell derivation. Nature Biotechnology 26:278-282.
- O'Leary T. et al. (2013) Derivation of human embryonic stem cells using a post-inner cell mass intermediate. Nature protocols 8(2): 254-264.
- Duggal G. et al (2012). Influence of hESC derivation conditions on germ cell differentiation potential. ESHRE 2012 (Istanbul, Turkey)

Titre du projet :

« Totipotency and cell commitment during the human preimplantation development (FWO project) »

Nom des chercheurs :

Van de Velde Hilde, Cauffman Greet, De Paepe Caroline, Verloes An, Petrusa Laetitia

Institution :

Vrije Universiteit Brussel, Centre de Génétique médicale (CMG) ; Centre de Reproduction humaine (CRG) ; Département Embryologie et Génétique (EMGE)

Durée du projet :

22/12/2009 – 22/12/2012

État d'avancement du projet :

2011:

Knowing when and how cells start to be different from each other during human preimplantation development will be a big step forward in our knowledge of human embryology and stem cell biology. This information may also be important for the decisions that are taken in the IVF lab concerning the transfer of embryos after cell loss due to fragmentation, cryodamage and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. The aim of the project is to investigate at which stage of development the cells of the human preimplantation embryo lose their totipotent character and which mechanisms underlie embryonic cell differentiation.

First, we aimed to examine when cells gain a developmental preference towards a certain lineage. We analysed the temporal and spatial localisation of CDX2, a transcription factor playing a key role in TE formation in mice, during human preimplantation development. We found that CDX2 is localized in all blastomeres at the 8-cell stage on day 3 and that CDX2 becomes restricted to the outer cells during the compaction stage on day 4. This suggests a change in developmental direction of the outer cells prior to any visible sign of the first differentiation.

In order to investigate the in vitro potency of individual blastomeres we split embryos before the stage of compaction into individual blastomeres. The individual blastomeres failed to develop individually to blastocysts. To exclude the possibility of commitment of the blastomere towards a certain lineage or a lack of cell mass, we isolated a few (12-14) outer cells of two distinct compacted embryos and put them in an empty zona pellucida. After culture during two days, the reconstituted embryo developed into a blastocyst with an ICM and TE. We also found that even TE cells of full blastocysts still have the potency to de-

velop into blastocysts with an ICM and TE, however with low efficiency. These results indicate that the decision of the outer cells to form TE during compaction is still reversible. Another way to demonstrate that the cells are not committed yet, is to label the cells of the embryo, to change the position of the cells within the embryo by micromanipulation and to prove that the cells form a blastocyst without sorting themselves out to their original position. There are several techniques commercially available to label cells e.g. antibodies, lipid markers, etc. We tried to label outer cells with the “green fluorescent cell mini linker kit PKH67” binding to lipids, as described in the mouse or with antibodies as described for ICM isolation using immunosurgery. However, in all experimental conditions tested, the blastocysts collapsed and all cells were labelled. At this moment we are successfully labeling outer cells with wheat germ agglutinin 594 and the experiments are still going on.

2012:

The past year we worked on the rejected manuscript “Human trophectoderm cells are not yet committed”. The manuscript was rejected because we did not prove that the isolated outer cells from embryos were not contaminated with inner cells. In order to prove that outer cells are not contaminated with inner cells we worked on the optimisation of the labeling of outer cells. We tried to label outer cells with the “green fluorescent cell mini linker kit PKH67” (Sigma) binding to lipids, as described in the mouse or with antibodies as described for ICM isolation using immunosurgery. However, in all experimental conditions tested, the blastocysts collapsed and all cells were labelled. Therefore we tried another label, red fluorescent-agglutinin that worked well for the labeling of the outer cells. After having successfully labeled outer cells we isolated them from inner cells under the fluorescence microscope and subsequently put them in an empty zona pellucida. The reconstituted “outer-cells-only” embryos were cultured in blastocyst medium in order to obtain an inner population. This experimental work proved that human trophectoderm cells still can form inner mass cells and thus are potentially totipotent. The work resulted in a poster presentation at Heidelberg (2012) and a publication (De Paepe et al. 2013).

We also worked on the analysis of the Hippo signaling pathway in human embryos. The Hippo signalling pathway components are TEAD4, YAP and CDX2. Last year the temporal localisation of CDX2 was analysed (oral presentation BSRM 2011). After having obtained conflicting mRNA results and having performed more tests we concluded that the antibody used for CDX2 stainings was not specific. Therefore we performed immunocytochemistry on human preimplantation embryos for CDX2 with another antibody and also analysed the expression of TEAD4 and YAP. We found that in the human CDX2 is not present in the nuclei of TE cells before the expanded blastocyst stage (day 6), which corresponds with a later onset of the first differentiation as compared to the mouse. Moreover, we did not find a differential expression of YAP in human embryos before the hatched blastocyst stage, which is also

different from mouse and suggest that in the human another factor or pathway is responsible for the first differentiation (Poster presentation ESHRE 2013). Finally, this will result in a new paper.

In preliminary experiments, we randomly changed the position of the cells in compacted human embryos and blastocysts by micromanipulation. We found that the disorganized embryos developed normally to blastocysts. We aim to determine whether the embryos solve the disorganization by sorting the blastomeres back to their original outer and inner position or by changing their developmental direction because they are plastic. In order to follow the blastomeres we aim to find a label that doesn't interfere with the development of the embryo. At this moment we are optimizing the labeling of these embryos. This work will also result in a new publication.

Références:

- De Paepe C, Cauffman G, Verloes A, Sterckx J, Devroey P et al. Human trophoctoderm cells are not yet committed. Hum Reprod 2013;28(3):740-749.
- Oral presentation BSRM2011: Caroline De Paepe, Greet Cauffman, Inge Liebaers and Hilde Van de Velde 'Differentiation in early human embryogenesis'
- Poster presentation EMBO/EMBL Symposium Germline Heidelberg 2012 : Caroline De Paepe, An Verloes, Herman Tournaye, Johan Sterckx, Paul Devroey, Inge Liebaers, Greet Cauffman, Hilde Van de Velde 'Human full blastocyst trophoctoderm cells are pluripotent'
- Poster presentation ESHRE 2013: Caroline De Paepe and Hilde Van de Velde "Differentiation during early human embryogenesis".
- 2 papers submitted (De Paepe et al.)

Titre du projet :

« Vitricatie van rest embryo's en ingevroren-ontdooide rest embryo's: analyse van de overleving »

Nom des chercheurs :

De Sutter Petra, S. Lierman

Institution :

Universitair Ziekenhuis Gent, Service Médecine de la Reproduction, Clinique des Femmes

Durée du projet :

14/06/2010 – 10/01/2012

État d'avancement du projet :**Abstract:**

Morphological survival of twice-cryopreserved human embryos.

Introduction:

The role of frozen-thawed embryo transfer (FET) has increased in assisted reproductive technology programs because ET policy currently favours single ET. In FET, when cryopreserved oocytes, embryos or blastocysts are thawed, there may be surplus thawed/warmed oocytes, embryos or blastocysts available after transfer. These may be refrozen at the blastocyst stage for future clinical use. In this way the re-freezing procedure would be a valuable option to increase the cumulative pregnancy rate while decreasing the risk of multiple gestations. The aim of the present study was to evaluate the efficiency of vitrifying blastocysts derived from frozen-thawed cleavage stage embryos.

Materials and Methods: Patients donated embryos for research which were left-over after fresh transfer and of insufficient quality to be frozen (= control embryos) or which were frozen-thawed and of insufficient quality to be transferred (= study group). All used research embryos were obtained after informed consent of the patients (Approved by the Federal Ethical Committee Adv027 and the local Ethical Committee 2009/660). Control and study group cleavage-stage embryos were further cultured in vitro and vitrified at the expanded blastocyst stage. All expanded blastocysts were vitrified after artificial shrinkage (AS) of the blastocoelic cavity by means of mechanical pipetting. Collapsed blastocysts were equilibrated and vitrified in an ethylene glycol – dimethylsulphoxide – sucrose based solution and by using a closed CBS HS device (Cryo Biosystem). Vitrified collapsed blastocysts were stored in liquid nitrogen. After warming, blastocysts were transferred to solutions of different concentrations of sucrose to dilute the cryoprotectants. After dilution they were further cultured in vitro.

