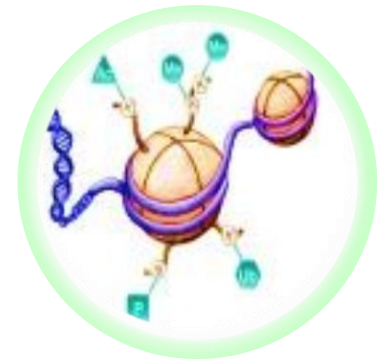


Mars 2023



Biologistes des Laboratoires d'Etude de la Fécondation
et de la Conservation de l'Oeuf



Environnement, épigénétique et AMP

Patricia Fauque, MD-PhD

Laboratoire de Biologie de la Reproduction

Centre Hospitalo-Universitaire d'Assistance Médicale à la Procréation

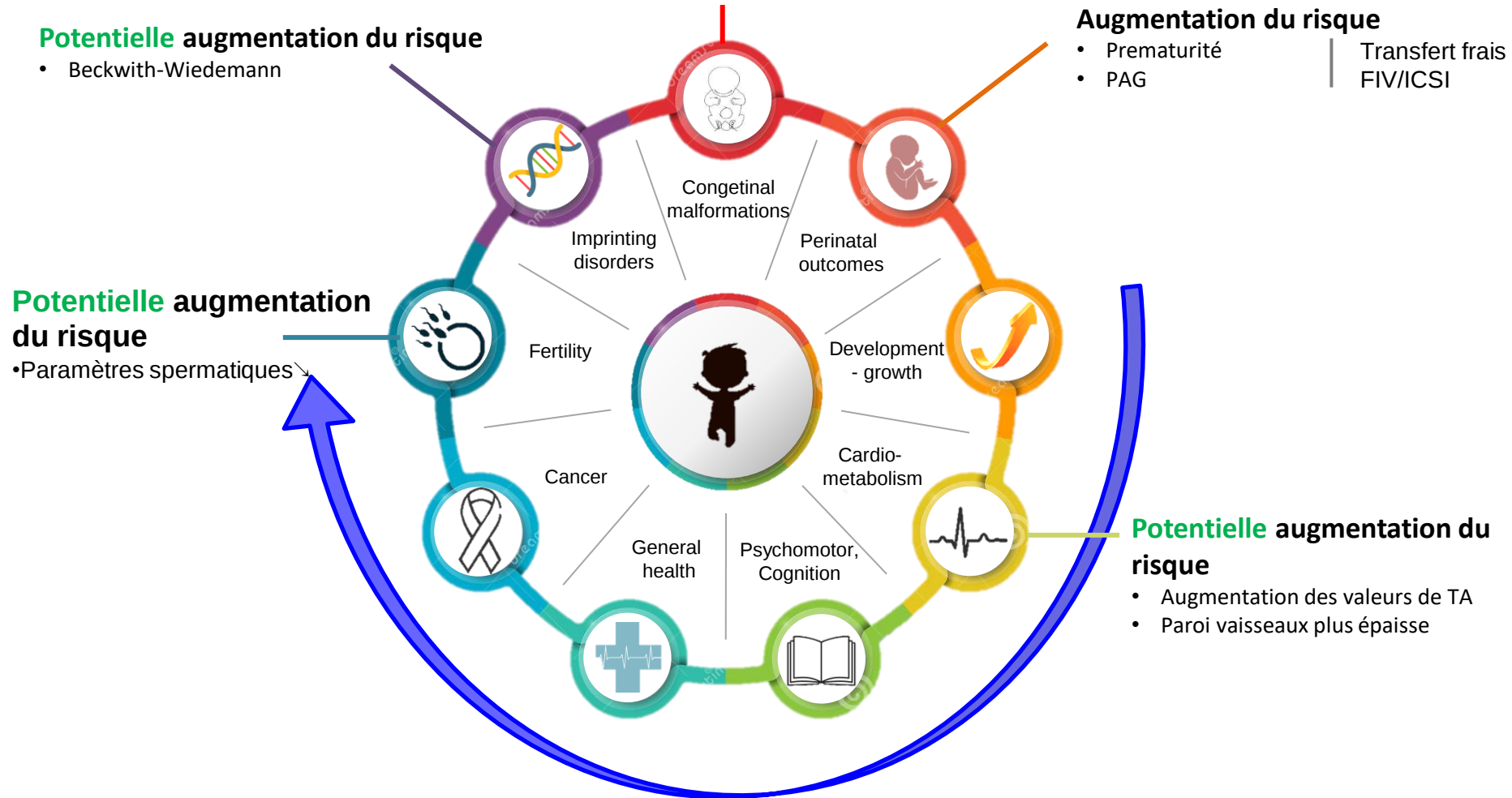
CHU de DIJON

Inserm 1231, équipe Génétique des Anomalies du Développement



Journée des Techniciens et Biologistes en AMP

1- AMP / Singletons



1- AMP / Singletons

Augmentation du risque

- musculosquelettique,
- digestif,
- urinaire,
- cardiaque
- respiratoire

Transfert frais FIV/ICSI

Potentielle augmentation du risque

- Beckwith-Wiedemann

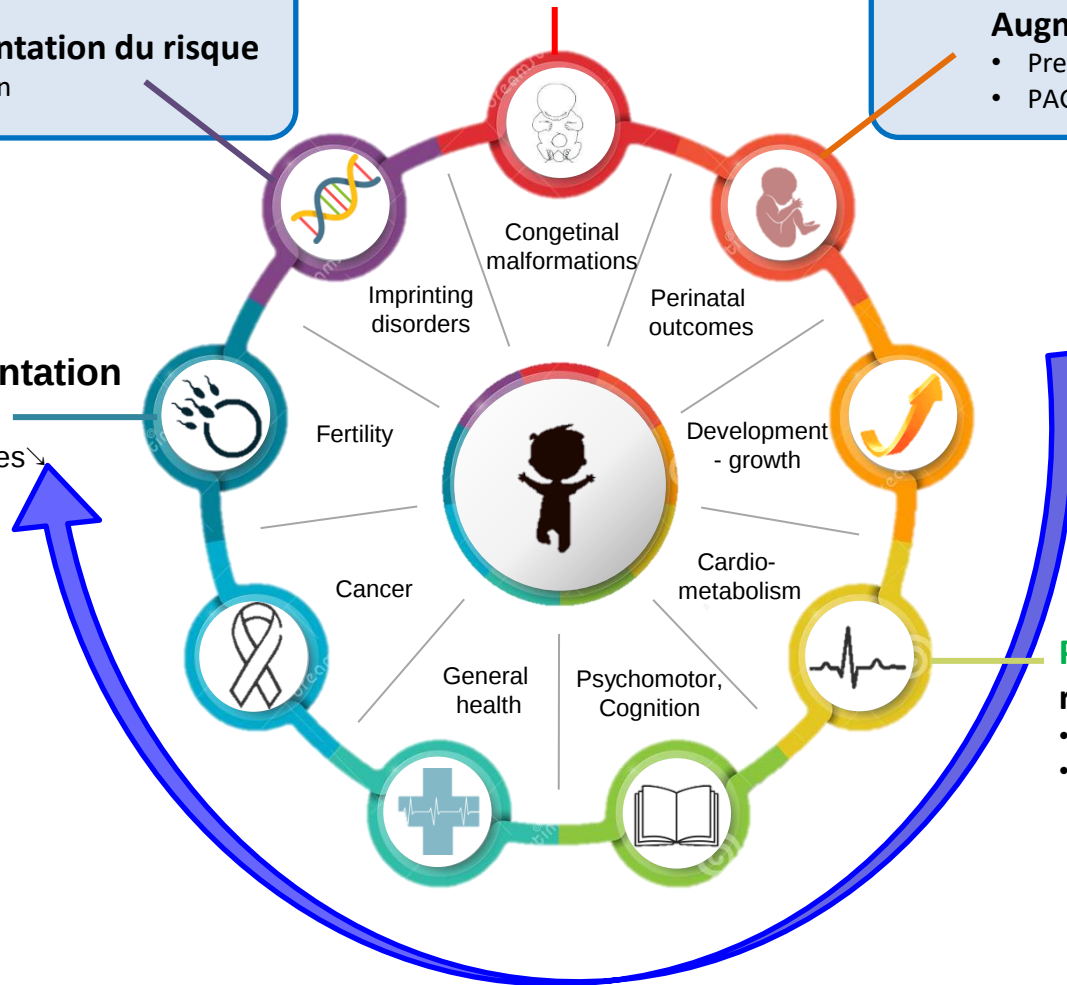
Augmentation du risque

- Prematurité
- PAG

Transfert frais FIV/ICSI

Potentielle augmentation du risque

- Paramètres spermatiques

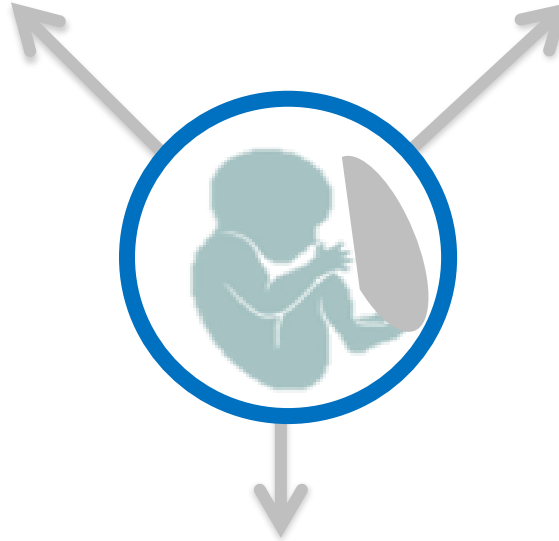


1- AMP

/ Singletons

Développement placentaire¹

- **HT gestationnelle**
x1.6 (1.0-2.5)²
- **Pré-éclampsie**
x2.7 (1.7-4.4)²
- **Placenta praevia**
x6.0 (3.4-10.7)²
- **HRP**
x2.4 (1.1-5.2)²



