

EO Médecine de précision et thérapie ciblée

**From bench to bedside:
comprendre le développement
embryonnaire pré-implantatoire pour
améliorer les résultats de l'AMP**

**Dr Sophie Loubersac, Alexandre Bruneau
CRTI, INSERM UMR1064**

Service de médecine de la reproduction, CHU de Nantes



Disclosure / statements

FINOX FORWARD Grant Initiative supports the project

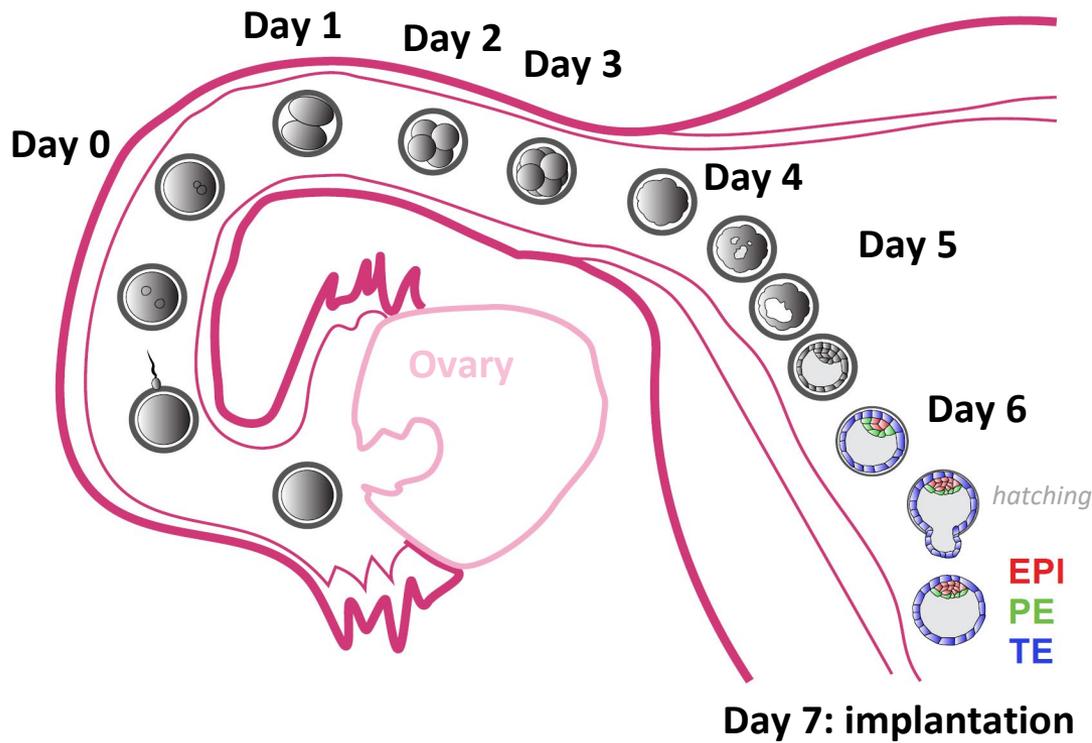
Human Embryos are used accordingly to ISSCR guidelines and French ethical oversight committee (Agence de la Biomedicine):

- **No payments**
- **Consent from both parents**
- **Approval numbers: RE17-007, RE18-010 and RE20-009**

Treasurer FSSCR

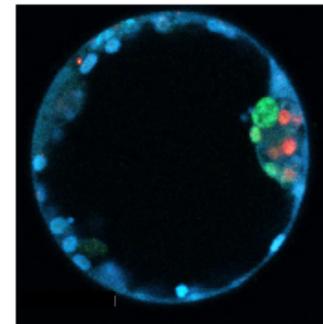


Understanding and quantifying human preimplantation development in order to predict its outcome



Developmental biology

🔍 Lineage specification



GATA2
KLF17
SOX17

Clinical Research

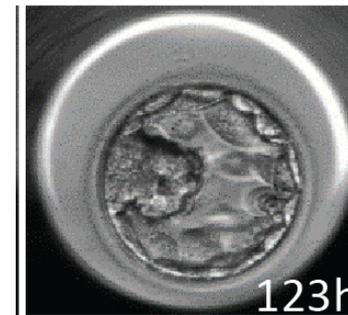
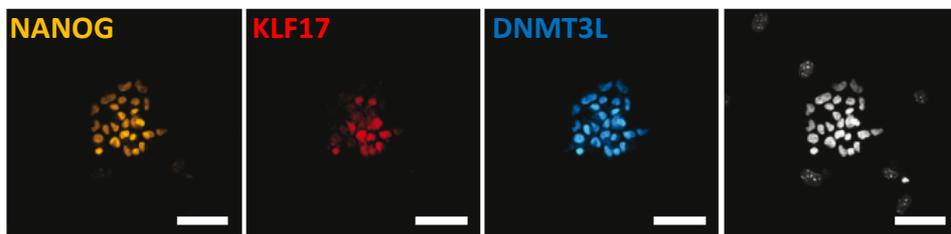
IVF success rate ~20-30%

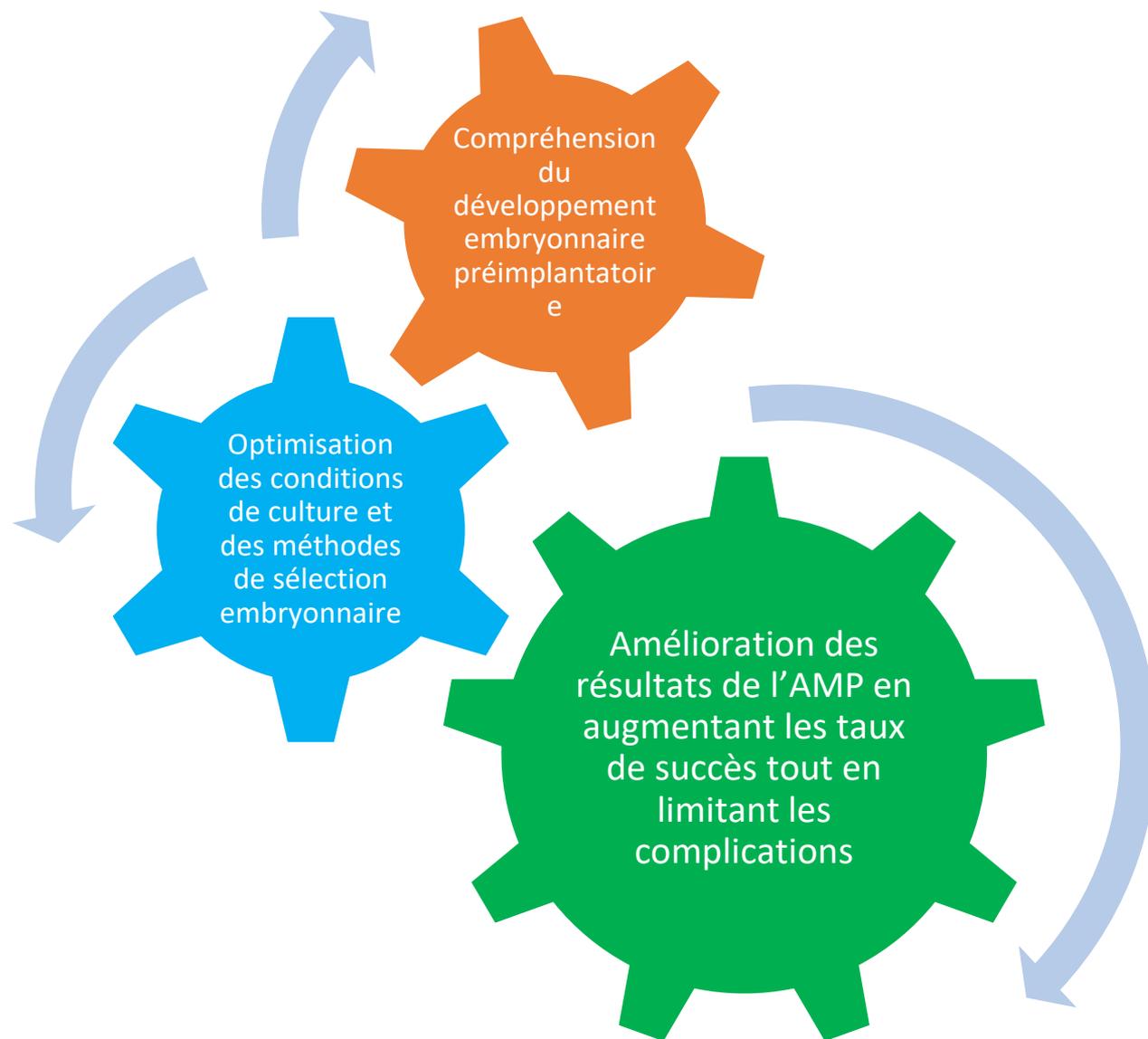
→ Markers for embryo selection

→ Media formulation

Stem cell biology

🔍 Cellular models





Organigramme



CRTI

Dr J. Jullien (PhD)
Dr L. David (PhD, HDR)
Pr T. Freour (MD, PhD, HDR)