The main outcome measures were the morphological survival rates of the blastocysts after 2-3hrs and 24hrs. Morphological survival was defined as the percentage of fully intact and moderately damaged blastocysts. After 24hrs we also looked at the expansion/re-expansion status of the blastocoelic cavity.

Results: During the study period 162 blastocysts derived from fresh embryos (= control group) and 90 blastocysts from frozen-thawed cleavage stage embryos (= study group) were used. In both groups and before vitrification, the quality of the trophectoderm and the inner cell mass cells in the blastocysts was evaluated according to the scoring system described by Stephenson et al. (2007). Blastocysts with minimal grade C trophectoderm and grade C inner cell mass were vitrified. Blastocysts with minimal grade B trophectoderm and grade B inner cell mass were considered as good quality blastocysts. The percentage of blastocysts with morphological survival after 2-3hrs and 24hrs was not different between the study group and the control group (71.1% (64/90) vs. 78.4% (127/162), $p = 0.22$ and 66.7% (60/90) vs. 72.8% (118/162), $p = 0.32$). Furthermore, the percentage of good-quality blastocysts with morphological survival after 24hrs was not different between the study group and the control group (68.4% (52/76) vs. 76.3% (74/97), $p = 0.30$). After 24hrs of in vitro culture, the percentage of fully expanded, hatching or hatched blastocysts obtained after 24 hrs of culture was not different between the study group and the control group (46.7% (28/60) vs. 42.4% (50/118) for fully expanded blastocysts, 30.0% (18/60) vs. 26.3% (31/118) for hatching blastocysts and 13.3% (8/60) vs. 16.9% (20/118) for hatched blastocysts.

Conclusion: Our results show that blastocysts derived from frozen-thawed cleaved stage embryos can successfully be cryopreserved a second time by vitrification. The re-cryopreservation by vitrification could be a valuable option to increase the cumulative pregnancy rate while decreasing the risk of multiple gestations, but still needs to be approached with some caution because little data is available on the long term safety of multiple freezing.
Cette étude est terminée.

2012:

Cette étude résultera en une éventuelle publication (en préparation). Un abstract basé sur les résultats obtenus a été rédigé pour ESHRE 2012.

Titre du projet :

« Totipotency in early human embryos and embryonic stem cells »

Nom des chercheurs :

H. Van de Velde, I. Liebaers, G. Cauffman, M. Krivega

Institution :

Vrije Universiteit Brussel, Centre de Génétique médicale (CMG) ; Centre de Reproduction humaine (CRG) ; Département Embryologie et Génétique (EMGE)

Durée du projet :

13/09/2010 - 13/09/2014

État d'avancement du projet :

Report 2012-2013.

The purpose of this study is to uncover molecular processes regulating normal development of the human preimplantation embryo. A lot of relevant mechanisms are known in mice and other animal models, but human early embryogenesis still needs to be studied. Using human embryos, we plan to start with functional analysis of protein regulators (transcription factors) already described in other systems. We will also try to characterize the specific marker(s) of embryonic cells that should help us to identify undifferentiated or differentiated progenitor cells in human preimplantation embryos. Finally, we will also investigate these molecular processes and markers in human embryonic stem cells (hESC), which are derived from toti/pluripotent embryonic cells and represent an in vitro model for early embryogenesis. This may help us to determine the origin of hESC in human preimplantation embryos.

General objective 1: Identify the gene marker that is expressed in human embryonic cells.

1. CAR is the coxsakie and adenoviral receptor which is expressed during embryogenesis. It is additionally involved in intercellular adhesion of epithelium-like cells and germ cells, also in tissue regeneration and cancer. We investigated CAR in human preimplantation embryos and embryonic stem cell (hESC) that had been derived at the our VUB research group. Samples were analyzed by RT-PCR and immunocytochemistry.

Results: CAR protein was detected in cytoplasm of mature oocytes, while it was also highly exposed in the nucleus of 4- and 8-cell stage embryos. At compaction, CAR protein was concentrated at the membrane of the outer cells. This was more pronounced at the full and expanded blastocyst stage where TE cells predominantly contained the membrane form of CAR, while in ICM cells it was distributed within the cytoplasm and nuclear. Colocalization of CAR with ZO-1 claimed their joint participation in tight junction formation. TE cells of hatched blastocyst eliminated CAR from the membrane and strongly gathered it in the nucleus, which correlates with the switch in expression from full-length to soluble form of CAR. We observed a similar picture within hESC colonies, where only cells of the outer layer contained CAR on the membrane, while all the cells of the colony gathered it in the nucleus and cytoplasm. CAR was downregulated by spontaneous differentiation.

Conclusions: CAR is differentially expressed in pluripotent cells and cells acquiring fate. We assume that hatched blastocyst TE cells and hESC directly exposed to the culture medium activate a defence mechanism, based on the ability of soluble CAR to prevent a viral infection.

2. A short cell cycle due to a truncated G1 phase has been associated with the high developmental capacity of embryonic cells. In this study, we investigated the role of a critical G1/S transition regulator, Cyclin E1 (CCNE1), in human preimplantation embryo development and embryonic stem cells (hESC).

Results: The CCNE1 protein was ubiquitously and constitutively expressed in the pluripotent cells of the embryo between the 4-cell stage and full blastulation. During blastocyst expansion, CCNE1 was downregulated in the trophectoderm (TE) cells. CCNE1 shortly co-localized with NANOG in the inner cell mass (ICM) cells of the full blastocyst, mimicking the situation in naïve hESC. In the ICM of expanded blastocysts, which corresponds with primed hESC, CCNE1 defined a subpopulation of cells different from NANOG/POU5F1-expressing pluripotent EPI cells and GATA4/SOX17-expressing primitive endoderm (PrE) cells. The CCNE1-expressing pluripotent cells were associated with SSEA4, marker for undifferentiated hESC, and visceral endoderm, marked by TTR. We investigated the role of CCNE1 by plating expanded

blastocysts for hESC derivation. As a result, all the cells including TE regained CCNE1 and, consequently, NANOG expression, resembling the naïve phenotype. The inhibition of CCNE1 expression with siRNA blocked proliferation and caused degeneration of those plated cells.

Conclusions: We described for the first time the pluripotent human embryonic cells expressing CCNE1/SSEA4/TTR. This cell type corresponds to cells, enabling human embryos to recover after cell loss, and contributes to the third cell lineage within the ICM, besides EPI and PrE. CCNE1 is critical for pluripotent cells during hESC derivation.

General objective 2: Analyse role of morphogenes during human preimplantation development.

WNT/beta-catenin signaling has been described as a crucial regulator of embryonic stem cells and embryogenesis. However, little is known on its role during human preimplantation embryo development, besides the RNA expression of its multiple players. In this study, we performed beta-catenin loss- and gain-of-function studies on human preimplantation embryos by adding either Cardamonin or GSK3 inhibitor, 1-Azakenpaullone, to the embryo culture medium from the cleavage until blastocyst stages (Days 3–5/6). Beta-Catenin was displayed in the cortical region underneath the membrane during all stages, but it only showed nuclear localization at cleavage stages after stabilization with 1-Azakenpaullone. We did not observe any effects on the inner cell mass markers NANOG, POU5F1, SOX2 and SALL4 in these functional experiments. However, both beta-catenin degradation and stabilization caused inhibition of the trophectoderm (TE) fate, illustrated by KRT18 and GATA3 RNA, and CDX2 protein expression. Based on the TE-specific WNT3 protein expression in blastocysts, we postulated that this protein may be an upstream regulator for the observed membrane beta-catenin function. The addition of either WNT3 or 1-Azakenpaullone to the culture medium promoted EOMES expression specific for trophoblast development. In both studies, the canonical WNT pathway target gene, TCF1, was not affected. Therefore, we conclude that WNT3 and membrane-associated beta-catenin promote progenitor trophoblast development in human blastocysts. These results have important implications in assisted reproduction and stem cell biology.