Développement fetal

- **PAG**
x1.3 (1.0-2.5)²
- **Prématurité**
x1.5²
x1.6 (1.3, 1.9)⁴
- **GAG**
x1.4 (1.0-1.9)⁵ TEC vs CN



Viabilité

- **FCS**
x1.2 (1.0-1.5)³

1. Fauque, review in Encyclopedia of Endocrine Diseases 2nd Edition, 2018

2. Shevell et al., OG 2005

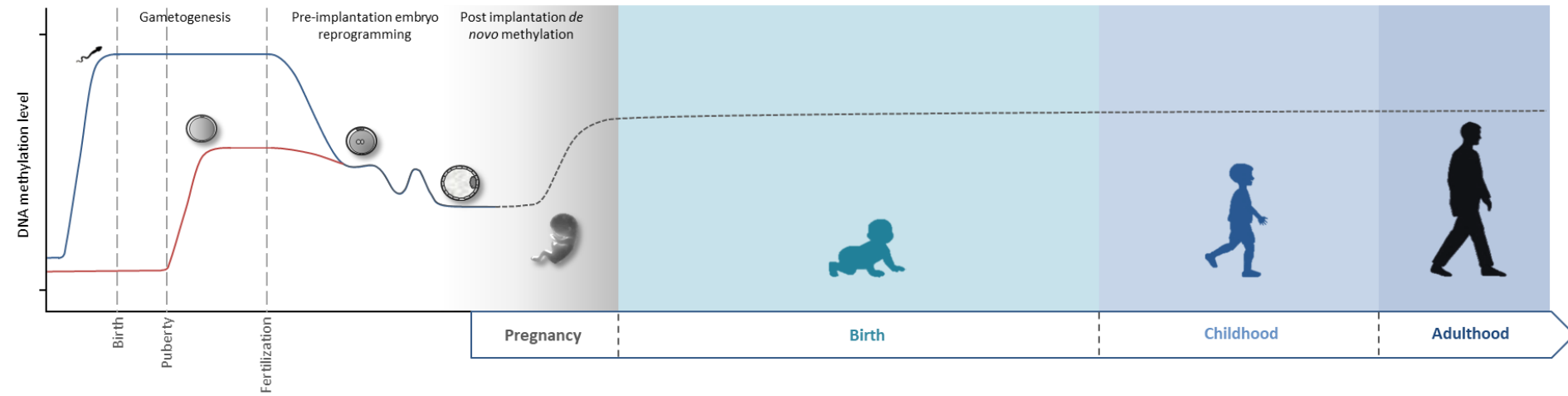
3. Wang et al., HR 2004

4. Pinborg et al., HRU 2013

5. Pinborg et al., HR 2014

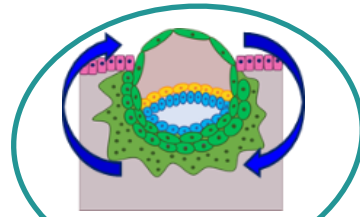
2-Epigénétique

Modifications au cours du développement

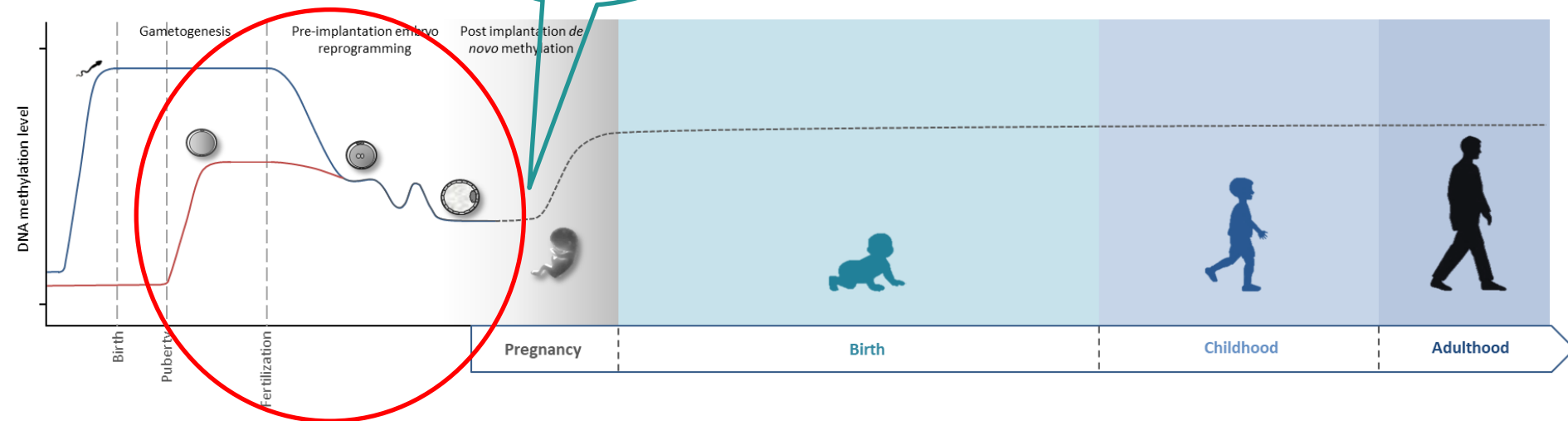


2-Epigénétique

Modifications au cours du développement



Dialogue moléculaire impliquant des facteurs épigénétiques / modifié sous l'effet des **traitements hormonaux**



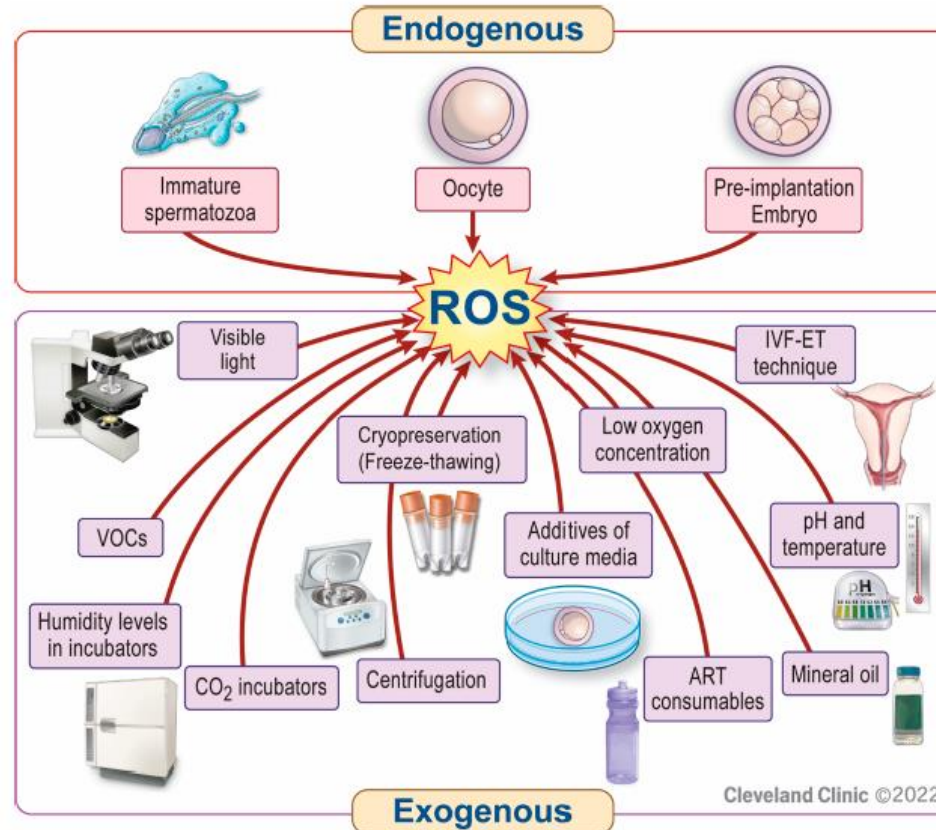
↑
Environnement in vitro /
manipulations gametes et embryons

3-Environnement *in vitro*

Source de stress



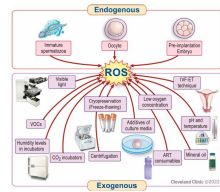
Les techniques d'AMP impliquent une variété d'interventions qui ont un impact sur l'ovocyte et l'embryon.



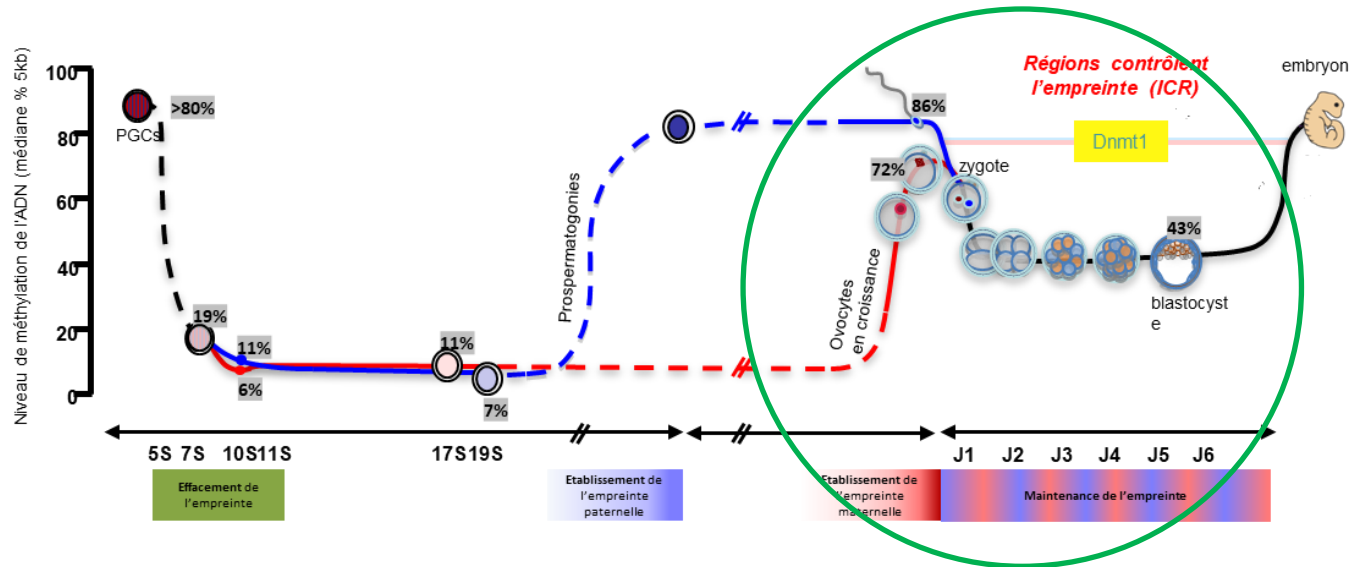
Agarwal et al, 2021

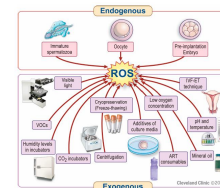
Ces interventions provoquent un stress considérable