C. Chariou (AI)
D. Coulais (IE)
A. Gaignerie (IE)
I. Leray (AI)

Pr P. Barriere (MD, PhD, HDR)
J. Lammers (IH)
S. Loubersac (MD)
A. Reignier MD

G. Castel (MSc)
C. Onfray (MSc)

Stem Cells

D. Meistermann (MSc)
V. Francois - - Champion (MSc)
S. Chevolleau (M2)

Bioinformatics

A. Bruneau (MSc)
F. Berger (MSc)

Dev. Biology

M. Feyeux (IE)



Introduction (1)

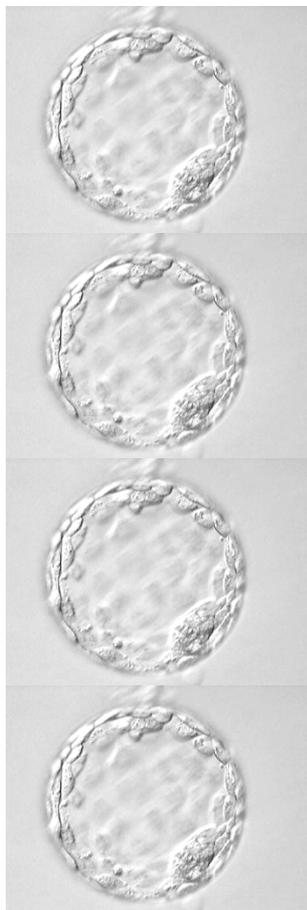
- Infertilité = maladie touchant environ 15% des couples en âge de procréer
- Etiologies multiples : masculines, féminines, mixtes, idiopathiques
- Recours à l'Assistance Médicale à la Procréation (AMP), notamment la fécondation in vitro (FIV):
 - Optimiser la rencontre entre les gamètes et le développement embryonnaire
 - Augmenter les chances de succès en multipliant
- Début de la FIV = années 80
- Depuis activité d'AMP en augmentation constante dans le monde
 - 3% des naissances en France

Introduction (2)

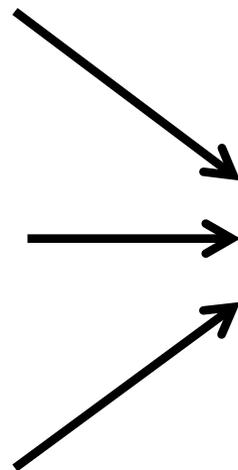
- Succès modéré de la FIV dans l'espèce humaine: 20-30% de naissance par tentative en moyenne
- Raisons principales:
 - Aneuploïdie fréquente des gamètes / embryons
 - Conditions de culture embryonnaires suboptimales : milieux synthétiques, atmosphère etc...
 - Développement embryonnaire préimplantatoire humain mal connu
 - Absence de méthode fiable d'évaluation de la qualité embryonnaire

But clinique

FIV : ~ 3% nouveaux nés
Taux de succès ~ 27%



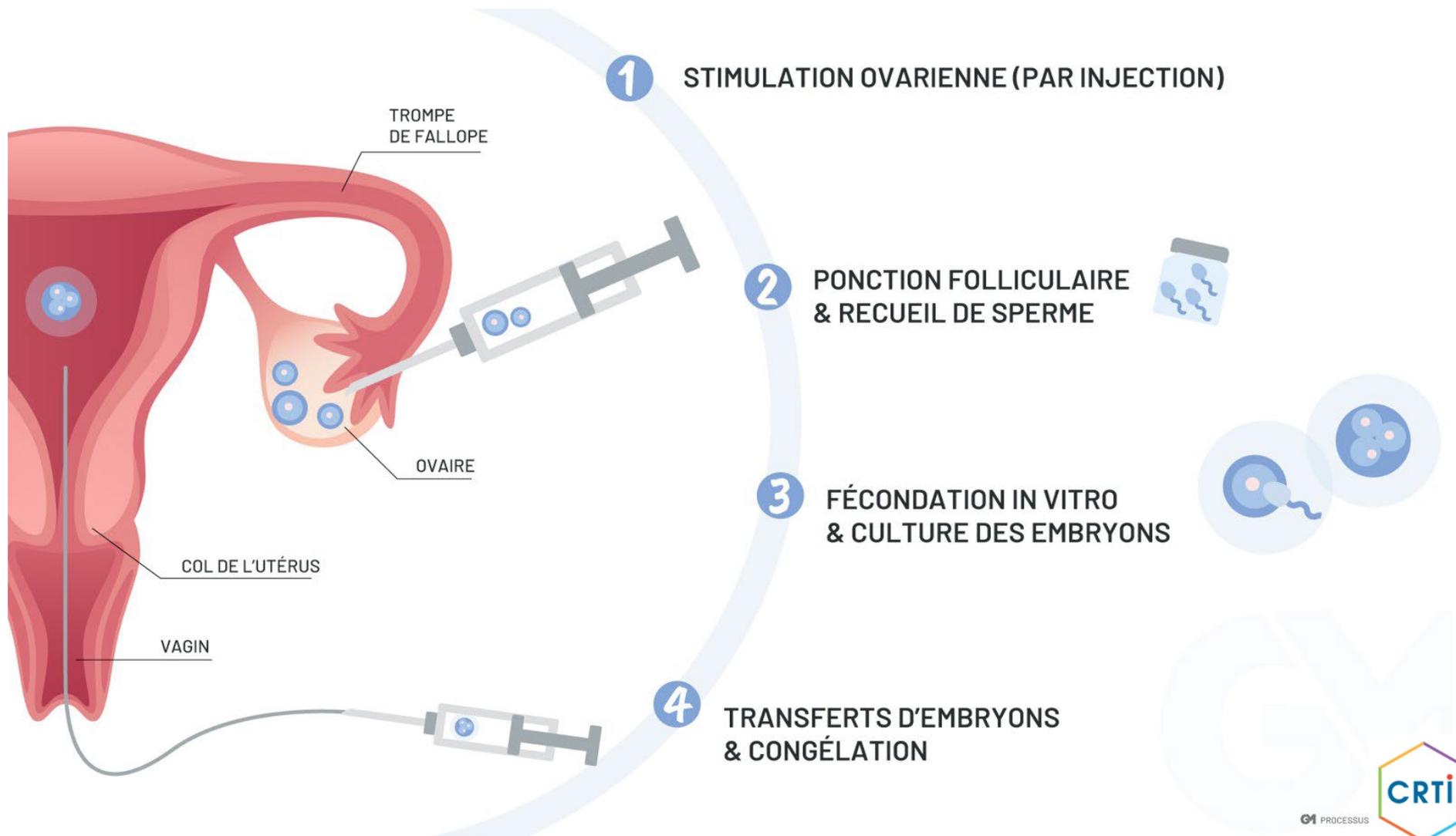
Simple
transfert

A black arrow pointing from the embryos image to the newborn image.

Vitrification



Aspects biologiques de l'AMP chez l'Homme



Introduction (3)

- Limites de l'AMP:
 - Coût: direct et indirect
 - Poids émotionnel et psychologique des échecs
 - Transfert fréquent de plusieurs embryons pour augmenter les chances de succès aboutissant à un taux élevé de grossesse multiple (15-30% selon les pays)
- Stratégies en cours de développement:
 - Transfert au stade blastocyste
 - Transfert embryon unique

Objectifs du projet de recherche translationnelle

- Objectif final: Améliorer les résultats en AMP chez l'Homme
- Etapes:
 - Améliorer les connaissances sur le développement embryonnaire pré-implantatoire, étude de l'établissement et de la régulation de la pluripotence, et du trophoblaste
 - Établissement de référentiels pour évaluer la qualité du développement embryonnaire pré-implantatoire
 - Applications en AMP chez l'Homme



Les gamètes

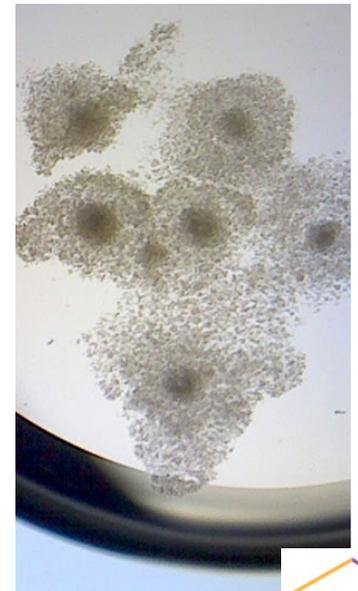
• Spermatozoïdes

- Cellules hyperspécialisées, généralement très nombreuses
- Population très hétérogène
- Mécanismes de sélection naturelle non connus
- Principales méthodes d'évaluation de la qualité spermatique:
 - Morphologie: non validée
 - Fragmentation / condensation ADN : invasives, non validées