Références:

- C. De Paepe, M. Krivega, G. Cauffman, M. Geens, H. Van de Velde. Totipotency and lineage segregation in the human embryo. (Review; co-shared first author).
- *Molecular Human Reproduction* (2014), 20(7):599-618. (objective 1 and 2)
- M. Krivega, M. Geens, H. Van de Velde. CAR expression in human embryos and hESC illustrates its role in pluripotency and tight junctions.
- *Reproduction* (2014) 148 531–544. (objective 1)
- M. Krivega, W. Essahib, H. Van de Velde. WNT3 and membrane-associated β -catenin regulate trophectoderm lineage differentiation in human blastocysts.
- *Molecular Human Reproduction* (2015) Jun, pii: gav036 (objective 2)
- M. Krivega, M. Geens, B. Heindryckx, S. dos Santos Ribeiro, H. Tournaye, H. Van de Velde. CCNE1 plays a key role in balancing between totipotency and differentiation in human embryonic cells.
- *Molecular Human Reproduction*. (Conditionally accepted) (objective 1)
- Paper in collaboration with Dr. Ewart Kuijk (Hubrecht Institute Utrecht, Nederland: Kuijk EW, van Tol LT, Van de Velde H, Wubbolts R, Welling M, Geijssen N, Roelen BA. The roles of FGF and MAP kinase signalling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Development*, 139, 5, 871-882, 2012. (objective 2)
- Poster presentation Heidelberg, Germany, Oct 13-16, 2012, Germline Immortality through totipotency: Krivega M, Van de Velde H. CAR expression in human embryonic cells (objective 1).
- Poster presentation BSRM, Namur, Belgium, Nov 30-Dec 1, 2012: Krivega M, Van de Velde H. CAR expression in human embryonic cells (objective 1).
- Poster presentation ESHRE, London, United Kingdom, July 7-10, 2013: Krivega M, Van de Velde H. Cyclin E1 as a new ICM marker identifies a discrete lineage in epiblast cells of the human blastocyst (objective 1).
- Oral presentation ESHRE, Munich, Germany, July, 2014: Krivega M, Essahib W, Van de Velde H. The role of WNT signaling in human preimplantation development. (objective 2)
- Oral presentation BSRM, Liege, Belgium, November, 2014: Krivega M, Geens M, Van de Velde H. Balancing between totipotency and differentiation in the human embryo. (objective 1)
- Oral presentation ESHRE, Lisbon, Portugal, June, 2015: Krivega M, Geens M, Tournaye H, Van de Velde H. Balancing between totipotency and differentiation in the human embryo. (objective 1)
- Oral presentation, invited speaker to the Annual Meeting of The Fertility Society of Australia (FSA), Canberra, Australia, September, 2015: Krivega M, Geens M, Heindryckx B Tournaye H, Van de Velde H. CCNE1 plays a key role in balancing between totipotency and differentiation in human embryonic cells. (objective 1).

Titre du projet :

« Vitricatie van eicellen en embryo's van de mens »

Nom des chercheurs :

Herman Tournaye, Verheyen Greta, Hilde Van de Velde, Caroline De Paepe, De Munck Neelke

Institution :

Vrije Universiteit Brussel, Centre de Génétique médicale (CMG) ; Centre de Reproduction humaine (CRG) ; Département Embryologie et Génétique (EMGE)

Durée du projet :

06/2010 – 06/2012

État d'avancement du projet :

Le projet FWO court de 2008 à 2012, et l'approbation par la CFE date du 19 juillet 2011. L'approbation par la CFE expire le 19 juillet 2015, il s'agit donc d'un rapport final.

Deux publications sur la vitrification d'ovocytes ont pour l'instant été acceptées. Ces deux publications ont utilisé des embryons créés pour la recherche. Elles ont comparé des embryons provenant d'ovocytes frais et d'ovocytes congelés. Le premier article (De Munck et al., 2013) porte sur l'efficacité de la technique de vitrification des ovocytes. Le deuxième article (De Munck et al., 2015), quant à lui, traite de la sécurité de la technique de vitrification des ovocytes.

La thèse sera écrite et introduite en 2016.

Références:

- Survival and post-warming in vitro competence of human oocytes after high-security closed system vitrification. De Munck N, Verheyen G, Stoop D, Van Landuyt L, Van de Velde H. Oral presentation. ESHRE 2012.
- Gene expression in frozen-thawed versus fresh human preimplantation embryos. Aberkane Asma, De Paepe Caroline, Spits Claudia, Van Haute Lindsey, Greta Verheyen and Van de Velde Hilde. Oral presentation BSRM 2012.
- Survival and post-warming in vitro competence of human oocytes after high security closed system vitrification. De Munck N, Verheyen G, Van Landuyt L, Stoop D and Van de Velde H. J Assist Reprod Genet. 2013 Mar;30(3):361-9
- Chromosomal meiotic segregation, embryonic developmental kinetics and DNA (hydroxy)methylation analysis consolidate the safety of human oocyte vitrification.
- De Munck N, Petrusa L, Verheyen G, Staessen C, Vandesselde Y, Sterckx J, Bocken G, Jacobs K, Stoop D, De Rycke M, Van de Velde H.
- Mol Hum Reprod. 2015 Jun;21(6):535-44. doi: 10.1093/molehr/gav013. Epub 2015 Mar 31.

Titre du projet :

« Invloed van embryomorfolgie op stamcelderivatatie efficiëntie en moleculaire karakterisering/identificatie van intermediaire structuren tussen binnenste celmassa en stamceluitgroei. »

Amendement 1 : « De invloed van small molecules op embryo ontwikkeling/epiblast vorming en hun effect op vroege stamceluitgroei en derivatie »

Amendement 2 : « Humane X chromosoom activiteit tijdens de overgang naar pluripotentie »

Nom des chercheurs :

De Sutter Petra, Heindryckx Bjorn, Van der Jeught Margot, Susana Chuva de Sousa Lopes

Institution :

Universitair Ziekenhuis Gent, Service Médecine de la Reproduction, Clinique des Femmes

Durée du projet :

11/2010 – 11/2012

État d'avancement du projet :

2011:

Amendment 1 : Submitted article to Stem Cells and Development: "Manipulating lineage differentiation during early human embryonic development by small molecules".

We are currently studying methods to achieve the derivation of naïve hESC. In 2010, Hanna et al. reported the conversion of primed hESC towards naïve hESC using transfection of the cells with Oct4 and Klf4 or Klf4 and Klf2 in the presence of PD0325901, CHIR99021, LIF and the Klf4/Flf2 regulator forskolin. Using the 2i condition at different time points and in the presence of different base media, we are trying to achieve naïve hESC derivation from the blastocyst level onwards.

To be able to continue our work, we would like to ask for an extension of this project for another year (until November 2013).

Références:

Amendment 1 :

- Submitted article to Stem Cells and Development: "Manipulating lineage differentiation during early human embryonic development by small molecules":
- accepted and published: Van der Jeught et al. (2013). The combination of inhibitors of FGF/MEK/Erk and GSK3 β signaling increases the number of OCT3/4- and NANOG-positive cells in the human inner cell mass, but does not improve stem cell derivation. Stem Cells and Development 22 (2): 296-306.
- Accepted Abstract ESHRE 2012: "The TGF β pathway plays a pivotal role in early lineage segregation in both mouse and human."
- Accepted abstract ASRM 2012 (San Diego) "Tracking the progression of x-chromosome inactivation and reactivation during female human embryonic stem cell derivation."
- Accepted Abstract BSRM 2012 (SPA, Belgium): "Treatment of human embryos with the TGF β inhibitor SB431542 increases epiblast proliferation and permits successful human embryonic stem cell derivation.'
- Accepted Abstract ISSCR 2013 (Boston, 2013): "Naïve-like conversion of human embryonic stem cells through use of small molecules."
- Submitted article (Stem Cells and Development) – May 2013: «Treatment of human embryos with a TGF β inhibitor increases epiblast proliferation and permits successful human embryonic stem cell derivation»
- Article in preparation : "Roles of the TGF β pathway in early lineage segregation in human embryos and derivation of human embryonic stem cells."
- Need for about 400 more fresh and 150 frozen human spare embryos.