Interaction entre stress=> combinaison de stress

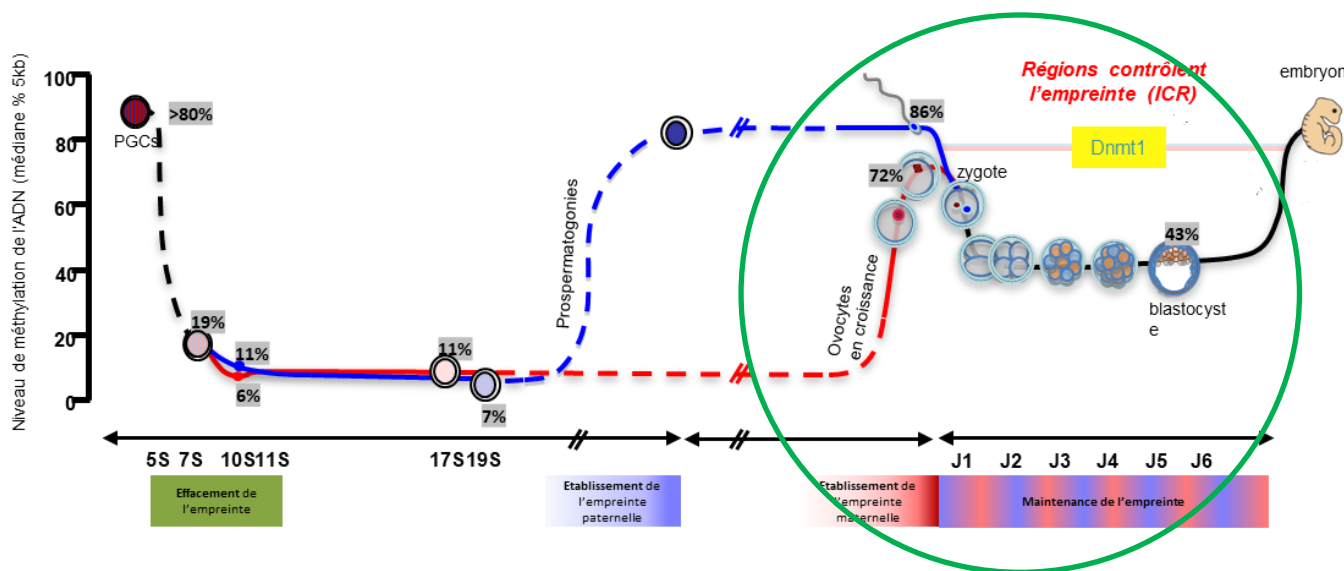


Et ces interventions **coïncident avec d'importants événements épigénétiques** tout au long de la gamétogenèse, fécondation et développement embryonnaire pré-implantatoire





Et ces interventions **coïncident avec d'importants événements épigénétiques** tout au long de la gamétogenèse, fécondation et développement embryonnaire pré-implantatoire

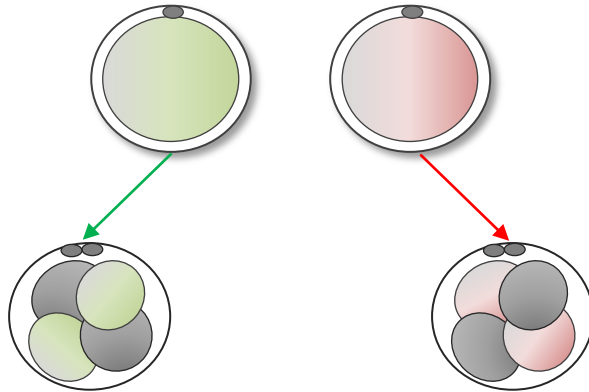


L'embryon possède des voies de signalisation innées de « **facteurs de survie** »

mais lorsqu'un embryon est placé en culture=> cette signalisation en réponse au stress *in vitro* devient d'une importance majeure pour atténuer les effets du stress causé par l'environnement *in vitro*.



Mais **tous les embryons ne possèdent pas cette capacité à s'adapter au stress *in vitro*!**



⇒ **la source des gamètes**

les embryons eux-mêmes ont des **capacités différentes** à se développer dans un système de culture donné, en fonction :

- de leur bagage génétique/épigénétique
- des compétences acquises lors de croissance/différenciation des ovocytes dont ils sont issus

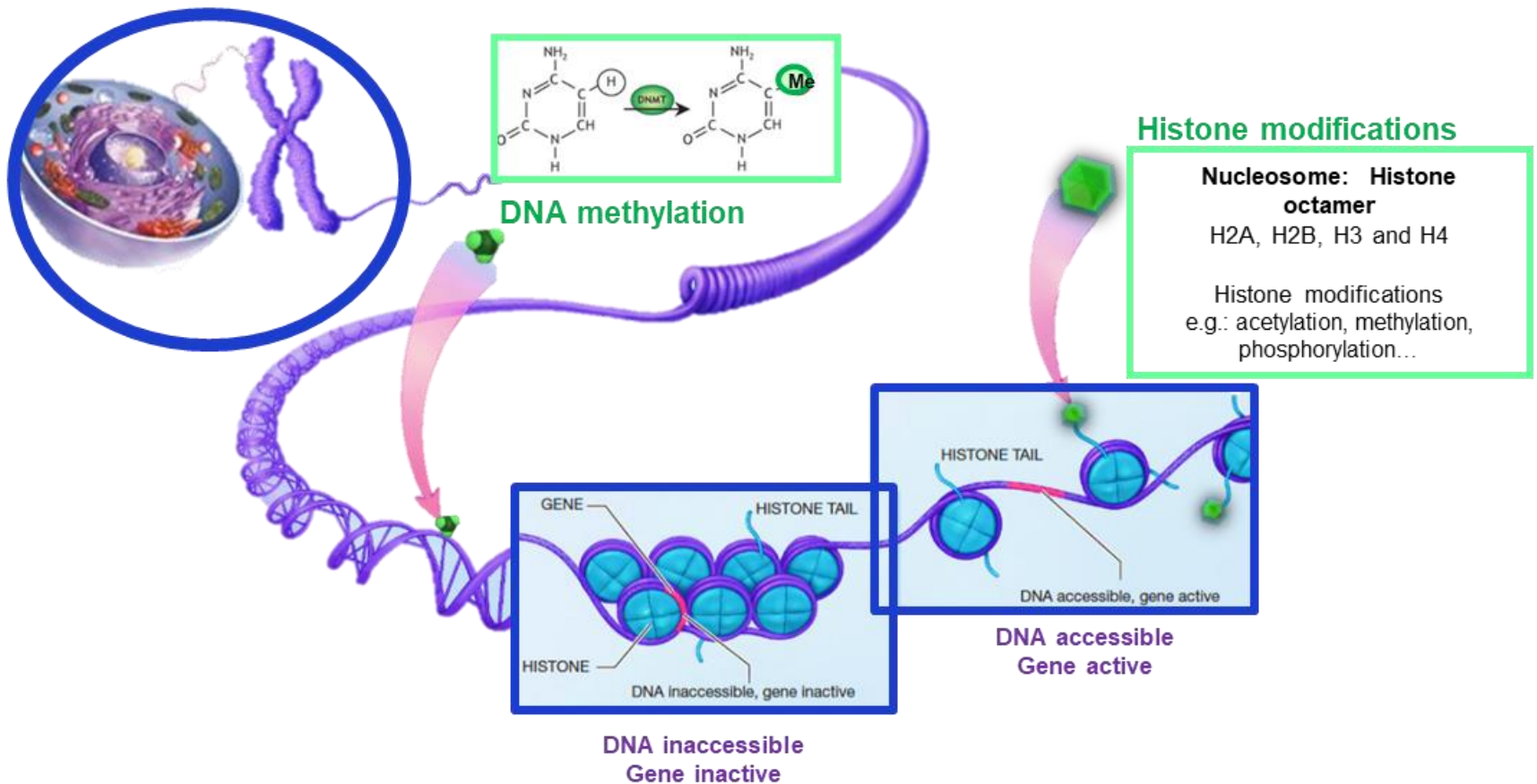
=> **les conditions de culture ultérieures des gamètes et des embryons** sont d'une importance cruciale

La compétence de développement d'un embryon en conditions *in vitro* est considérée comme sa réponse à une **série de facteurs de stress qui sont labos-dépendants**