• Ovocytes

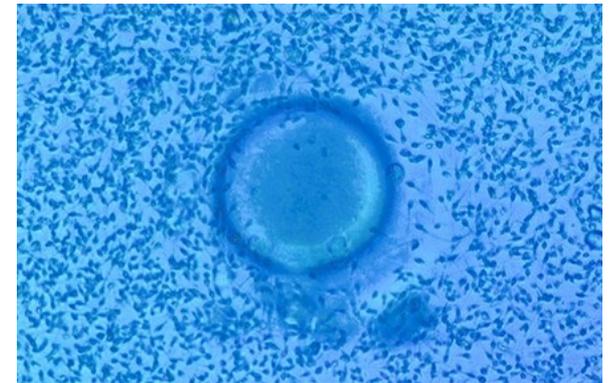
- Cellules rares et fragiles
- Nécessaire maturation nucléaire et cytoplasmique
- Principales méthodes d'évaluation de la qualité ovocytaire:
 - Morphologie: non validée
 - Invasive: impossible
 - Propriétés mécaniques



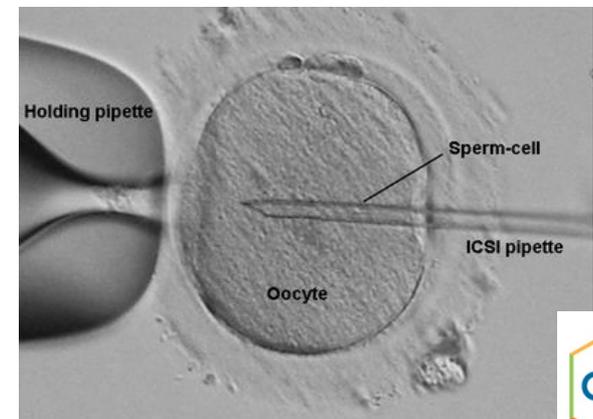
Aspects biologiques de l'AMP chez l'Homme

Choix de la stratégie de mise en fécondation en fonction de la quantité de spermatozoïdes mobiles récupérée et des antécédents

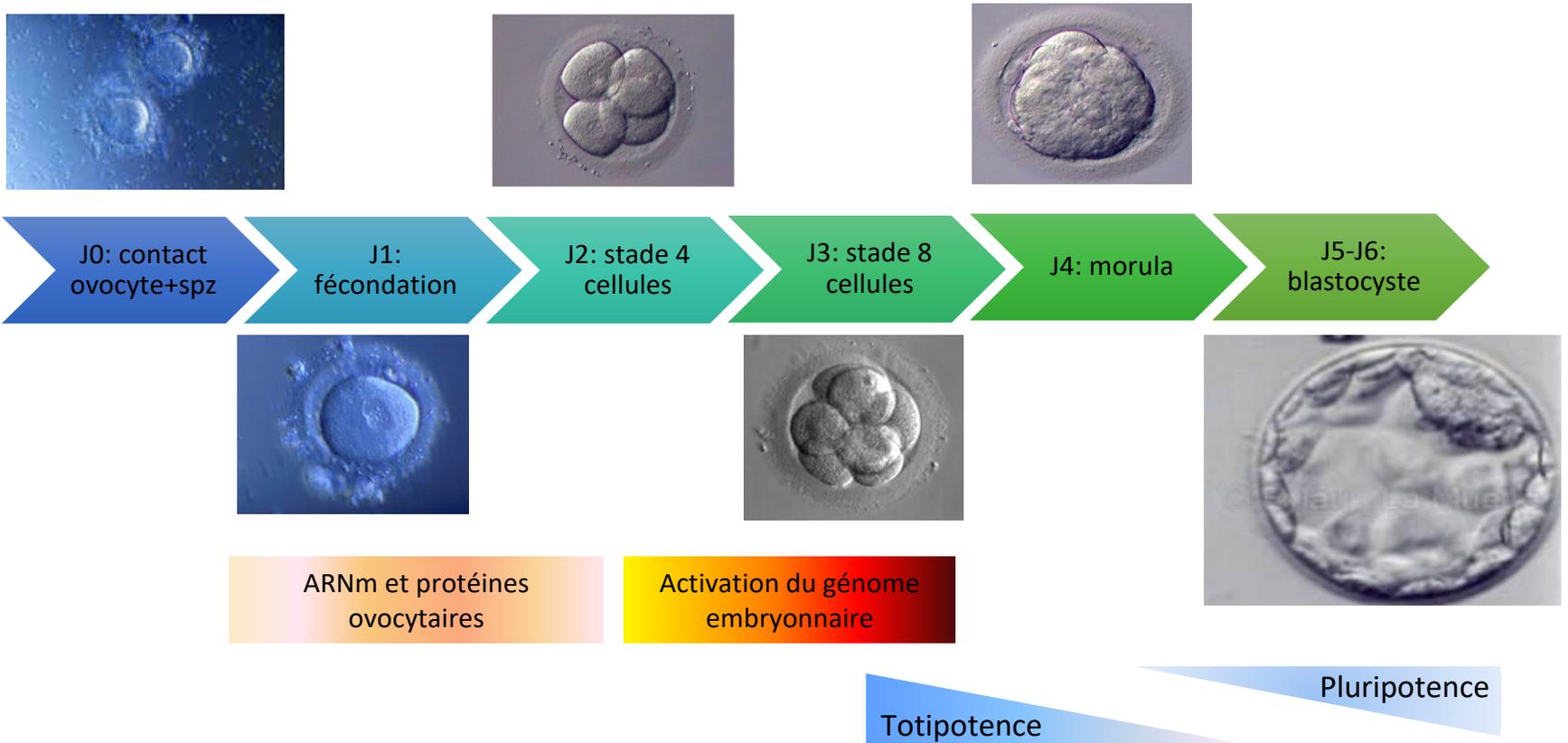
- Sperme normal  FIV classique



- Sperme anormal  ICSI
- OU
- antécédents d'échec de fécondation en FIVc



Le développement embryonnaire



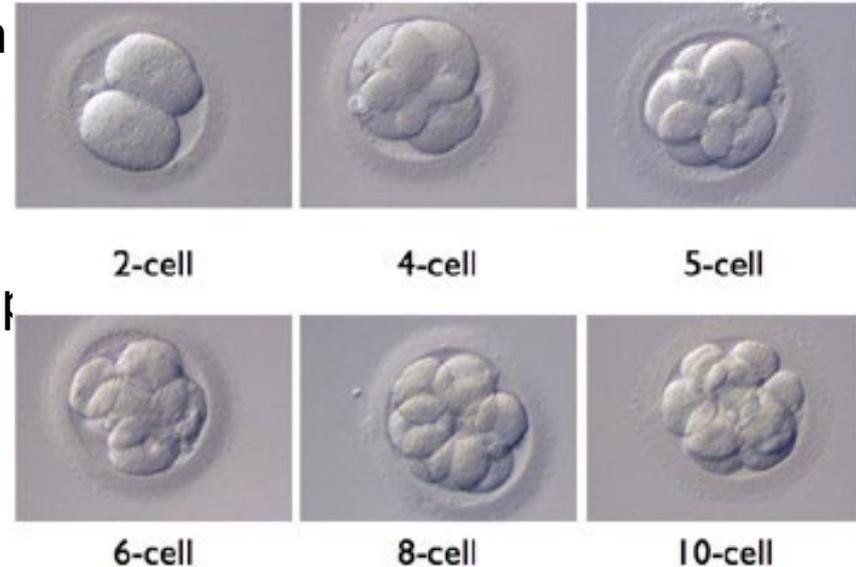
Culture embryonnaire

- Milieux:
 - Synthétiques
 - Développés initialement chez l'animal
 - Composition précise non connue
 - 2 catégories:
 - Milieu séquentiel avec changement de composition à J3 : composition évolutive proche de la physiologie
 - Milieu unique sans changement : composition riche contenant tous les éléments nutritifs nécessaires quel que soit le stade embryonnaire
- Température: 37°C
- Atmosphère: 6% CO₂ obligatoire, 5% O₂ optionnel pour développement précoce, recommandé pour développement tardif



L'évaluation morphologique de la qualité embryonnaire

- Évaluation de 3 paramètres principaux
 - Nombre de cellules
 - Régularité des cellules
 - Présence de fragments
- Évaluation quotidienne au microscope (1/jour)
- Avantages:
 - Rapide, facile, peu coûteux
 - Existence de référentiels, consensus
- Inconvénients:
 - Subjectif
 - Perte de performance avec l'âge féminin
 - Impose l'exposition des embryons à des conditions de culture non optimales
 - Pouvoir prédictif limité



Principales questions posées ?

- Limites des méthodes d'évaluation de la qualité

- Gamétique
- embryonnaire

- Besoin d'optimisation des Conditions de culture embryonnaire

Besoin de readouts et de marqueurs

Stratégies d'identification de marqueurs de qualité embryonnaire

- Qualités de la méthode d'évaluation de la qualité embryonnaire idéale ?