Amendment 2: article in preparation

Update 2012:

- Submitted article: «Treatment of human embryos with a TGF β inhibitor increases epiblast proliferation and permits successful human embryonic stem cell derivation».
- The naïve study (amendment 1) we described above is currently in progress, and should result in another publication by the end of the year. (Article in preparation). The X chromosome activation status during stem cell derivation is also still under investigation (amendment2).
- Amendment 2: We would also like to ask for an extension of another year to study more the exact kinetics of X chromosome inactivation during human embryo development until hESC derivation (until November 2013)

Titre du projet :

« Research at the interface between human genetics and reproduction (Methusalem grant) : derivation of human embryonic stem cell lines from human preimplantation embryos »

Nom des chercheurs :

Hilde Van de Velde, Karen Sermon, Claudia Spits, Mieke Geens

Institution :

Vrije Universiteit Brussel, Centre de Génétique médicale (CMG) ; Centre de Reproduction humaine (CRG) ; Département Embryologie et Génétique (EMGE)

Durée du projet :

01/04/2011-31/05/2013

État d'avancement du projet :

Pour le présent projet, entre le 25/07/2011 et le 04/06/2012, 26 embryons frais surnuméraires de 10 patientes différentes ont été repiqués sur des fibroblastes embryonnaires de souris dans différents milieux. Dans plus ou moins 50% de la culture, on a observé le développement d'une colonie (excroissance) mais aucune nouvelle lignée de cellules souches n'a provisoirement encore pu être dérivée.

2012 :

Entre le 05/06/2012 et le 22/04/2013, 17 embryons frais surnuméraires de 10 patientes différentes ont été repiqués à des fins de dérivation de cellules souches, dans différents milieux de culture propices à leur croissance. Dans 11 cas (65%), une excroissance a été observée, mais aucune nouvelle lignée n'a été dérivée.

Titre du projet :

« Onderzoek van de epigenetische stabiliteit en veiligheid van geassisteerde voortplantingstechnieken »

Nom des chercheurs :

Bonduelle Mary-Louise, De Rycke Martine, Petrusa Laetitia, Van de Velde Hilde

Institution :

Vrije Universiteit Brussel, Centre de Génétique médicale (CMG)

Durée du projet :

01/05/2011 - 31/12/2014

État d'avancement du projet :

Thus far we have concluded one set of immunocytochemistry experiments on human preimplantation embryos and oocytes. We continued the exploration of possible differences in expression and localization of the different DNA methyltransferase enzymes in fresh and cryo-preserved embryos of good or poor morphological quality, and fresh or in vitro matured oocytes. A manuscript with these data has been published in 2014 in *Molecular Human Reproduction*.

We continued the investigation of the global DNA methylation pattern by indirect immunocytochemistry with antibodies against 5' methylcytosine and 5'-hydroxymethylcytosine, and these patterns are relatively quantified from stage to stage. The methylation levels and the ratio between the two modifications was also explored in human embryonic stem cells. These experiments resulted in an abstract and poster for the annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology in 2012, an oral presentation on the ESHRE campus course in Lisbon in September 2014 and an oral presentation on the annual meeting of the Belgian Society of Reproductive Medicine in November 2014.

A manuscript from these experiments has been submitted for publication.

A PhD thesis covering these experiments will be submitted to the VUB by the end of this year and will be sent to you after publication.

Références:

- Abstract en poster at ESHRE annual meeting 01-04/07/2012
- P468: Dynamic changes of DNA methylation and hydroxymethylation during human in vitro preimplantation development
- Dynamic regulation of DNA methyltransferases in human oocytes and preimplantation embryos after assisted reproductive technologies. Petrusa L, Van de Velde H, De Rycke M. *Mol Hum Reprod*. 2014 Sep;20(9):861-74. doi: 10.1093/molehr/gau049. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24994815

Titre du projet :

« Totipotency and differentiation in early human embryonic cells »

Nom des chercheurs :

Herman Tournaye, Hilde Van de Velde, Caroline De Paepe

Institution :

Vrije Universiteit Brussel, Centre de Génétique médicale (CMG) ; Centre de Reproduction humaine (CRG) ; Département Embryologie et Génétique (EMGE)

Durée du projet :

01/09/2011- 31/12/2015

État d'avancement du projet :

Les essais réalisés pour Adv034 sont les mêmes que ceux réalisés pour Adv025 (il s'agit de 2 projets FWO pour lesquels environ 90% des essais effectués sont identiques). C'est pourquoi les embryons sont inclus dans le rapport annuel de l'Adv025.

Références:

- Oral presentation BSRM, Antwerpen, November 25-26, 2011. De Paepe C, Cauffman G, Liebaers I, Van de Velde H.
- Poster presentation Congres 'Germline-Immortality through totipotency' EMBO Heidelberg-Germany 13-16 Okt 2012. De Paepe C, Verloes A, Sterckx J, Devroey P, Tournaye H, Liebaers I, Cauffman G, Van de Velde H., 'Human full blastocyst trophoctoderm cells are pluripotent'.
- Poster presentation ESHRE London, UK, July 7-10, 2013. De Paepe C, Van de Velde H. 'Differentiation during early human embryogenesis'.
- DE PAEPE Caroline, CAUFFMAN Greet, VERLOES An, STERCKX Johan, DEVROEY Paul, TOURNAYE Herman, LIEBAERS Ingeborg, VAN DE VELDE Hilde, Human trophoctoderm cells are not yet committed, Human Reproduction, 2013, vol. 28, n.3 pp. 740-749.

Titre du projet :

« Exploring the true nature of human pluripotent stem cells: differences and similarities in key gene expression and differentiation capacity »

Nom des chercheurs :

Hilde Van de Velde, Karen Sermon, Mieke Geens

Institution :

Vrije Universiteit Brussel, Centre de Génétique médicale (CMG) ; Centre de Reproduction humaine (CRG) ; Département Embryologie et Génétique (EMGE)

Durée du projet :

01/12/2011 – 30/11/2015

État d'avancement du projet :

Étant donné qu'aucun ovocyte n'a encore été cédé à ce projet, aucun embryon n'a encore été produit et utilisé.

En août 2012, 4 embryons ont été produits et les agrégats de blastomères individuels ont été repiqués aux fins de dérivation de cellules souches. À cet égard, différents milieux de culture ont été testés. Même si plusieurs agrégats s'accrochaient, aucune nouvelle lignée de cellules souches n'a été dérivée.

Titre du projet :

« Betreffende gebruik van PGD (pre-implantatie genetische diagnostiek) op het poollichaam van de eicel bij mitochondriale pathologie: validatie van de PGD techniek op embryo's »

Nom des chercheurs :

De Sutter Petra, Heindryckx Bjorn

Institution :

Universitair Ziekenhuis Gent, Service Médecine de la Reproduction, Clinique des Femmes

Durée du projet :

10/2011 – 11/2014

État d'avancement des travaux :

2011 :

La recherche dépend des patientes qui se présentent à un DPI pour affections mitochondriales.

2012 :

La recherche continue à dépendre des patientes qui se présentent à un DPI pour affections mitochondriales

Références:

- Mado Vandewoestyne*, Björn Heindryckx*, Stefanie De Gheselleb, Trees Lepeza, Jitesh Neupane, Rudy Van Costerc, Jan Gerrisb, Petra De Sutter, Dieter Deforcea Poor correlation between polar bodies and blastomere mutation load in a patient with m.3243A>G tRNA^{Leu}(UUR) point mutation Mitochondrion 2012 May 3. [Epub ahead of print]
- Vandewoestyne M, Heindryckx B, De Gheselle S, Lepez T, Neupane J, Gerris J, Van Coster R, De Sutter P, Deforce D. Poor correlation between polar bodies and blastomere mutation load in a patient with m.3243A>G tRNA^{Leu}(UUR) point mutation. Mitochondrion. 2012; Jul; 12 (4): 477-9.

Titre du projet :

« Optimalisatie van vitrificatie methode van gebiopsieerde embryo's »

Nom des chercheurs :

Carl Spiessens, Sophie Debrock

Institution :

UZ Leuven, Centre de Fertilité universitaire (LUFC)

Durée du projet :

11/2011 – 04/2012

État d'avancement du projet :

Les résultats ont été présentés dans une thèse de master en sciences biomédicales.