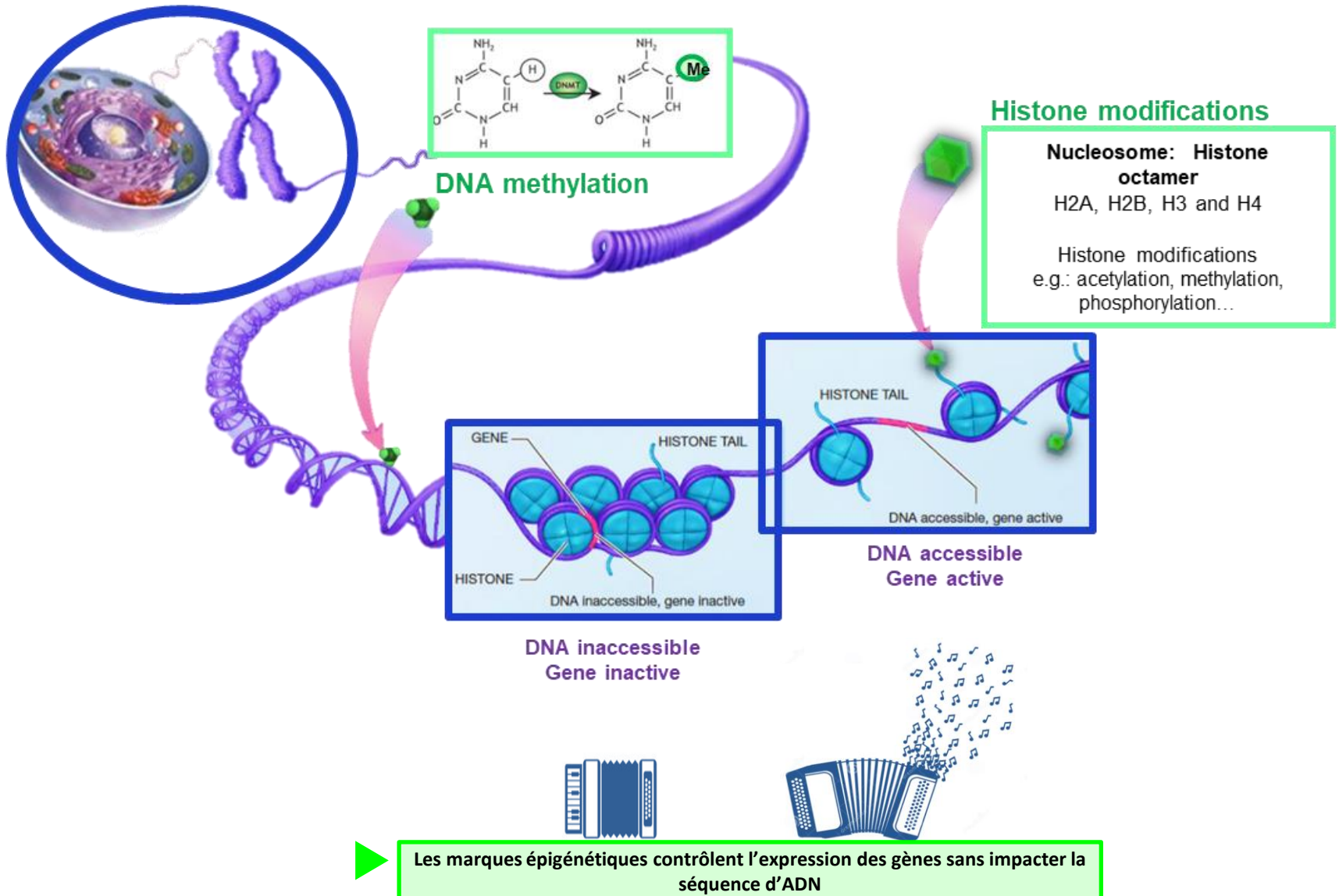


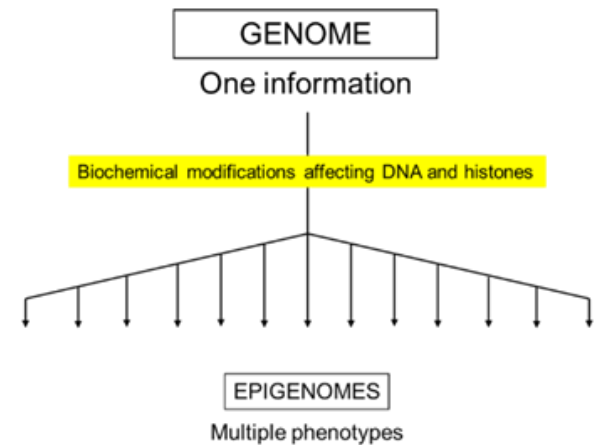
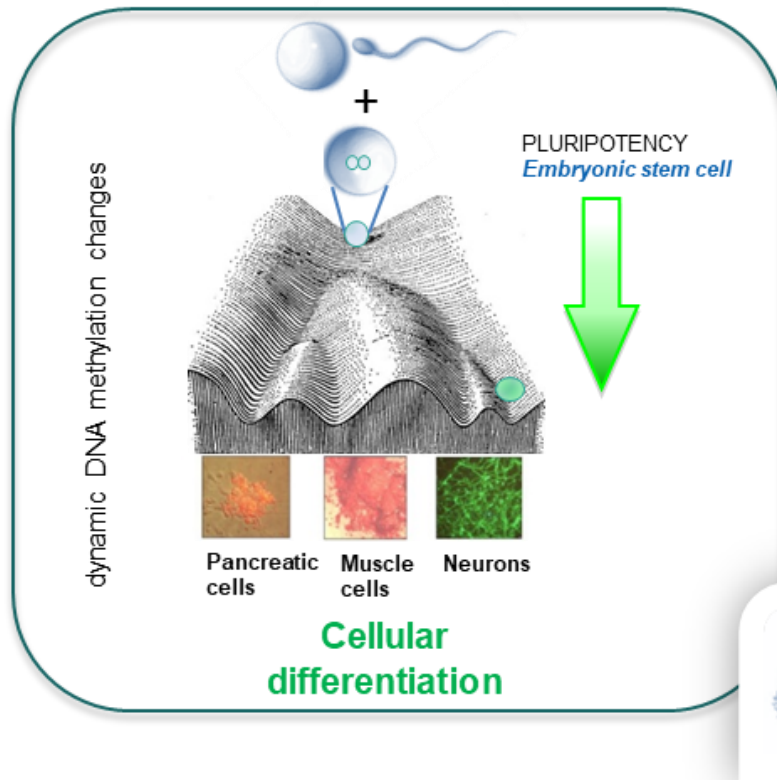
Facteurs épigénétiques: « sur » la génétique



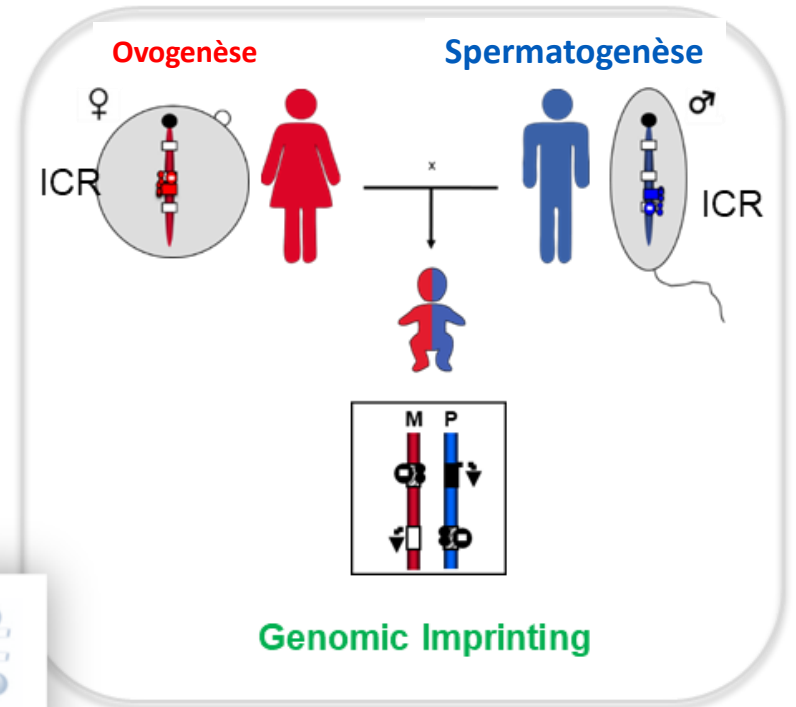
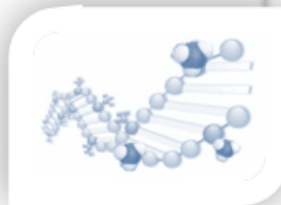
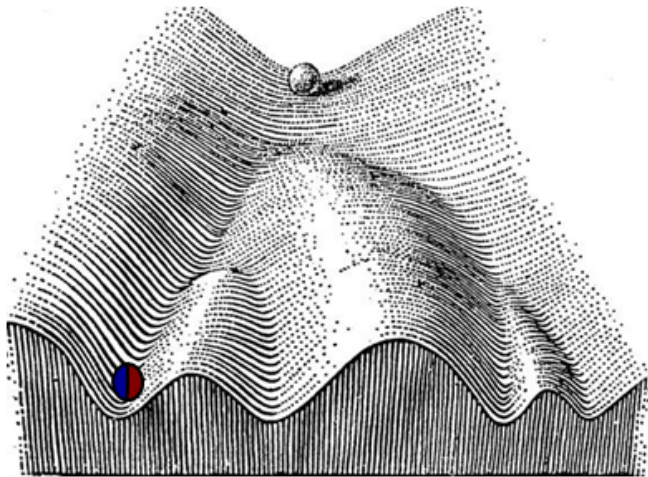


Facteurs épigénétiques: « sur » la génétique





Déterminent la différenciation cellulaire et l'établissement de l'expression des gènes tissu-spécifique



EMPREINTE PARENTALE

Traitement différentiel de séquences identiques dans un même noyau (**expression mono-allélique**)

Gènes soumis à empreinte

Placenta

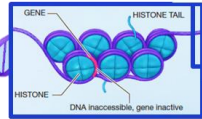
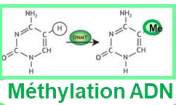
Développement