Stratégies d'identification de marqueurs de qualité embryonnaire

- Qualités de la méthode d'évaluation de la qualité embryonnaire idéale
 - *Rapide*
 - *Peu coûteuse*
 - *Non invasive*
 - *Objective*
 - *Sensible*
 - *Spécifique*
 - *Performante dans tous les laboratoires et chez tous les couples infertiles*
 - *Validée par des études de haut niveau*

Stratégies actuelles d'identification de biomarqueurs de qualité embryonnaire

- **Méthodes invasives:** Preimplantation Genetic Screening
 - Évaluation de l'euploïdie embryonnaire
- **Méthodes non-invasives:** basées sur l'évaluation:
 - Du développement cellulaire : *Morpho+Cinétique*
 - Du métabolisme embryonnaire : *métabolomique / sécrétomique*

PGS (Preimplantation Genetic Screening)

Contexte: la majorité des embryons conçus in vitro sont aneuploïdes

Concept: déterminer le statut d'euploïdie de l'embryon

Prérequis: prélèvement cellulaire sur l'embryon in vitro



Avantage principal:

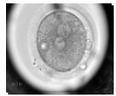
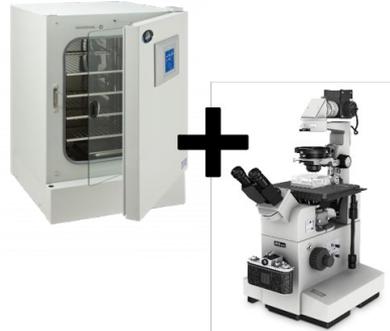
- Gain de temps: éviter les transferts et congélations embryonnaires inutiles

Limites:

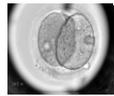
- Coût
- Pas forcément de gain en termes de taux de naissance cumulé
- Méthode invasive
- Question des embryons mosaïques
- Réglementaires dans certains pays (France)

Méthodes non invasives: time-lapse

Principe: Remplacer l'évaluation morphologique ponctuelle par un suivi continu du développement embryonnaire, sans modification des conditions de culture

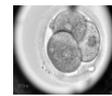


17 Hrs

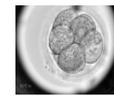


27 Hrs

4 Observations

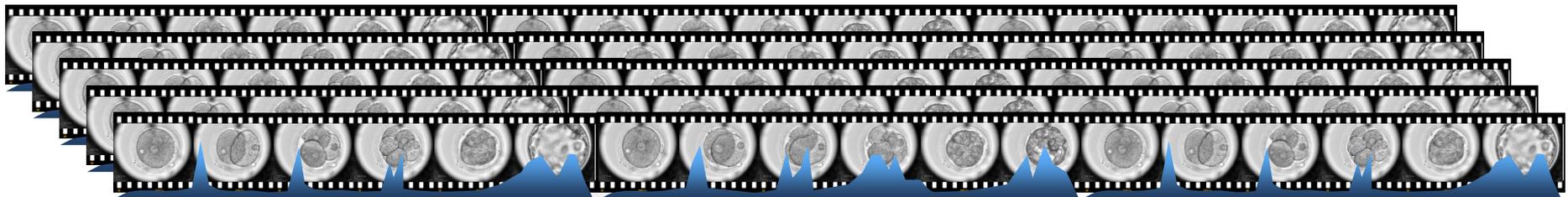


44 Hrs



70 Hrs

>3000 Images en 6 jours



Time lapse

- Concept: observation et enregistrement de tous les évènements cellulaires sans perturbation des conditions de culture
- Avantages:
 - Exhaustivité du suivi embryonnaire avec enregistrement horaire
 - Observation d'évènements anormaux
 - Stabilité des conditions de culture
- Limites:
 - Coût
 - Pas de critère prédictif universel, « effet centre »
 - Temps nécessaire à l'enregistrement manuel des évènements cellulaires

Time lapse

- Questions posées:

- Validité des critères publiés
- Subjectivité et durée de l'enregistrement des données
- Optimisation de la performance
- Readouts ?

- Approches expérimentales:

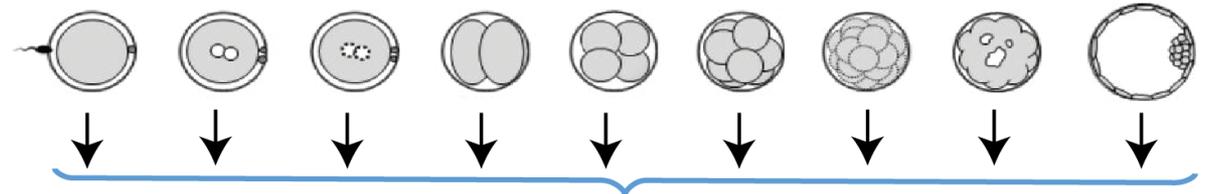
- Études de validation externe
- Automatisation de l'acquisition des données
- Association avec la métabolomique
- Données de transcriptome

Comment trouver des critères prédictifs ?

Donnée préliminaire



Statistique centre dépendant
=> **non satisfaisant**



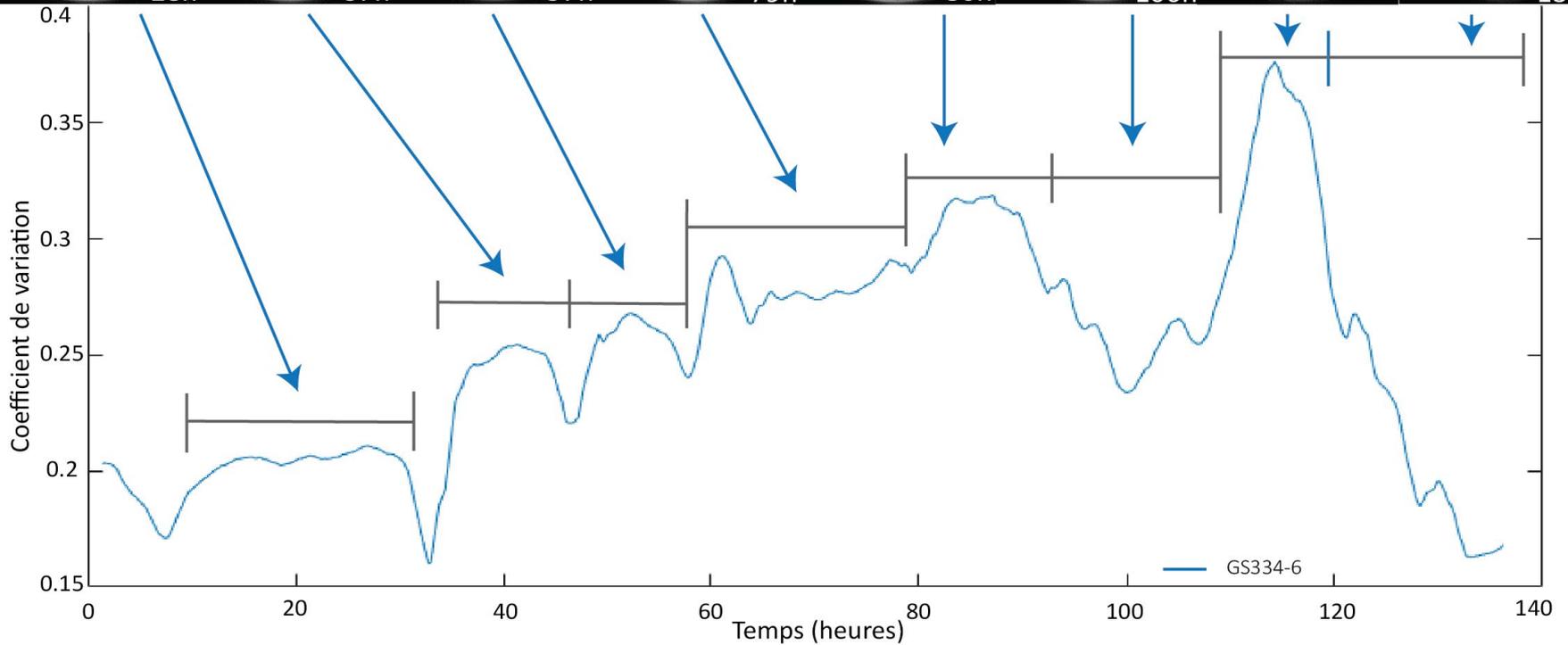
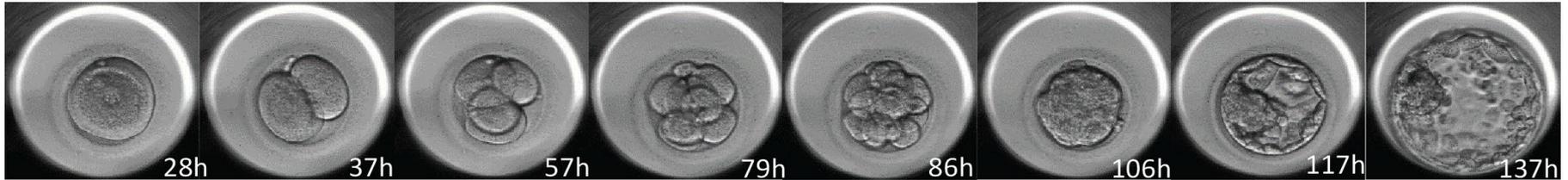
Projet