L'étude a été clôturée. Dans les deux groupes, 36 embryons ont été collectés, soit un total de 72.

Titre du projet :

« Ontrafelen van de oorzaak van frequente segmentele breuken in humane embryo's »

Nom des chercheurs :

Carl Spiessens, Thierry Voet, Thomas D'Hooghe, Sophie Debrock, Joris Vermeesch

Institution :

UZ-KU Leuven, Centre de Fertilité universitaire (LUFC)
Centre de Génétique humaine (CME)

Durée du projet :

09/2011 – 09/2015

État d'avancement du projet :

Year 1:

From September 2011 to September 2012 we have used 130 abnormally fertilised human oocytes and 73 fresh rest human embryos (the previous annual report mentioned 43 instead of 73) for (1) the optimisation of the methodology to study DNA damage response and repair in abnormally fertilised human oocytes and fresh rest human embryos following IVF, as well as DNA replication stress in rest human embryos following IVF. (2) Following optimization of the protein stainings, we studied the frequency of DNA double stranded breaks, their time of occurrence, the maternal and paternal origin as well as putative molecular causes of the DNA-double stranded breaks.

Year 2:

Between September 2012 and September 2013 we have used 23 abnormally fertilised human oocytes and 41 fresh rest human embryos following IVF for further screening.

Year 3:

No abnormally fertilised human oocytes or rest human embryos following IVF were used between September 2013 and September 2014.

Year 4:

Between September 2014 and September 2015 we have used 64 rest human embryos to investigate the role of mitochondria in DNA damage in embryos following IVF.



Références:

- The data for the study of the DNA damage response and repair mechanisms as well as DNA replication stress present in human embryos following in vitro fertilization (IVF) was included in the master thesis of Koen Theunis, entitled 'DNA schade in humane embryo's & genomwijde karakterisering van somatische genetische variatie'. This thesis is accessible through the KUL Biomedical Library.
- The data regarding the contribution of mitochondria to DNA damage in early human embryos was included in the master thesis of Celina Szanto, entitled 'Single-cell sequencing to study genomic instability in breast cancer and human cleavage stage embryos'. This thesis is also accessible through the KUL Biomedical Library.

Titre du projet :

« Genoomwijde haplotypering van blastomeren als een generische methode voor preimplantatie genetische diagnose (PGD) »

Nom des chercheurs :

Karen Sermon, Hilde Van de Velde

Institution :

VUB UZ Brussel, Centre de Reproduction humaine UZ Brussel, Centre de Génétique médicale UZ Brussel, Groupe de recherche Reproduction et Génétique VUB

Durée du projet :

09/2011- 01/10/2014

État d'avancement du projet :

Le diagnostic génétique préimplantatoire (DPI) pour maladies chromosomiques ou monogéniques est pratiqué aujourd'hui à l'aide respectivement des méthodes FISH et PCR. Ces techniques d'analyse génétique doivent cependant être optimisées pour chaque couple de patients et n'offrent actuellement pas de solution à tous les couples. L'analyse de polymorphismes simple nucléotide (SNP Array Analysis) et des variations du nombre de copies ADN dans les cellules individuelles, et la reconstruction d'haplotypes de ces cellules individuelles (Vanneste et al. 2009, Nature Medicine; Voet et al., submitted) offrent la possibilité de développer une nouvelle technique diagnostique générique pour DPI. Dans la présente étude, nous voulons appliquer la technologie d'un « proof-of-concept » en milieu clinique. 14 embryons affectés après DPI ont été dissociés cellule par cellule et introduits dans un tube PCR. Après amplification du génome entier au moyen du kit Sureplex, les échantillons ont été envoyés au Centre de Génétique humaine – KULeuven (Pr J.R. Vermeesch), avec l'ADN génomique des auteurs du projet parental et, si possible, de leurs parents. Une « SNP array analysis » y a été réalisée sur les les cellules et l'ADN génomique afin de reconstruire les haplotypes et de voir comment ils ségrègent dans les familles. L'aspect bioinformatique de ces analyses est en cours de développement à la KUL.

L'étude est encore en cours et il n'y a par conséquent encore eu aucune publication ni communication.

Références:

- Zamani Esteki M, Dimitriadou E, Mateiu L, Melotte C, Van der Aa N, Kumar P, Das R, Theunis K, Cheng J, Legius E, Moreau Y, Debrock S, D'Hooghe T, Verdyck P, De Rycke M, Sermon K, Vermeesch JR, Voet T. Concurrent whole-genome haplotyping and copy-number profiling of single cells. Am J Hum Genet. 2015 Jun 4;96(6):894-912.

V.4. Participation aux séminaires, colloques et conférences

L' « European Society of Human Reproduction & Embryology » (ESHRE) est la principale association scientifique européenne dans le domaine de la reproduction humaine et de l'embryologie (www.eshre.eu) et est l'équivalent de l'American Society for Reproductive Medicine - ASRM.

Depuis le début des travaux de la CFE, le secrétaire scientifique est membre de l'ESHRE. C'est également le cas des membres de la CFE. Les membres de la CFE actifs dans la discipline sur le plan professionnel participent aux congrès annuels. De même, depuis 2008, la CFE est chaque fois représentée à l'ESHRE.

Assemblées annuelles :

- ESHRE, juillet 2012, Istanbul, Turquie : le président et la secrétaire scientifique y ont participé.
- BSRM (Belgian Society of Reproductive Medicine), décembre 2012 : la secrétaire scientifique y a participé.
- ESHRE, juillet 2013, Londres, Royaume-Uni : la secrétaire scientifique y a participé.
- BSRM (Belgian Society of Reproductive Medicine), novembre 2013, Genk : la secrétaire scientifique y a participé.

VI. Symposiums de la CFE

La CFE a organisé son second symposium le 8 novembre 2013. En organisant ces symposiums, la CFE vise à informer toutes les parties concernées et le grand public sur la situation actuelle de la recherche embryonnaire en Belgique.

Le premier symposium avait pour thème « La recherche sur les embryons humains en Belgique ». Les présentations portaient sur les sujets suivants :

- Contenu de la loi du 11 mai 2003
- Réflexions autour de la genèse de la loi Embryons
- Recherche sur les embryons au Royaume-Uni
- La notion de consentement éclairé prévue dans la loi, les défis à relever sur les plans juridique, scientifique et éthique
- Considérations éthiques de la loi sur les embryons
- Décisions de patients concernant l'affectation de leurs embryons surnuméraires, avec une attention particulière pour le « don à la science »
- Panel de discussion avec des chercheurs des centres universitaires qui ont introduit des projets auprès de la CFE

Notre loi a fêté ses 10 ans en 2003. La CFE donc a souhaité prendre du recul quant à la façon dont la loi de 2003 avait été mise en pratique et a par conséquent examiné les évolutions intervenues en Belgique et ailleurs dans le domaine ces 10 dernières années.

Sujets abordés à cette occasion :

- Aperçu et comparaison de la législation sur la recherche embryonnaire en Europe
- État de la recherche sur les embryons aux Pays-Bas et en France
- Expérience des Commissions d'éthique médicale en Belgique avec des projets de recherche embryonnaire
- Réalisations de 10 ans de recherche en Belgique sur les embryons
- Panel de discussion sur la loi Embryons en relation avec la loi relative aux expérimentations sur la personne humaine et la loi relative à l'utilisation du matériel corporel humain. La chronologie des initiatives législatives a été expliquée. L'application pratique des différents textes de loi a été examinée au moyen d'études de cas concrets.

VII. Points d'attention

Le groupe de travail « Formulaire de consentement » n'a pas encore suffisamment de participants et ne s'est donc pas réuni durant la période 2012-2014.

En 2015, le groupe de travail « Formulaire de suivi » préparera une version améliorée du formulaire afin de garantir un suivi efficace des avis en cours.

En raison des absences au secrétariat, le troisième symposium de la CFE sera organisé en 2016.

La fonction de secrétaire scientifique (niveau A3) est encore et toujours assurée par un agent de niveau A1, le Dr Kontozova-Deutsch Velichka.

La fonction de secrétaire administratif est à nouveau vacante (Mme Decaluwé Carine a démissionné en octobre 2014).