*Croissance

*Neurologie

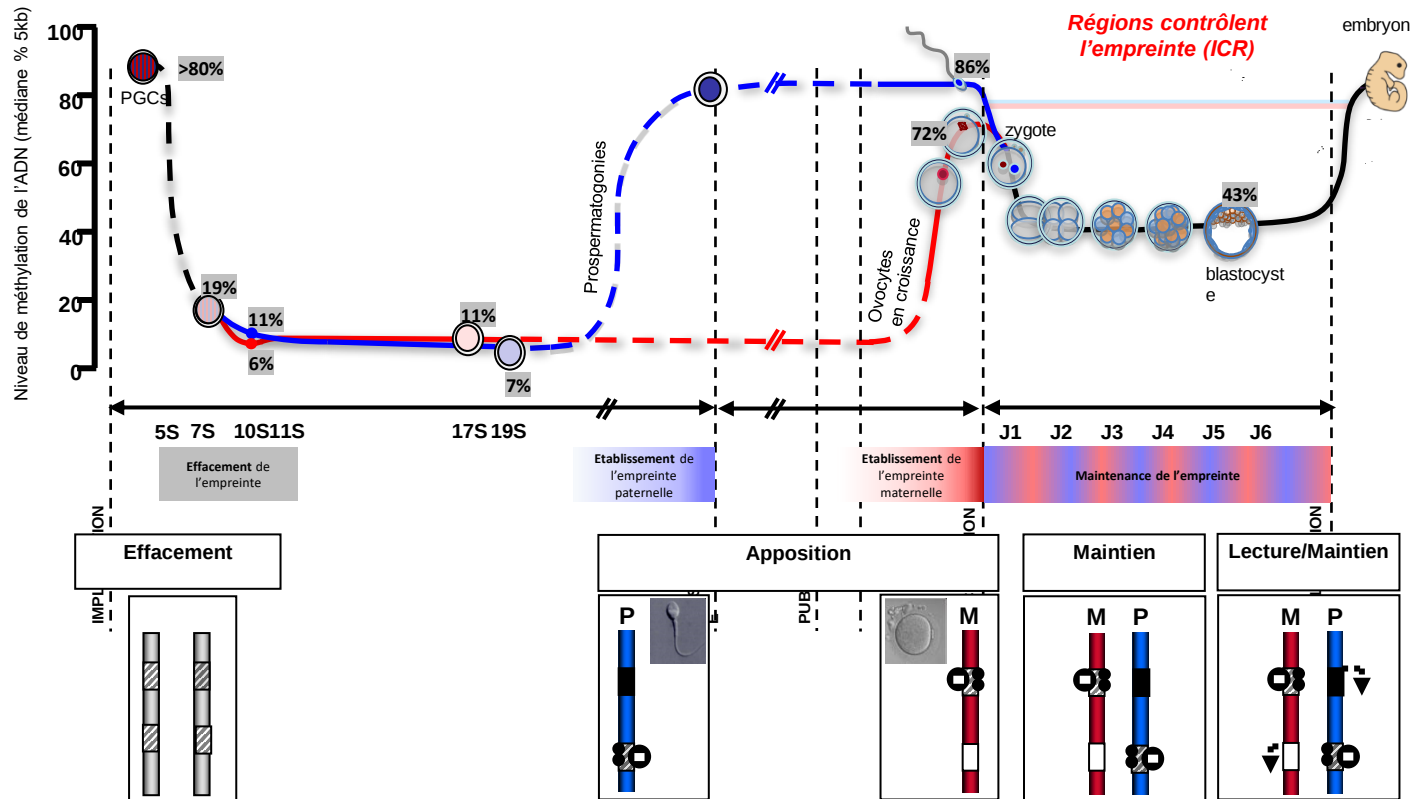


Viabilité



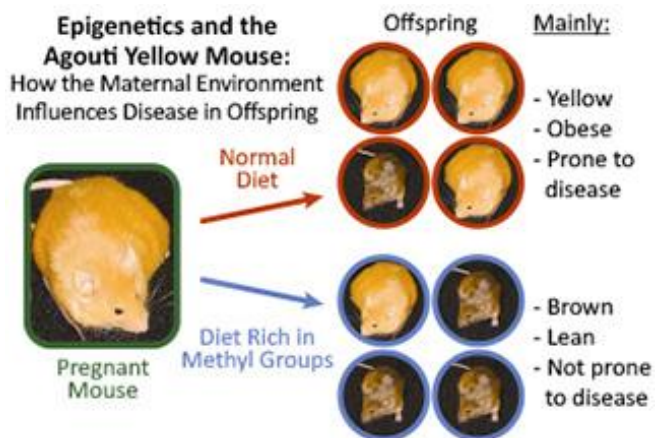
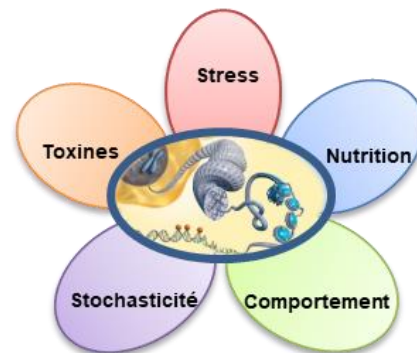
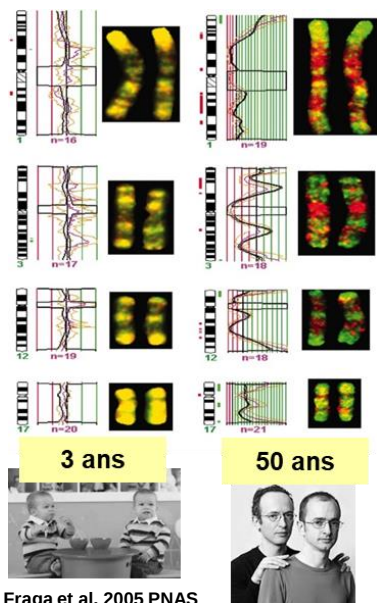
ADN inaccessible
Gène inactif

Changements épigénétiques: reprogrammation chez l'Homme

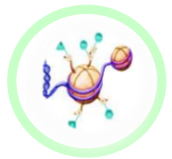




Facteurs épigénétiques sensibles à l'environnement

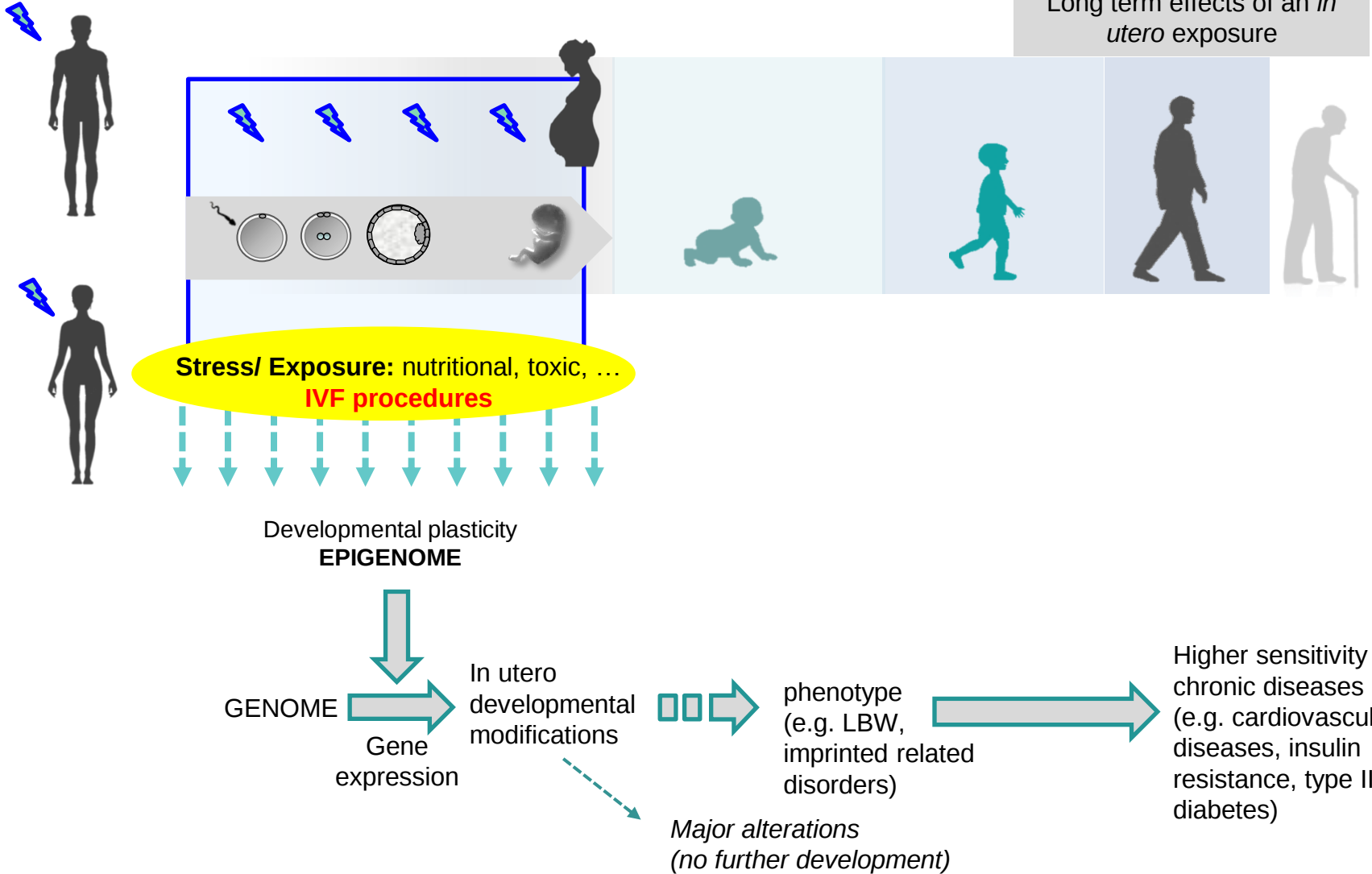


pas seulement nos gènes qui déterminent notre santé, mais aussi notre environnement et notre alimentation



Barker's hypothesis

Developmental Origins of Health and Disease





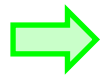
Risque épigénétique associé à l'AMP?