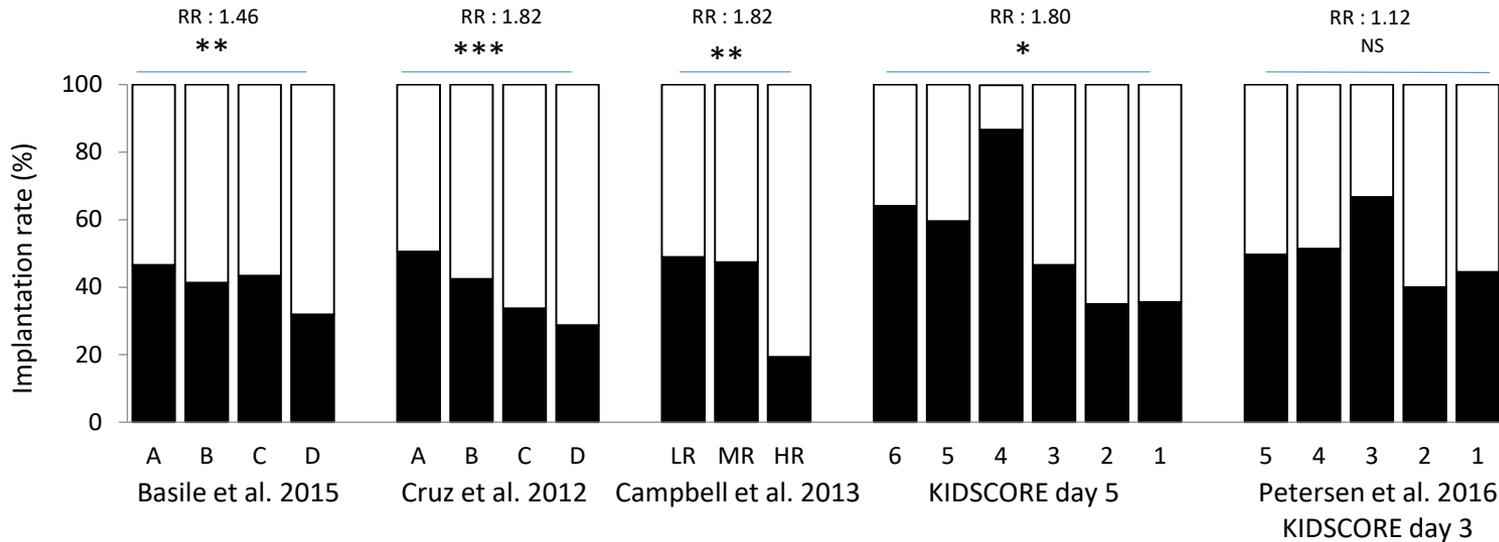
Établir un pipeline automatisé d'analyse de morphocinétiques.
=> **augmente la quantité d'information**

Association stade / courbe

Pronucléi 2 cellules 4 cellules 8 cellules 16 cellules Morula Blastocyste Expansion



Evaluation of external decision-making systems



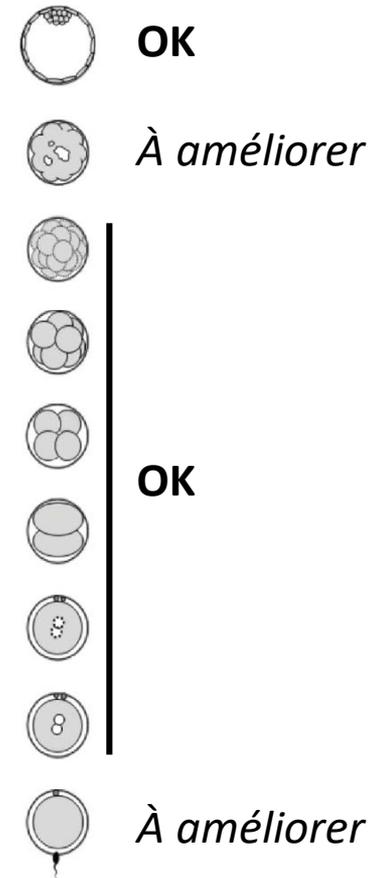
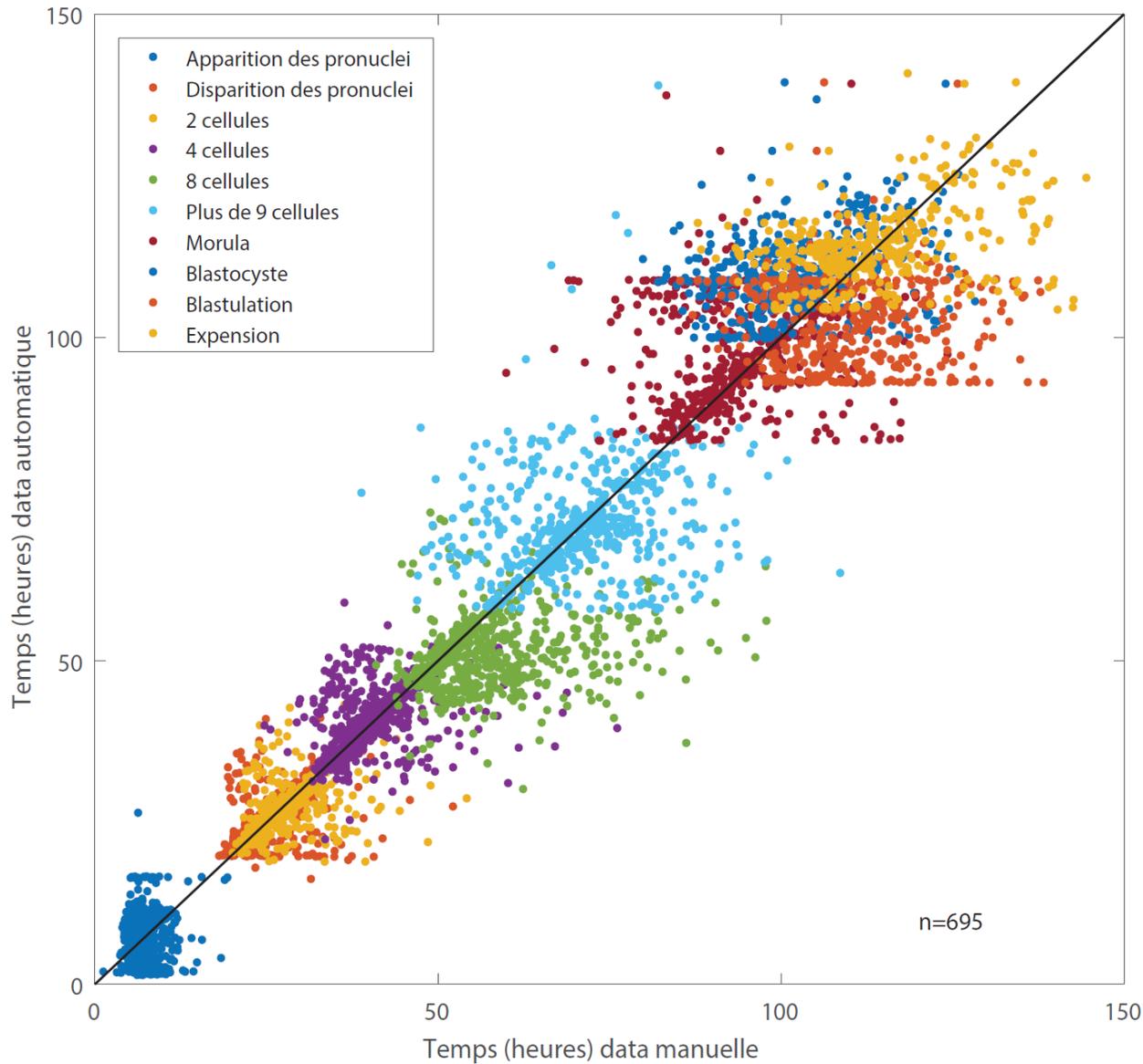
- Basile et al. (2015) : A (t3 = 34-40hpi et cc2 = 9-12h), B (t3 = 34-40hpi et cc2 <9h ou > 12h), C (t3 < 34 ou > 40hpi et cc2= 9-12h), D (t3 < 34 ou > 40hpi et cc2 <9h ou > 12h)
- Cruz et al (2012) : A (t5 = 48.8-56.6 hpi et S2 ≤ 0.76h), B (t5 < 48.8 ou > 56.6hpi et S2 ≤ 0.76h), C (t5 = 48.8-56.6 hpi et S2 > 0.76h), D (t5 < 48.8 ou > 56.6hpi et S2 > 0.76h)
- Campbell et al. (2013) : faible risque d'aneuploïdie (LR) (tSB < 96.2 hpi et tB < 122.9hpi), risque moyen d'aneuploïdie (MR) (tSB ≥ 96.2hpi et tB < 122.9hpi), risque élevé d'aneuploïdie (HR) (tB ≥ 122.9hpi)

Implantation rates of the embryo categories of five embryo selection algorithms (Dark = Positive hCG test – White = Negative hCG test)