VIII. Conclusions et perspectives

Au cours de la période 2012-2014, la CFE a continué à exercer ses activités comme la loi le prévoit. En raison de la situation instable du secrétariat au SPF SPSCAE, certaines activités prévues telles que l'organisation d'un symposium sont reportées.

Les tâches que la CFE est appelée à remplir en 2014-2015 sont les suivantes :

- La Commission doit continuer à répertorier de manière précise et exhaustive la recherche médicale et scientifique sur les embryons in vitro en Belgique.
- La Commission doit prendre position quant aux conditions d'utilisation d'embryons cryopréservés pour la recherche sur les embryons in vitro. En effet, dans bon nombre de cas, les informations traitées dans le formulaire de consentement conformément à la loi PMA du 6 juillet 2007 ne satisferont pas aux conditions posées conformément à l'article 8 de la loi du 11 mai 2003 sur les embryons.
- La Commission souhaite élaborer d'autres directives, dans des groupes de travail, en vue d'apporter un soutien aux Comités d'éthique locaux, plus spécifiquement en ce qui concerne les documents relatifs aux « informations à l'intention du patient » et aux « formulaires de consentement », ainsi que des directives pratiques relatives à la recherche sur les embryons in vitro en Belgique, lesquelles seront axées davantage sur les chercheurs.

Le présent rapport d'activité pour les années 2012 – 2014 a été approuvé le 07/12/2015 en réunion plénière (RP 64) de la CFE.





IX. Annexes

Annexe 1. Présence aux réunions de la Commission fédérale pour la recherche médicale et scientifique sur les embryons in vitro en 2012 - 2014

1ste SEMESTER								
Naam leden	effectieve leden / plaatsvervangers	26/01/2012	6/02/2012	13/02/2012	16/04/2012	4/06/2012	10/07/2012	TOTAAL
Bénédicte Jacobs	Voorziter	bureau	bureau	bureau	P/A + bureau	P/A + bureau		7
André Van Steirteghem	Ondervoorziter	bureau	bureau	bureau	P/A + bureau	P/A + bureau		7
jean-Jacques Cassin	Effectif				P/A	P/A		2
Fabienne Devreker	Effectif				A	E		
Sophie Perrier d'Hertogenbosch	Suppléant/Effectif				E	E		
Thomas D'Hooghe	Suppléant				E	P/A		1
Paul Cosyns	Suppléant				E	A		
Luc Roegiers	Effectif/Démission				A	A		
Gilbert Cooreman	Effectif				A	A		
Usha Rani Punjabi	Suppléant				P/A	E		1
Björn Heindryckx*	Suppléant/Effectif				P/A	E		1
Anne Van Cauwenbergh	Effectif				E	E		
Emmanuel Hermand	Suppléant				A	A		
Josiane Van Der Elzen	Effectif				A	A		
Arsène Burny	Effectif/				P/A	A	P	2
Caroline Jouan*	Suppléant/Effectif				E	E		
Dirk Van Der Kelder	Effectif				A	A		
Gallus Nicole	Effectif				A	A		
Erik Mewissen	Suppléant				A	A		
Guido Pennings	Suppléant				P/A	A		1
Marie-Geneviève Poncelet	Effectif				E	E		
Sofie Blanquaert	Effectif				A	A		
Laurent Ravez*	Suppléant				A	A		
Françoise Cailleau	Effectif				E	P/A		1
Gerry Evers-Kiebooms	Suppléant				A	A		
Henri Alexandre*	Suppléant				E	P/A		1

Docteurs en médecine

Docteurs en sciences

Juristes

Experts éthique

Présence = P

Excusé = E

Absent = A

lijst niet aanwezig

NIEUWE LEDEN 2de Semester

Naam leden	Effectieve leden plaatsvervangers	10/07/2012	16/07/2012	17/09/2012	24/09/2012	1/10/2012	15/10/2012	5/11/2012	12/11/2012	10/12/2012	TOTAAL
André Van Steir	Voorziter	PV + bureau	Bureau	A/P + bureau	bureau	bureau	bureau	bureau	PV + bureau	bureau	9
Bénédicte Jaco	Ondervoo	PV + bureau	Bureau	A/P + bureau	bureau	bureau	bureau	bureau	PV + bureau	bureau	8
jean-Jacques C	Effectif	A/P		A/P					A/P		3
Fabienne Devre	Effectif	E		A					E		
Sophie Perrier	Effectif	E		E					A		
Thomas D'Hoog	Suppléant	E		E					E		
Marc Dhont	Suppléant	E		A					A		
Usha Rani Punj	Effectif	A/P		A/P					A/P		3
Björn Heindryck	Suppléant	A/P		A/P					A/P		2
Caroline Jouan	Effectif	E		A					A		
Yves Sznajer	Effectif	A/P		A/P					E		2
Sophie Debrock	Effectif	A/P		A/P					E		3
Karen Sermon	Suppléant	A/P		A/P					A/P		3
Herman Nys	Effectif	V		E					A		
Diego Fornacia	Suppléant	A/P		A/P					A/P		3
Guido Pennings	Effectif	A/P		E					A/P		2
Marie-Geneviève	Effectif	E		A/P					A/P		3
Laurent Ravez	Effectif	E		A					E		1
Françoise Caill	Suppléant	A/P		A					A		
Robert Rubens	Effectif	A/P		A/P					E		1

Naam leden	Effectieve leden plaatsvervangers	14/01/2013 bureau	14/01/2013 plenaire	21/01/2013 bureau	12/02/2013 bureau	25/02/2013 bureau	05/03/2013 bureau	18/03/2013 bureau	18/03/2013 plenaire	22/04/2013 bureau	22/04/2013 plenaire	27/05/2013 bureau	27/05/2013 plenaire	12/06/2013 bureau	24/06/2013 bureau	26/08/2013 bureau	12/09/2013 bureau	16/09/2013 bureau	14/10/2013 bureau	28/10/2013 bureau	18/11/2013 bureau	04/12/2013 bureau	10/12/2013 bureau	TOTAL	
André Van Steirteghem VZ	Effectif	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	22
Bénédicte Jacobs OVZ	Effectif	EV	EV	PA	EV	EV	PA	EV	EV	EV	EV	EV	EV	EV	EV	EV	EV	EV	EV	EV	EV	EV	EV	EV	9
Jean-Jacques Cassiman	Effectif		PA					PA	PA																2
Fabienne Devreker	Effectif		PA					PA	PA																2
Sophie Perrier d'Hauterive	Effectif		EV					A	A																
Thomas D'Hooghe	Suppléant		EV					EV	EV																
Marc Dhont	Suppléant		A					A	A																
Usha Rani Punjabi	Effectif		PA					PA	PA																6
Sophie Debrock	Effectif		EV					PA	PA																3
Caroline Jouan	Effectif		A					A	A																
Yves Sznajer	Effectif		PA					PA	PA																3
Björn Heindryckx	Suppléant		PA					PA	PA																5
Karen Sermon	Suppléant		EV					EV	EV																3
Herman Nys	Effectif		EV					EV	EV																
Diego Fomaciari	Suppléant		PA					EV	EV																2
Guido Pennings	Effectif		EV					PA	PA																3
Robert Rubens	Effectif		EV					PA	PA																3
Marie-Geneviève Pinsart	Effectif		EV					PA	PA																2
Laurent Ravez	Effectif		EV					A	A																
Françoise Cailleau	Suppléant		EV					PA	EV																1
Nieuwe leden benoemd door de Senaat op 07/11/2013																									
Paul Cosyns																					Paul Cosyns				1
Henri Alexandre																					Henri Alexandre				1
Jean-Marc Hausman																					Jean-Marc Hausman				
Hilde Van De Velde																					Hilde Van De Velde				1
Heidi Mertens																					Heidi Mertens				1
Tatjana Poplarova																					Tatjana Poplarova				1