- **Pathologies liées à l'empreinte**

Vermeiden and Bernardus, FS 2013

- **Beckwith-Wiedmann (BWS)**

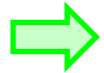
≈1/13.700



RR=5.2
(95%CI 1.6-7.4)
(8 études)

Chromosome 11

- uniparental disomy (UPD) of *H19* (20%)
- hypomethylation of *LIT1* (50%)
- hypermethylation of *H19* (5%)
- micro-deletions, translocation, inversion, duplications (each <1%)
- In 20% of cases the cause is unknown

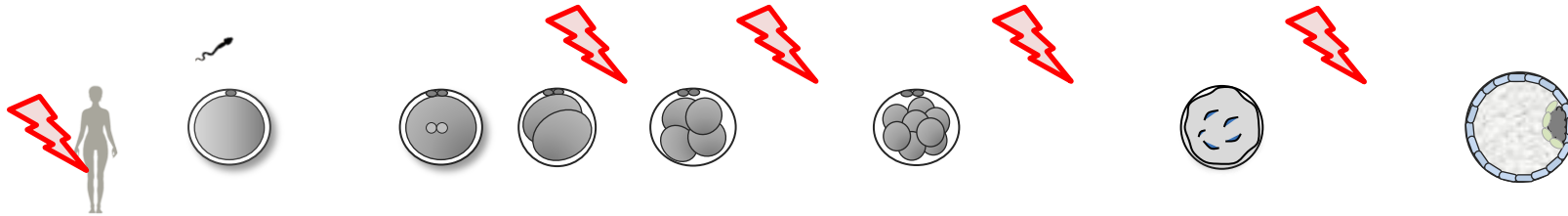


- **100% des cas conçus par AMP liés à une perte de méthylation**

Doornbos et al. 2007; Halliday et al. 2004; Hiura et al. 2006; Lidegaard et al. 2005; Gicquel et al. 2003; Bowdin et al. 2007; Sutcliffe et al. 2006; DeBaun et al. 2003; Maher et al. 2003; Källén et al. 2005



Stress au cours du développement *in vitro*

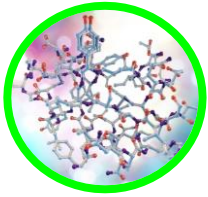
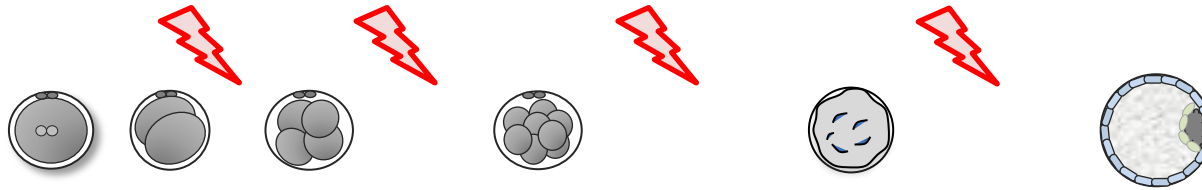
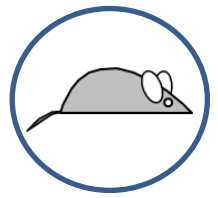


ARN/protéines maternelles

- Blastomètes totipotents
 - Expression des gènes *de novo*
 - **Démethylation** ADN de régions non-empreintées
 - Faible métabolisme, pyruvate
-
- Etablissement de la pluripotence
 - Spécification lignage
 - Formation du blastocèle
 - **Reméthylation** ADN graduelle lignage-spécifique
 - Augmentation métabolisme, glucose



Stress au cours du développement in vitro



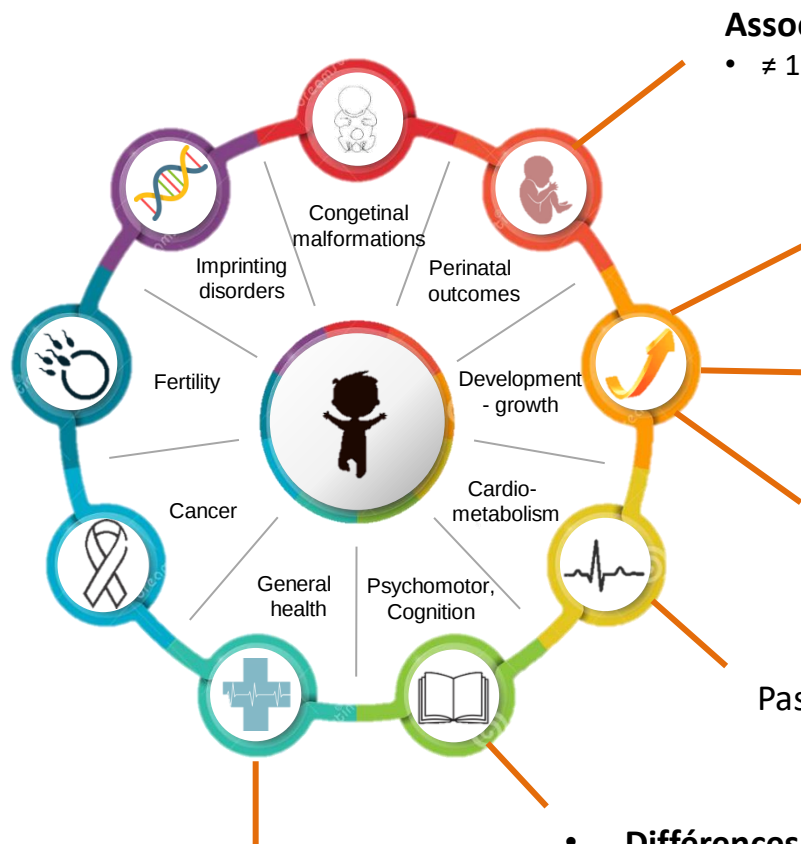
- Des systèmes de culture sous-optimaux peuvent affecter l'expression des gènes et l'empreinte génomique ¹

- En fonction de la composition du milieu de culture²



¹ Doherty et al, 2000, Fauque et al. 2007, Rinaudo et al. 2004, Wright et al. 2011, Mann et al. 2004

² Fauque et al. 2010, Market-Velker et al. 2010, Schwarzer et al. 2012, Mantikou et al. 2016, Feuer et al. 2017, Ramos-Ibeas et al 2019, Carmignac et al. 2020



Association avec le poids de naissance ¹
• ≠ 181g to 370g

Impact sur le développement fetal ²
• PC et diamètre bipariétal

Impact sur le développement du petit enfant³
• Poids jusqu'à 24 mois

Impact sur le développement de l'enfant⁴
• Différences de l'adiposité tronculaire et du tour de taille

Pas de diff. cardiovasculaire et développement métabolique⁴

Pas de diff. état de santé general à 5 ans⁵

- **Différences sur le profil développemental à 5 ans⁵**
- Performances scolaires comparables à 9 ans⁶

¹ Dumoulin et al. 2010; Nelissen et al. 2012; Hassani et al. 2013; Carrasco et al. 2013; Kleijkers et al. 2016

² Nelissen et al., 2013

³ Kleijkers et al., 2014

⁴ Zandstra et al., HR 2018

⁵ Bouillon et al., 2016

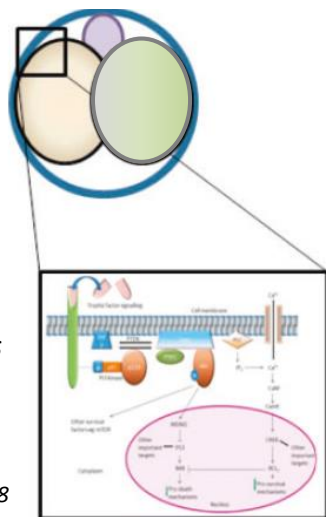
⁶ Zandstra et al., HRopen 2018



Environnement *in vivo* (stress -)

*CREB et STAT3/BIRC5
pourraient être impliqués
dans la régulation de
l'établissement de cette
programmation.*

Vassena et al. 2005; Hu et al. 2008



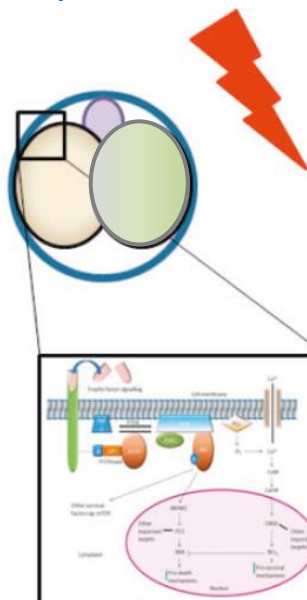
Possède machinerie
correcte pour AGE et
dev. embryonnaire



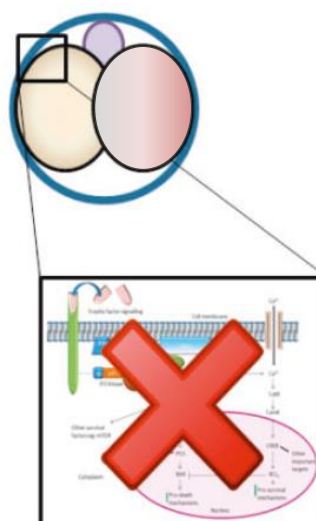
Environnement *in vitro* (stress +)

Ovocyte de
bonne qualité

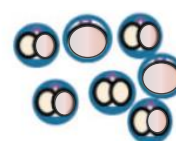
Ovocyte de
faible qualité



Possède machinerie
correcte pour AGE et peut
activer la machinerie sous
stress *in vitro*