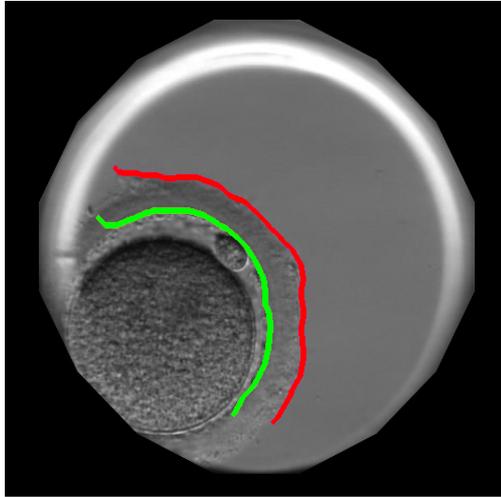
RR : relative Risk

NS : no statistically significant - * : p < 0,5 - ** : p < 0,01 - *** : p < 0,001

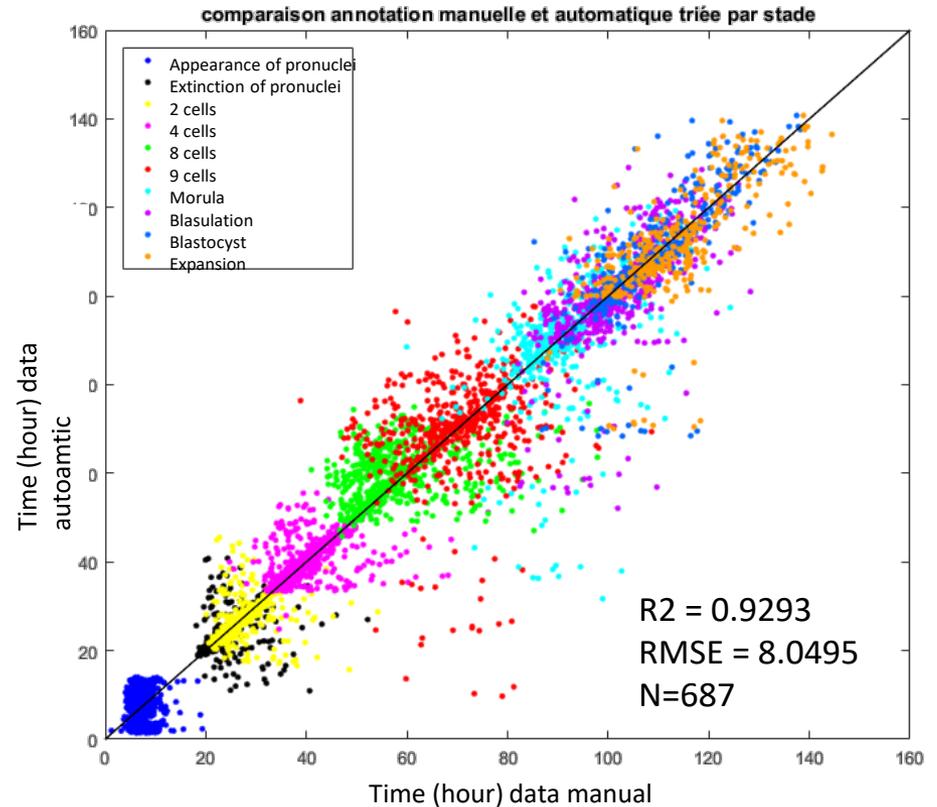
Annotation automatique vs annotation du biologiste



Ajout d'une étape de mesure de la ZP

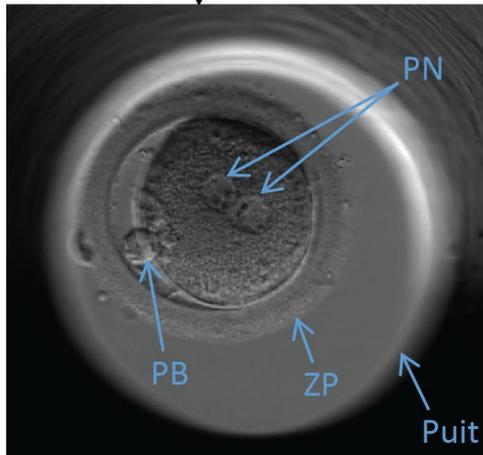
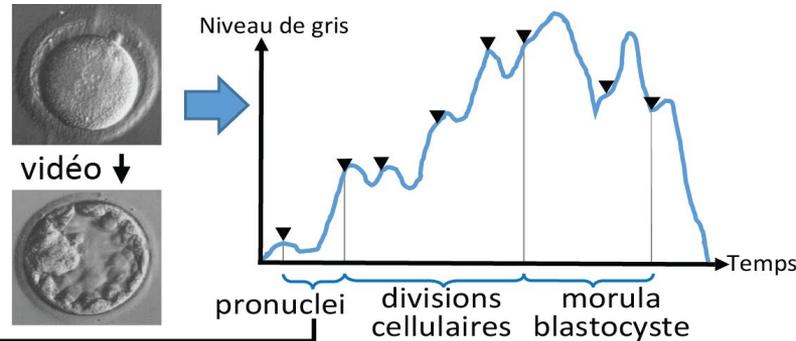


⇒ Quantification of blastocyst expansion

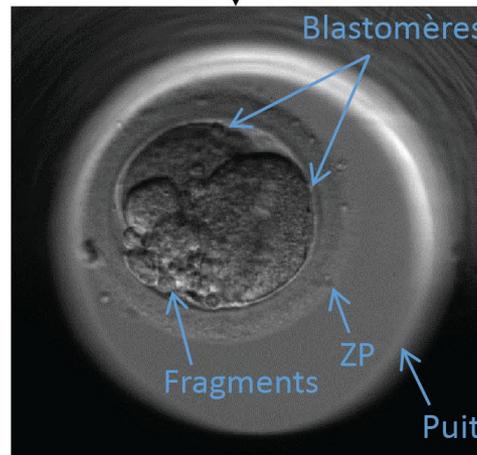


Works in mouse
(collab. M Cohen-Tannoudji)

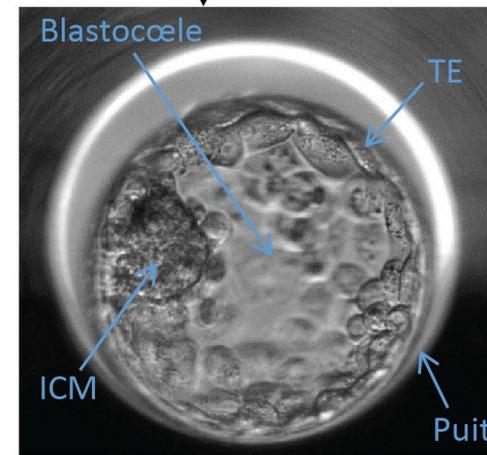
Analyse spécifique de chaque stade



- Taille de la ZP interne et externe
- Taille du blastomère
- Nombre de PN
- Nombre de PB