Naam leden	Effectieve leden plaatsvervangers	27/01/2014 bureau	24/02/2014 plenair	24/03/2014 plenair	27/03/2014 bureau	24/04/2014 bureau	23/06/2014 plenair	15/09/2014 bureau	21/10/2014 bureau	15/12/2014 plenair	TOTAAL
André Van Steirteghem VZ	Voorzitter	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	9
Bénédicte Jacobs OVZ	Ondrevoorzitter	PA	EV	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	8
jean-Jacques Cassiman	Effectif		EV	EV			PA			EV	1
Fabienne Devreker	Effectif		PA	EV			PA			EV	2
Sophie Perrier d'Hauterive	Effectif		A	A			A			A	0
Thomas D'Hooghe	Suppléant		EV	EV			EV			EV	0
Marc Dhont	Suppléant		A	A			A			A	0
Paul Cosyns	plaatsvervanger		PA	PA			PA			PA	4
Usha Rani Punjabi	Effectif		PA	PA			PA			PA	4
Sophie Debrock	Effectif		PA	EV			EV			EV	1
Caroline Jouan	Effectif		A	A			A		A	A	0
Yves Sznajer	Effectif		EV	PA			EV			EV	1
Björn Heindryckx	Suppléant		EV	EV			PA			EV	1
Karen Sermon	Suppléant		EV	EV			PA			EV	1
Henri Alexandre	Suppléant		PA	PA			PA			PA	4
Herman Nys	Effectif		EV	EV			EV			EV	0
Diego Fornaciari	Suppléant		PA	A			EV			EV	1
Jean-Marc Hausman	Suppléant		A	EV			PA			EV	1
Guido Pennings	Effectif		A	EV			EV			PA	1
Robert Rubens	Effectif		PA	EV			EV			PA	2
Marie-Geneviève Pinsart	Effectif		EV	PA			EV			PA	2
Laurent Ravez	Effectif		A	A			A			A	0
Françoise Cailleau	Suppléant		EV	EV			EV			EV	0
Hilde Van De Velde	plaatsvervanger		PA	PA			PA			EV	3
Heidi Mertens	plaatsvervanger		PA	PA			PA			EV	3
Tatjana Poplazarova	plaatsvervanger		A	PA			PA			EV	2

Annexe 2 : Composition de la Commission fédérale (Avis officiels au Moniteur belge des 31/03/2006 et 05/12/2008)

<u>Le Bureau exécutif</u>	
PRESIDENTE – VOORZITTER Bénédicte JACOBS (FR)	VICE-PRESIDENT – ONDER-VOORZITTER André VAN STEIRTEGHEM (NL)
<u>Les groupes de travail</u>	
Docteurs en médecine - Artsen	
Jean-Jacques CASSIMAN (NL) Gilbert COOREMAN (NL) Fabienne DEVREKER (FR) Luc ROEGIERS (FR) – ontslag 15/06/2010 – einde van mandaat	Thomas D’HOOGHE (NL) Paul COSYNS (NL) Sophie PERRIER d’HAUTERIVE (FR) Dominique CHARLIER (FR) – Démission le 06/09/2009
Docteurs en Sciences – Doctors in Wetenschappen	
Robert PIJNENBORG (NL) – ontslag op 06/03/2009 Josiane VAN DER ELST (NL) Arsène BURNY (FR) Anne VAN CAUWENBERGE (FR)	Björn HEINDRICKX (NL) Usha Rani PUNJABI (NL) Caroline JOUAN (FR) Emmanuel HERMANS (FR)
Juristes – Juristen	
Dirk VAN DER KELEN (NL) – ontslag 14/06/2010 – einde van mandaat Bénédicte JACOBS (Présidente - FR)	Erik MEWISSEN (NL) Nicole GALLUS (FR)
Experts en questions éthiques et en sciences sociales Deskundigen in de ethische problemen en de sociale wetenschappen	
Sofie BLANCQUAERT (NL) - einde van mandaat - 14/06/2010 André VAN STEIRTEGHEM (Ondervoorzitter - NL) Marie-Geneviève PINSART (FR) Françoise CAILLEAU (FR)	Gerry EVERS-KIEBOOMS (NL) – ontslag 14/06/2010 – einde van mandaat Guido PENNINGNS (NL) Laurent RAVEZ (FR) Henri ALEXANDRE (FR)
<u>Le secrétariat</u>	
Secrétaire scientifique Wetenschappelijk secretaris Ann DEVOS (01/01/2007 - 17/12/2008) Fabrice PETERS (07/01/2008 – 31/08/2010) Didier STRAELER (01/09/2010 – 01/04/2011) -	Secrétaire administratif adjoint Adjunct administratief secretaris - Inge VAN MIEGHEM (01/02/2009 - 01/06/2010) Isabelle DE MAESENEIRE (01/08/2010 - 01/10/2011) -

Annexe 3. Vue d'ensemble des avis de la CFE pour la période 2008-2013

Avis	Nom du projet Equipe Centre de recherche	Date de réception du dossier	Avis comité d'éthique local	Décision	Date d'accord ou de refus	Terme
Adv 028	Totipotency in early human embryos and embryonic stem cells Prof. Hilde Van de Velde UZ Brussel,	30/05/2010	12/05/2010	Avis positif rendu lors de la RP 35	04/10/2010	4 ans
Adv 029	Vitricafite van eicellen en embryo's van de mens Prof. Hilde Van de Velde UZ Brussel	19/10/2010	23/09/2010	Avis positif rendu lors de la RP 40	27/06/2011	4 ans
Adv 30	Amendementen op goedgekeurde studie": "Invloed van embryomorfologie op stamcelderivatie efficiënte en moleculaire karakterisering/identificatie van intermediaire structuren tussen binnenste celmassa en stamceluitgroei Prof. Dr. P. De SUTTER UZ Gent,	25/10/2010	21/04/2010	Avis positif rendu lors de la RP 35	29/11/2010	4 ans
Adv 031	Vergelijking van de embryokwaliteit bij in vitro fertilisatie (IVF) bij gebruik van twee identische cultuurmedia in een verschillende cultuuromgeving: een pilootstudie Dr. Willem OMBELET Ziekenhuizen Oost-Limburg (ZOL)	08/11/2012		Report avis favorable / Questions et remarques additionnelles 29/11/2010	Avis négatif	
Adv 032	Research at the interface between human genetics and reproduction (Methusalem grant) : derivation of human embryonic stem cell lines from human preimplantation embryos Prof. Dr. K. Sermon UZ Brussel	24/05/2011	23/12/2010	Avis positif rendu lors de la RP 40	27/06/11	4 ans
Adv 033	Onderzoek van de epigenetische stabiliteit en veiligheid van geassocieerde voortplantingstechnieken Prof. De Rycke Martine.martine.derycke@uzbrussel.be UZ Brussel,	24/05/2011	03/02/2011	Avis positif rendu lors de la RP 40	27/06/11	4 ans
Adv 034	Totipotency and differentiation in early human embryonic cells Prof. Hilde Van de Velde UZ Brussel	10/06/2011	01/06/2011	Avis positif rendu lors de la RP 40	27/06/11	4 ans

Adv 035	The effect of vitrification versus slow freezing on day 3: a randomised controlled trial Prof. Dr. S. Debrock UZ Leuven	23/08/2011			La CFE ne doit pas rendre d'avis sur le projet déposé RP 05/09/2011		
Adv 036	Exploring the true nature of human pluripotent stem cells: differences and similarities in key gene expression and differentiation capacity Prof. Dr. K. Sermon UZ Brussel	10/11/2011	07/04/2011		Avis positif rendu lors de la RP 44	19/12/11	4 ans
Adv 037	Betreffende gebruik van PGD (pre-implantatie genetische diagnostiek) op het poollichaam van de eicel bij mitochondriale pathologie: validatie van de PGD techniek op embryo's Prof. Dr. P. De SUTTER UZ Gent	14/11/2011	27/09/2011		Avis positif rendu lors de la RP 44	19/12/2011	4 ans
Adv 038	OPTIMALISATIE VAN VITRIFICATIE METHODE VAN GEBIOPSIËERDE EMBRYO'S Prof. Dr. S. Debrock UZ Leuven	14/11/2011	09/11/2011		Avis positif rendu lors de la RP 43	28/11/2011	4 ans
Adv 039	Ontreken van de oorzaak van frequente segmentele breuken in humane embryo's Prof. Dr. T. D'Hooghe Prof. Dr. Thierry Voet UZ Leuven	08/12/0211	19/11/2011		Avis positif rendu lors de la RP 44	19/12/2011	4 ans
Adv 040	Genoomwijde haplotypering van blastomeren als een generische methode voor preimplantatie genetische diagnose (PGD) Prof. Dr. T. D'Hooghe Prof. Dr. Thierry Voet UZ Leuven Prof. Dr. Karen Sermon, Prof. Dr. Hilde Van de Velde Hilde UZ Brussel	08/12/2011	27/05/2011 21/06/2011		Avis positif rendu lors de la RP 44	19/12/2011	4 ans