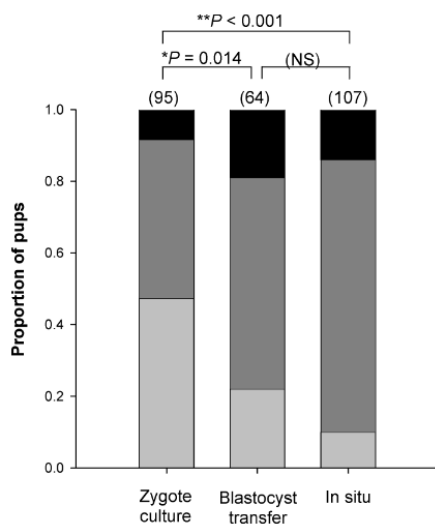
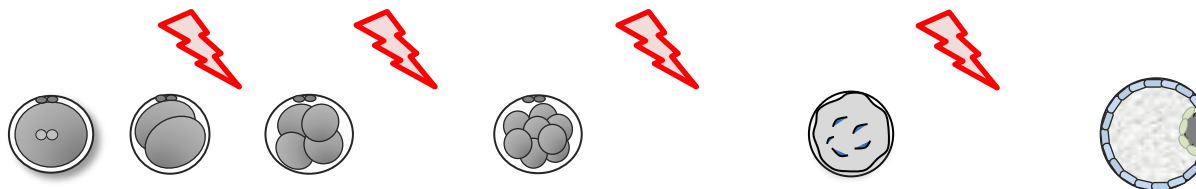
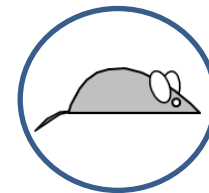
Ne possède pas
machinerie correcte pour
AGE et pour répondre au
stress *in vitro*



Modifications en réponse au stress pourraient impacter la
croissance et la santé à l'âge adulte



Stress au cours du développement in vitro

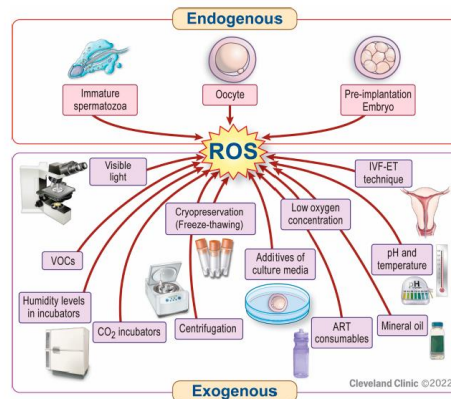


Dans le modèle murin Agouti, la couleur du pelage est déterminée par le statut de méthylation de l'allèle A^Y .

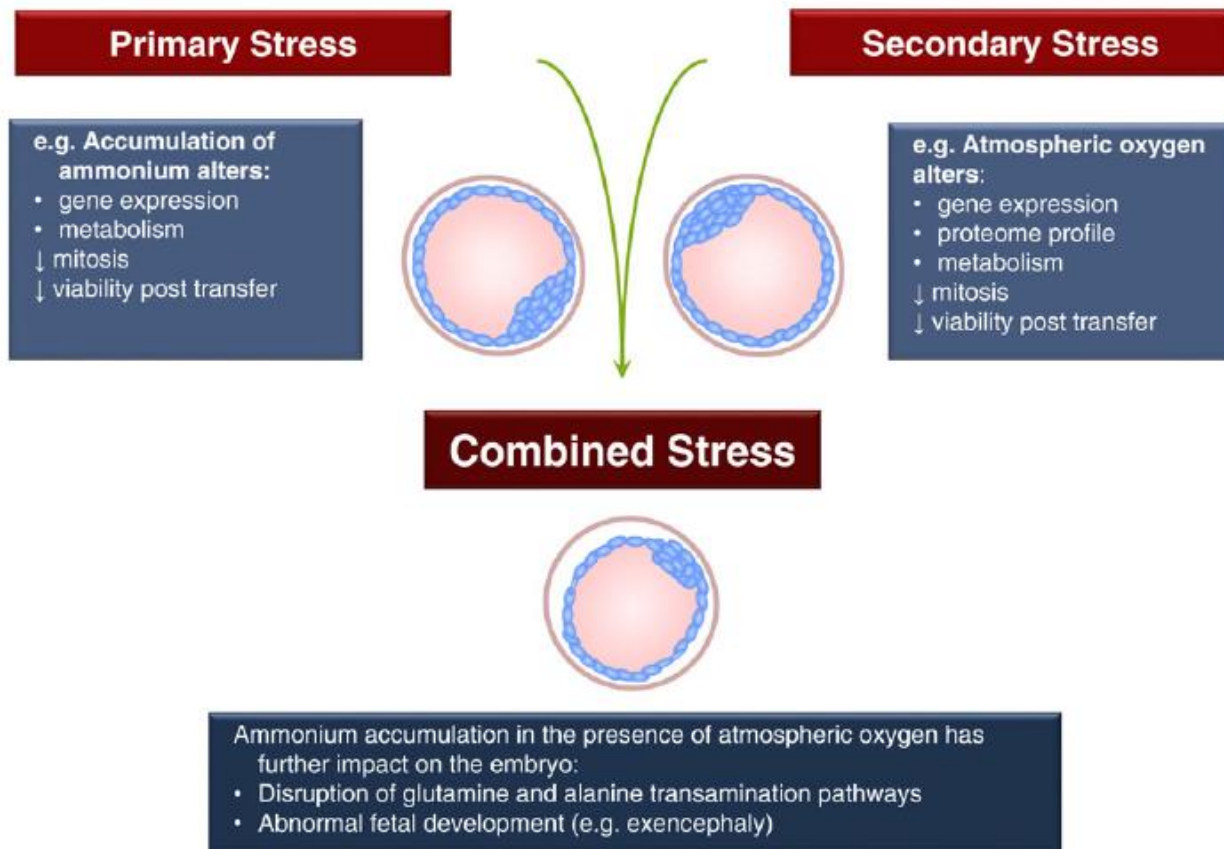
- % petits exprimant l'allèle actif (hypométhylé) et le pelage jaune > après culture par rapport aux embryons transférés sans culture et exprimant l'allèle actif (hypométhylés) et au pelage brun

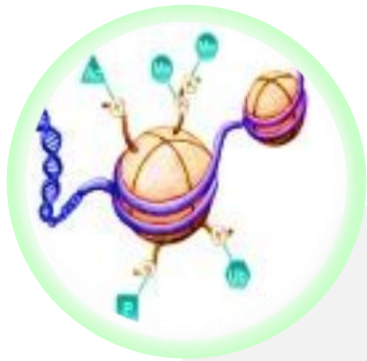
Morgan et al. et al. 2008

=> Ces résultats démontrent que **l'environnement au cours du développement de l'embryon préimplantatoire** peut affecter l'expression postnatale d'un allèle épigénétiquement sensible



Interaction between stress=> combined stress





**Quelles Actions?
Qualité
Au Laboratoire**

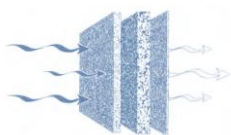




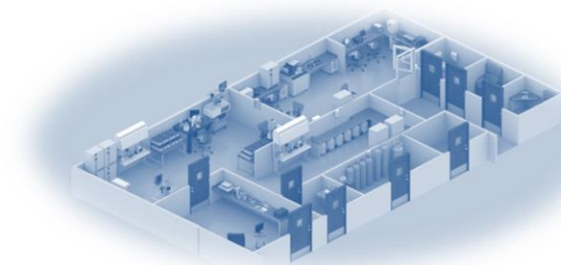
Qualité de l'Air



Lab design



CODA
(charbon actif – permanganate)



➔ **Utiliser une filtration adéquate**

=> *Target: ISO 7 easily achieved if HEPA filters are installed with sufficient ACH (10–15/h)*

➔ **Dégazer les articles en plastique** *si besoin*

➔ **Segmentation des salles** (salles de stockage, bureaux et salle diagnostic)

➔ **Pression positive**

➔ **Utiliser des peintures sans VOC**

Éviter les meubles vernis ou peints

➔ **Limiter la distance!**



Sciorio et al, 2021

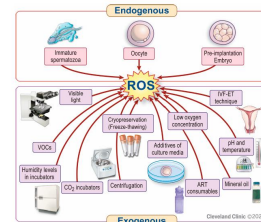
Cairo consensus 2018 Mortimer et al RBMO

ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories (2015)

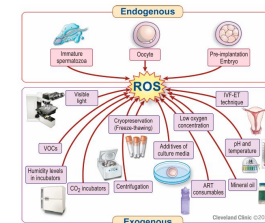


Concentration en Oxygène :

- Réduire à <10%
- Antioxydants dans le milieu



- ➔ **La taille des bouteilles et des autres emballages** doit être appropriée pour minimiser les ouvertures et le temps entre la première et la dernière utilisation.
- ➔ **Marquage CE.**
- ➔ **Veiller à :**
 - l'âge du lot! (date de fabrication)
 - aux conditions de stockage
 - à la préparation des boîtes (rapidement, sans plaque chauffante)
 - à l'étape de pré-incubation

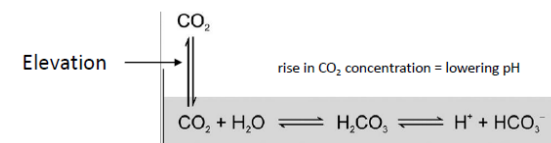


Nombre & type d'incubateurs:

- Effets sur stabilité du pH and T°

pH dependent

- $[\text{HCO}_3]$ in the medium
- $[\text{CO}_2]$ in the incubator



=> les milieux tamponnés (HEPES, MOPS ou similaires) doivent être maintenus à l'air ambiant, **tandis que les milieux tamponnés au bicarbonate doivent être maintenus à 5-7% de CO_2 .**

Le **nb d'incubateur** est critique et doit être basé sur:

- le nombre de cycles
- la durée de la culture embryonnaire

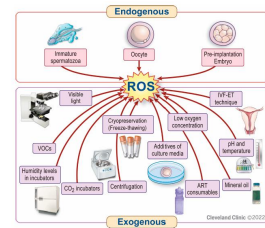
=> Réflexion sur la **répartition des gamètes et embryons** dans les incubateurs afin de **minimiser les ouvertures de porte.**