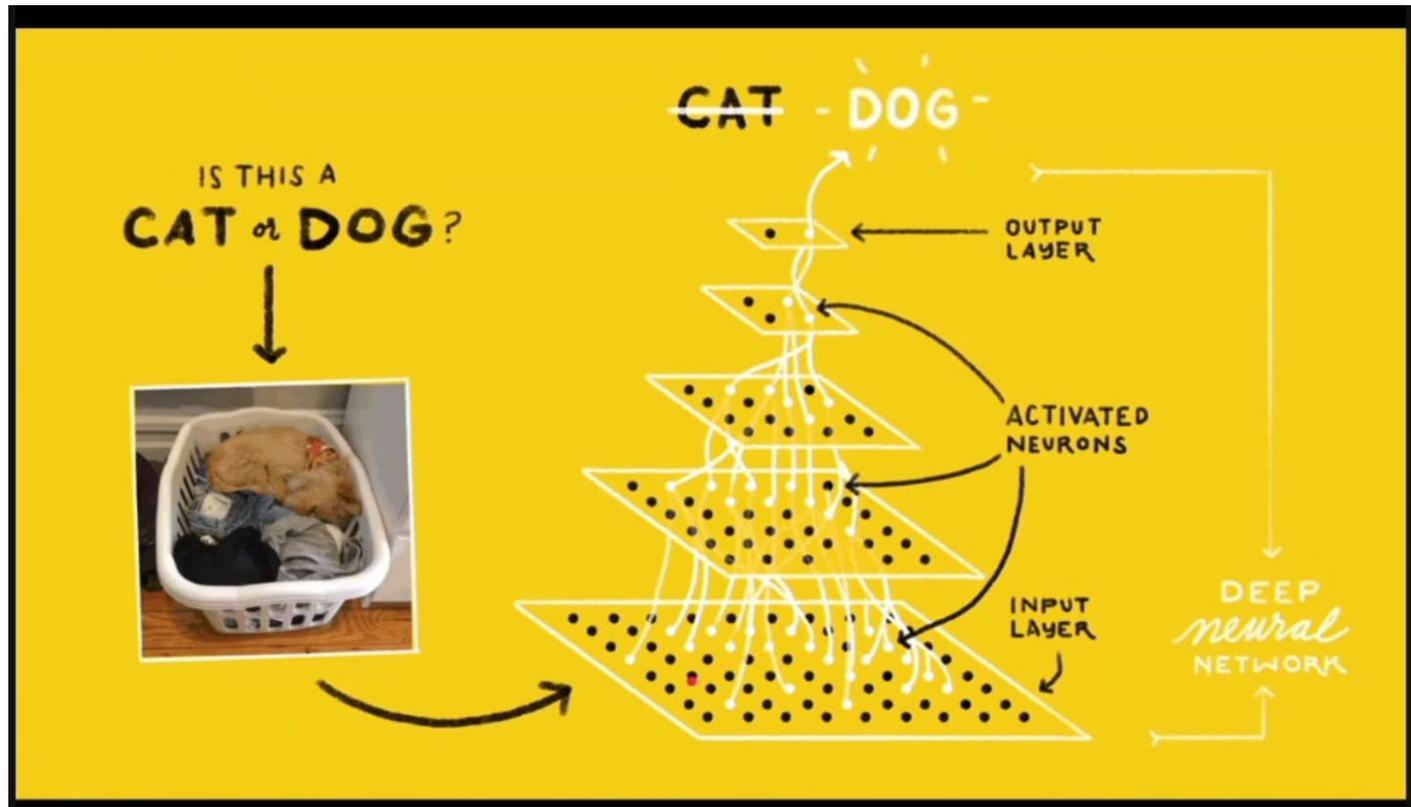


- Nombre de blastomère
- Homogénéité de taille des blastomères
- Pourcentage de fragment



- Taille du blastocyste
- Homogénéité de taille des cellules
- Taille de l'ICM

Deep learning appliqué à la FIV



Peu de facteurs prédictifs de la qualité embryonnaire ...
mais beaucoup de vidéos d'embryons disponibles !

Objectif : entraîner un réseau neuronal profond d'analyse de la qualité embryonnaire qui sera plus rapide et plus efficace que l'humain

65-73% de précision vs embryologiste

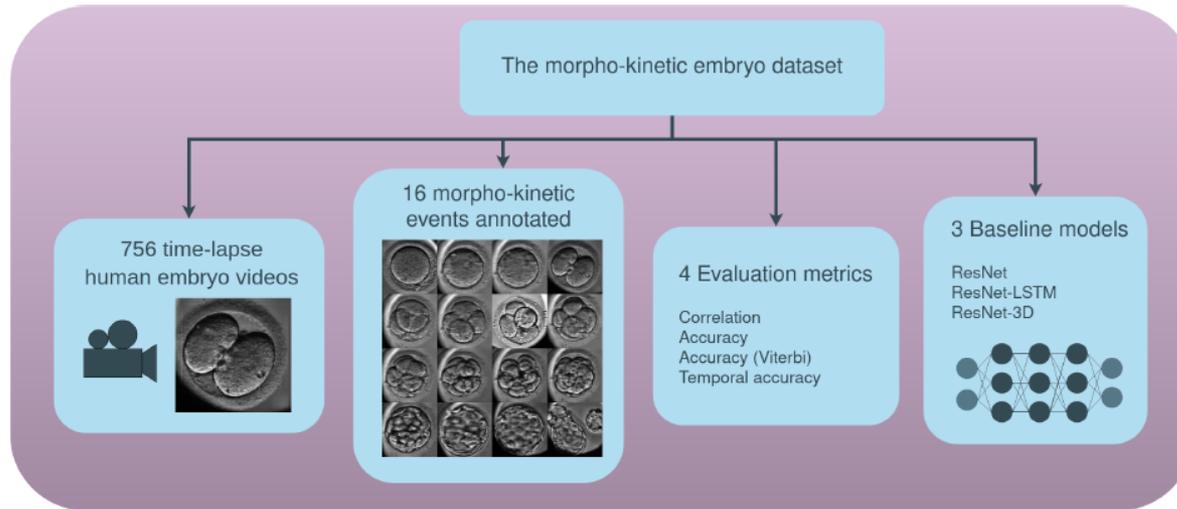


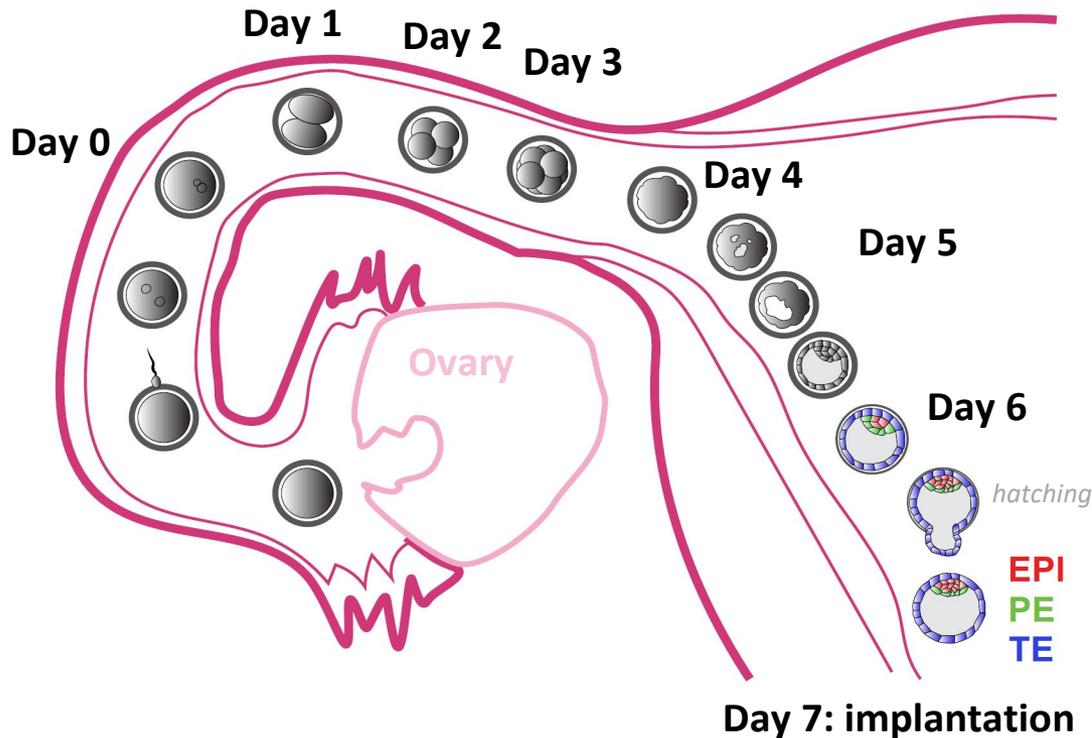
Fig. 3: The time-lapse embryo dataset. This dataset contains 756 videos with annotations for 16 morpho-kinetic events, accompanied by 4 custom evaluation metrics and 3 baseline model performances, along with cross-validation splits.

337 000 images of embryos

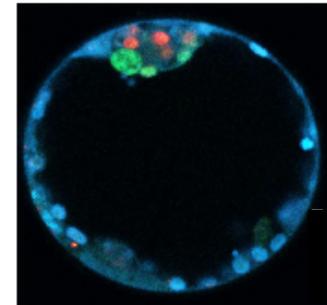
Model	Image processing	r	p	p_v	p_t
ResNet	Isolated	0.961 ± 0.026	0.663 ± 0.041	0.701 ± 0.044	0.371 ± 0.09
ResNet-LSTM	As a sequence	0.977 ± 0.009	0.685 ± 0.041	0.696 ± 0.043	0.559 ± 0.223
ResNet-3D	As a sequence	0.97 ± 0.021	0.705 ± 0.036	0.735 ± 0.042	0.659 ± 0.154

TABLE III: Performance of the baseline models obtained after the 5-fold cross-validation. r is correlation, p is accuracy, p_v is Viterbi accuracy and p_t is temporal precision.

Understanding and quantifying human preimplantation development in order to predict its outcome



Developmental biology
→ Lineage specification

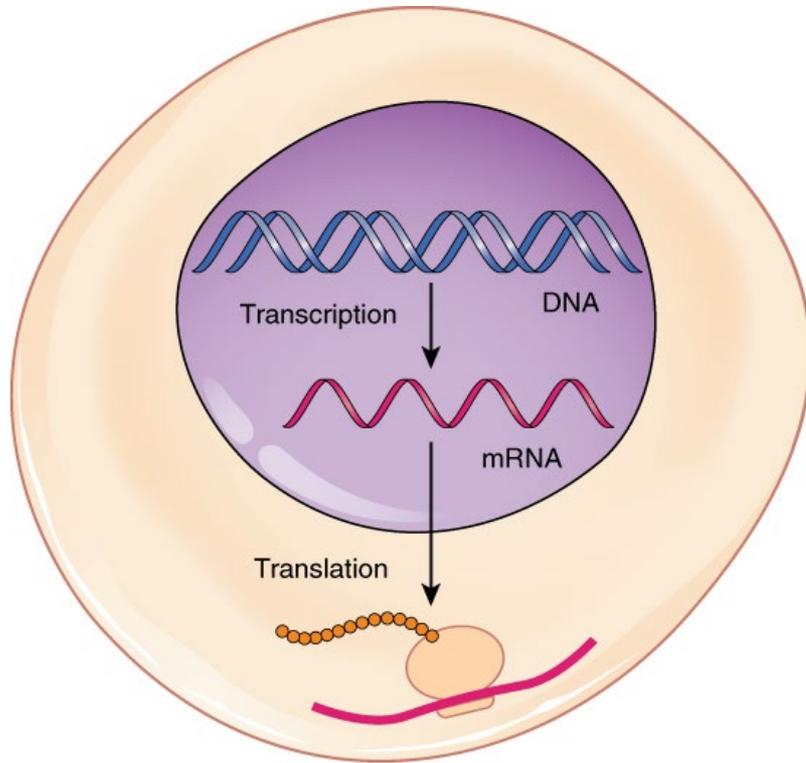


GATA2
KLF17
SOX17

Kinetics of events during preimplantation development in human?