Adv 041	<p>Anecova NCVd19H study: A prospective, multicentre, randomized, open study to assess the effect of in vivo development using the Anecova technology as compared to in vitro culture in patients with subfertility undergoing assisted reproductive medical treatment"</p> <p>Prof. Christophe Blockeel, Prof. Luc Delbeke, Prof. Petra Desuter</p> <p>Centrum voor Reproductieve Geneeskunde (CRG); Vakgroep Embryologie en Genetica (EMGE), UZ Brussel, UZ Antwerpen</p>	11/06/2012	10/05/2012	Avis positif rendu lors de la RP 47	10/07/2012	1.5 an
Adv 042	<p>Understanding embryonic chromosome instability and the origins of genetic variation by genome and transcriptome sequencing of human in vitro fertilised preimplantation embryos."</p> <p>Thomas D'Hooghe, Thierry Voet, Sophie Debrock, Joris Vermeesch, Niels Van der Aa</p> <p>UZ-KU Leuven</p>	26/06/2012	26/06/2012	Avis positif rendu lors de la RP 48	17/09/2012	4 ans
Adv 043	<p>Evaluation and Implementation of Simulated Physiological Oocyte Maturation as cost-effective and safe assisted reproduction technology</p> <p>Smits Johan, Devos Michel, Anckaert Ellen, Guzman Luis, Verheyen Greta</p> <p>UZ Brussel</p>	10/2012	11/07/2012	Avis positif rendu lors de la RP 49	12/11/2012	3 ans
Adv 044	<p>De immunologie van implantatie"</p> <p>Van de Velde Hilde, Mackens Shari</p> <p>VUB - UZBRUSSEL</p>	04/2013	02/2013	Avis positif rendu lors de la RP 52	22/04/2013	4 ans
Adv 045	<p>Investigation of implantation regulators in the human embryo"</p> <p>Hilde Van de Velde, Asma Aberkane</p> <p>VUB - UZBRUSSEL</p>	01/04/2013	08/02/2013	Avis positif rendu lors de la RP 52	22/04/2013	3 ans

Adv 046	Isolation of Hypoblast Stem Cells (HypoSC) from human embryos" Catherine Verfaillie, Thomas D'Hooghe, Antonio Lo Nigro KU Leuven, Stamcelinstituut	01/05/2013	19/02/2013	Avis positif rendu lors de la RP 53	27/05/2013	2 ans
Adv 047	Evaluatie van groeps cultuur van humane embryo's volgens het rundermodel met als doel de optimalisatie van de « Single Embryo Transfer » (SET) strategie" Petra De Sutter, Usha Punjabi, Goovaerts Ilse, Van Soom Ann, Wydooghe Eline UZ Gent // UZ Antwerpen	11/11/2013	06/11/2013	Avis positif rendu lors de la RP 53	27/05/2013	2 ans
Adv 048	Kennis- en onderzoeksgedreven aanmaak van humane embryonale stamcellen in een naieve grondtoestand van pluripotentie KU Leuven	17/01/2014	30/07/2013	Avis Negatief rendu lors de la RP 55	24/02/2014	
Adv 049	Investigation of trophectoderm regulators playing a role in human embryo implantation VUB UZ Brussel	13/02/2014	11/02/2014	Avis positif rendu lors de la RP 56	24/03/2014	3 jaar
Adv 050	Totipotency versus fate determination in human embryonic cells VUB UZ Brussel	14/02/2014	05/12/2013	Avis positif rendu lors de la RP 56	24/03/2014	4 jaar

Questions					
	G. Genicot – question concernant la loi du 19 décembre 2008 relative à l'utilisation de matériel corporel humain	12/07/2012		La CFE a formulé une réponse lors de la RP 48	17/09/2012
	K.Sermon, B. Heindryckx - Faire breveter et/ou commercialiser des cellules souches embryonnaires en Belgique	26/10/2012		Les experts externes G. Van Overwalle, S. Sterckx, et J. Cockbain ont rendu un avis. La CFE a formulé une réponse lors de la RP 50	14/01/2013
	Parliamentary Question - 1 55-8874	26/04/2013		Le secrétariat de la CFE a formulé une réponse	30/04/2013
	Lenougue – Problématique FIV	17/06/2013		Le Bureau de la CFE a formulé une réponse	25/06/2013
	Habib Zaïlia - regulatory requirements for clinical trials in Belgium for a product to be used during in-vitro fertilization procedures	07/06/2013		La CFE a formulé une réponse lors de la RP53	26/08/2013
	QO 19404 - Fonck - bébés médicaments	20/08/2013		La CFE a formulé une réponse lors de la RP53	26/08/2013
	DESTINY STUDY	22/05/2014		La CFE ne doit pas rendre d'avis sur le projet déposé	23/06/2014

Bijlage 4. Aperçu de l'utilisation d'embryons et d'ovules à des fins de recherche scientifique, sur la base de formulaires de suivi

ADVIS / AVIS	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	
ADV_010	500 FS	150 FS	Voornamelijk ingevroren embryo's die vrijkomen na de wettelijke bewaartermijn					
ADV_011	150 FS							
ADV_013	141 FS E 11 FS OV							
ADV_014	20 CS	6 CS						
ADV_020								
ADV_021			150 FS	235 FS	60 FS	75 FS		
ADV_022			1832 FS	814 FS + 196 CS (totaal 1010)	178 FS + 73 CS (totaal 251)			
ADV_025			28 FCr + 285 FS+33 CS (346)	11 FCr + 279FS + 51 CS (341)	8 FCr + 105 FS (113)	39 FCr + 167 FS + 8 CS (140)		
ADV_027			69 FS + 25 CS (94)	81 FS + 55 CS (136)	12 FS + 10 CS (22)			
ADV_028			15 FCr + 361 FS + 303 CS (679)	17 FCr + 120 FS + 26 CS (163)	4 FCr + 312 FS + 27 CS (343)	18 FCr + 294 FS + 212 CS (499)		
ADV_029			124 FCr + 90 FS (214)	41 FCr + 30 FS (71)	60 FS + 89 CS (149)	85 FCr + 201 FS + 29 CS (315)		
ADV_030				785 FS + 57 CS (842)	380 FS + 131 CS (511)	850 FS + 400 CS (1250)	114 CS	
ADV_032				26 FS	17 FS	14 FS	2 FS	
ADV_033				279 FS + 116 CS (395)	13 Cr + 135 FS (148)			

ADV_034									
ADV_036									
ADV_037									
ADV_038									
ADV_039									
ADV_040									
Totaal	811 E 11 OV	156	3315	3551	1739	2297	180		

Legenda:

- E = embryon/embryo,
- F = frais/vers,
- S = surnuméraire/boventallige,
- C = congelé/bevroren,
- Cr = créé/gemaakt,
- OV= ovocyte/eicel,
- I = immature/onrijp,
- A = Autres/Andere (concerne des embryons issus d'ovocytes fécondés anormaux (1PN et 3PN))/ betreft embryo's afkomstig van abnormaal gefertiliseerde eicellen (1PN of 3PN)).



service public fédéral

**SANTÉ PUBLIQUE,
SECURITE DE LA CHAÎNE ALIMENTAIRE
ET ENVIRONNEMENT**

Kontozova-Deutsch Velichka
Attaché scientifique
Soins Aigus, Chroniques et Personnes Agées
Organisation des Etablissements de Soins
Cellule Organes, Embryons et Bio-Etique
Place Victor Horta, 40/10 | 1060 Saint-Gilles | Belgique
Bureau 1D269 | t +32(0) 2 524 87 40 | f +32(0) 2 524 85 99
Velichka.Kontozova@sante.belgique.be