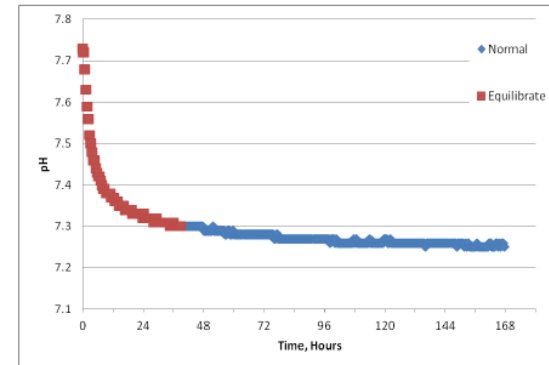


Nombre & type d'incubateurs:

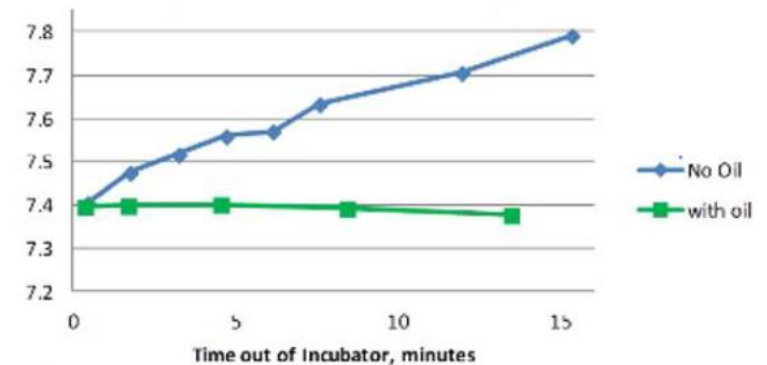
- Effets sur stabilité du pH and T°



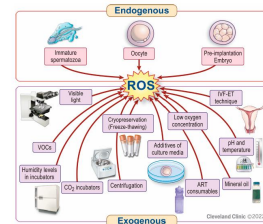
- Pre-incubation: minimum 4h



- Rapide augmentation du pH à l'air ambiant
 - Utiliser milieux avec HEPES /MOPS



- Huile limite/protège contre les variations de pH



Nombre & type d'incubateurs:

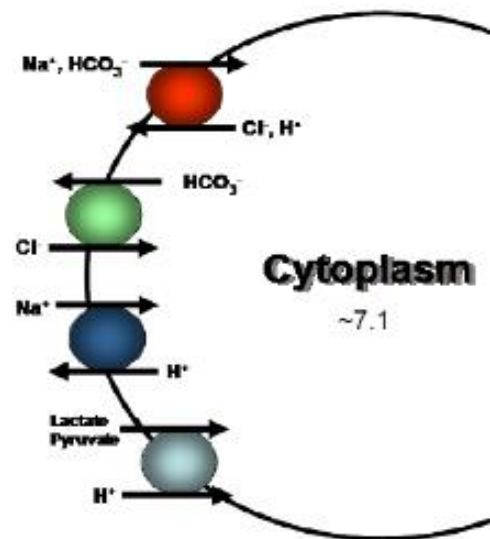
- Effets sur stabilité du pH and T°



pH

- Mécanismes intracellulaires pour réguler le pH dans l'ovocyte

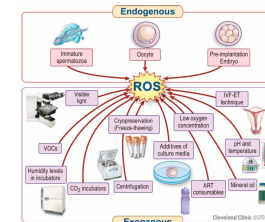
Ovocyte dénudé < CCO < embryon clivé < embryon compacté



Swain et al. RBM 2010



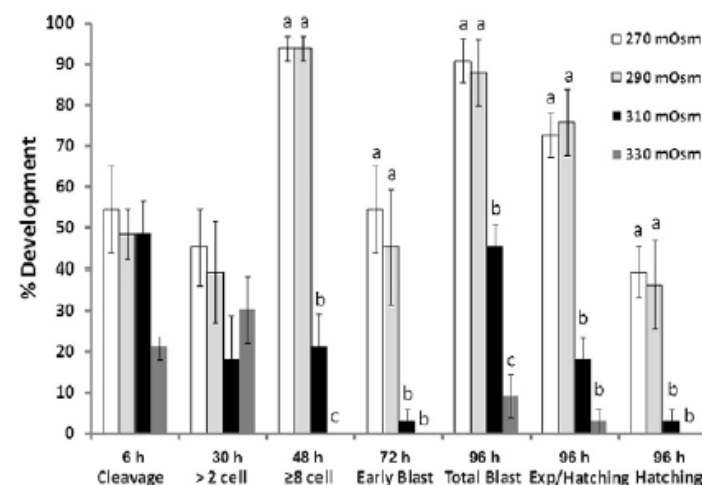
les **ovocytes dénudés** étant **plus vulnérables** aux **variations de pH**, le moment de la dénudation doit être rapproché de celui de l'injection



Nombre & type d'incubateurs:

- Effets sur stabilité du pH and T°
- Il est crucial de maintenir la T° mais risque d'évaporation => **osmolarité** augmente => impact sur le developement

Osmolarity target for human embryos = 255-295mOsm/kg



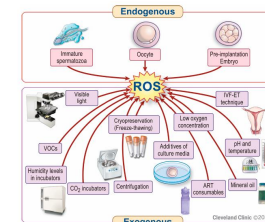
Swain et al. 2012

➡ Recouvrir d'huile + quick manipulation



Lumière:

- Minimiser l'exposition



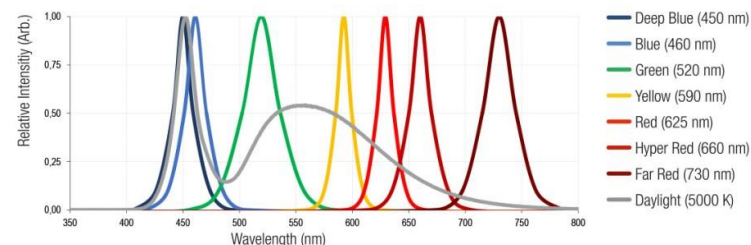
Etudes chez l'animal: effets directs et indirects (**photo-oxydation des composés dans le milieu et l'huile**) sur le développement embryonnaire (Oh 2007, Li 2014)

- Stades pré-compaction plus sensibles à la lumière que post-compaction

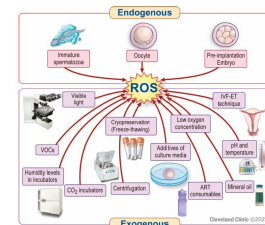


Recommandé: **lumière jaune**

400-500 nm (~~lumière bleue~~) plus délétère sur stress oxydatif que lumière avec longueur d'onde plus élevée



TLI: utilise 625-636nm (LED rouge) avec de très courtes expositions (Chen 2013)

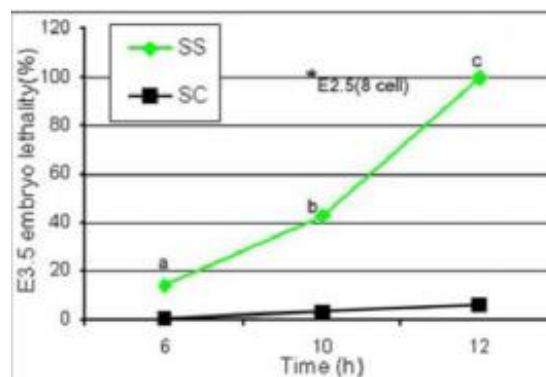
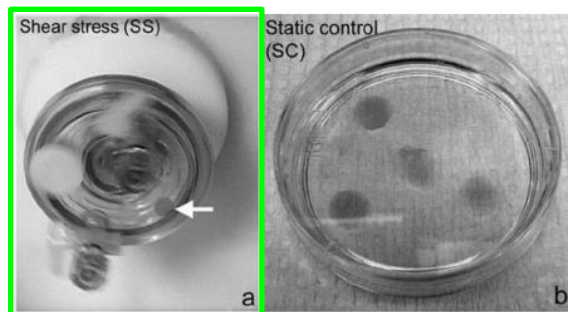


Pipetage:

- Minimiser le nombre de manipulations
- Pipetages doux

Modèle murin:

=> Shear Stress induces arrest of embryo development (Xie Y, 2006, 2007)



➡ Manipulations doivent être réduites et se faire avec un maximum de douceur. il convient

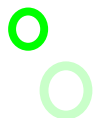
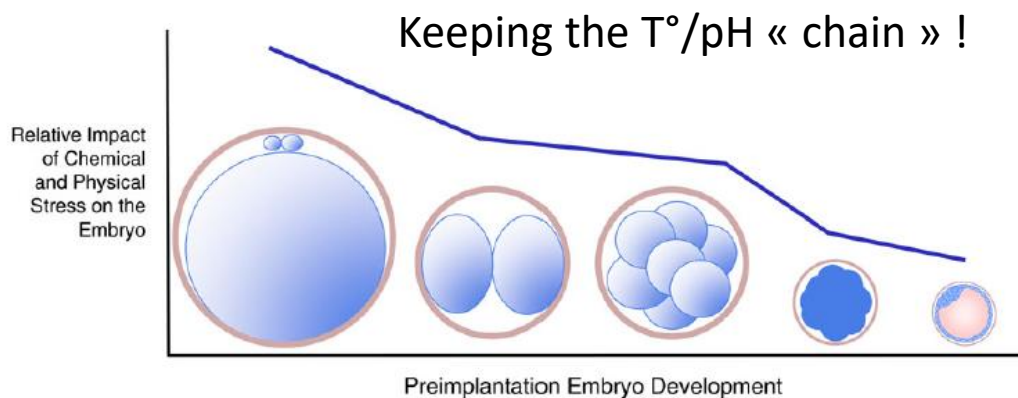
- d'utiliser des pipettes dont la lumière est de taille appropriée
- éviter les pipetages vigoureux



- ✓ Capacités d'adaptation de l'embryon mais il est très probable qu'il n'y ait pas d'adaptation d'un embryon à son environnement qui ne soit pas sans conséquence



- ✓ Nous devons concentrer nos efforts sur les stades précoces particulièrement sensibles



Work towards continuous improvement of quality...



Comment optimiser l'environnement *in vitro* des gamètes et embryon?



Complexe!!!

mais
La différence se fait
dans les petits détails

Merci de votre attention