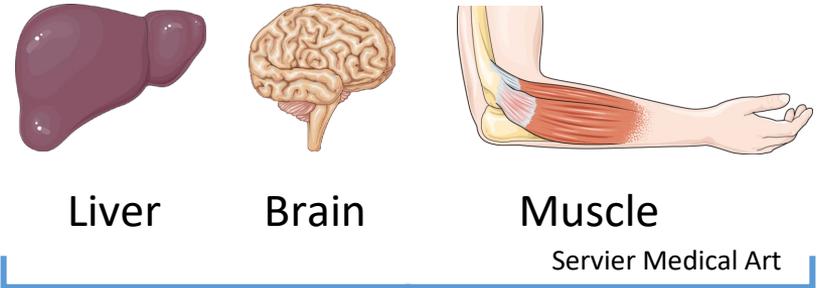
Lineage specification?

Transcriptome is the identity card of the cell



OpenStax Creative Commons

- All the cells have the same DNA

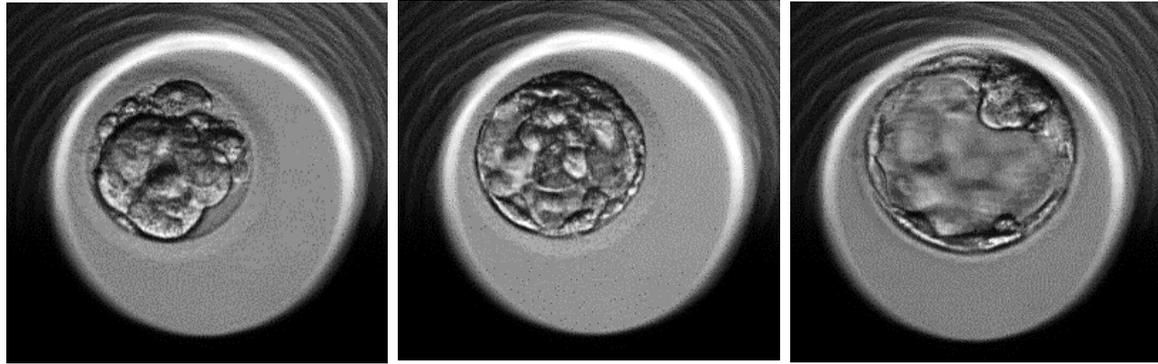


Same DNA, different functions

Different activated genes = different mRNA
= different **TRANSCRIPTOMES** (all the mRNA)

Transcriptome is all the active genes
Get the transcriptome of the cell = get the identity card of the cell

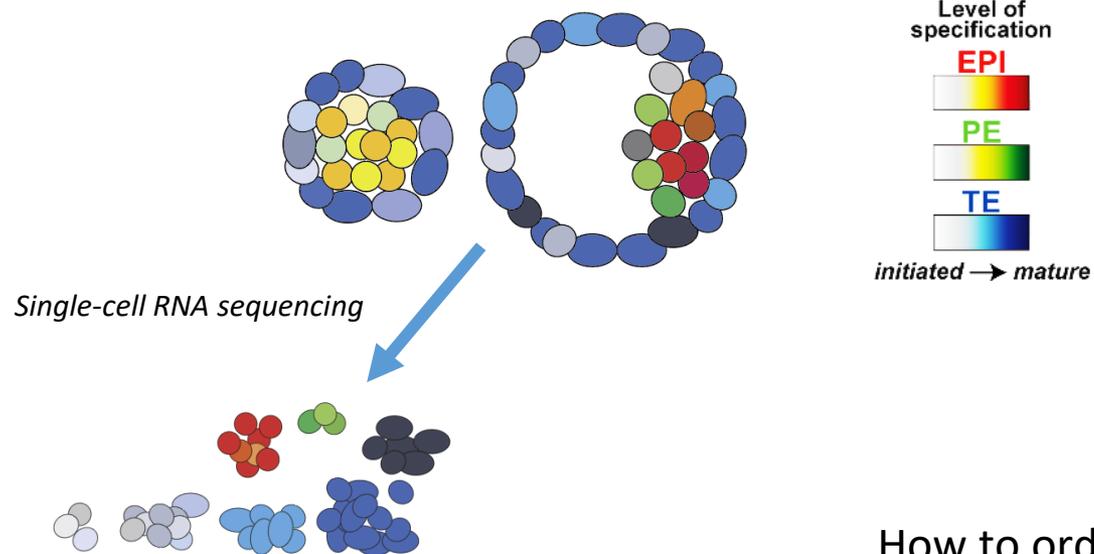
Grouping cells by similarity



Morula

Blastocyst

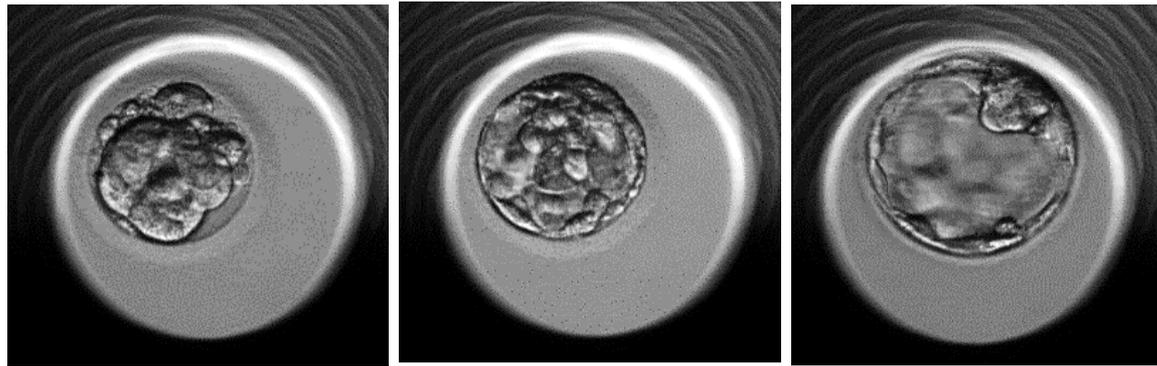
Expansion



How to order the clusters ?

**Gene/Cell cluster
identification**

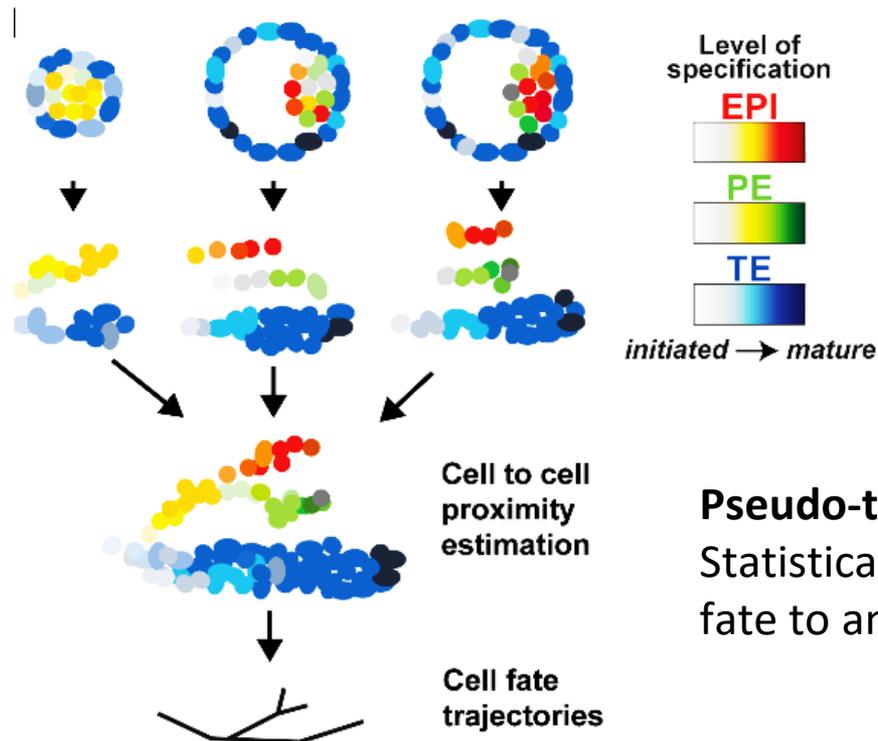
Pseudotime : establishing developmental trajectories



Morula

Blastocyst

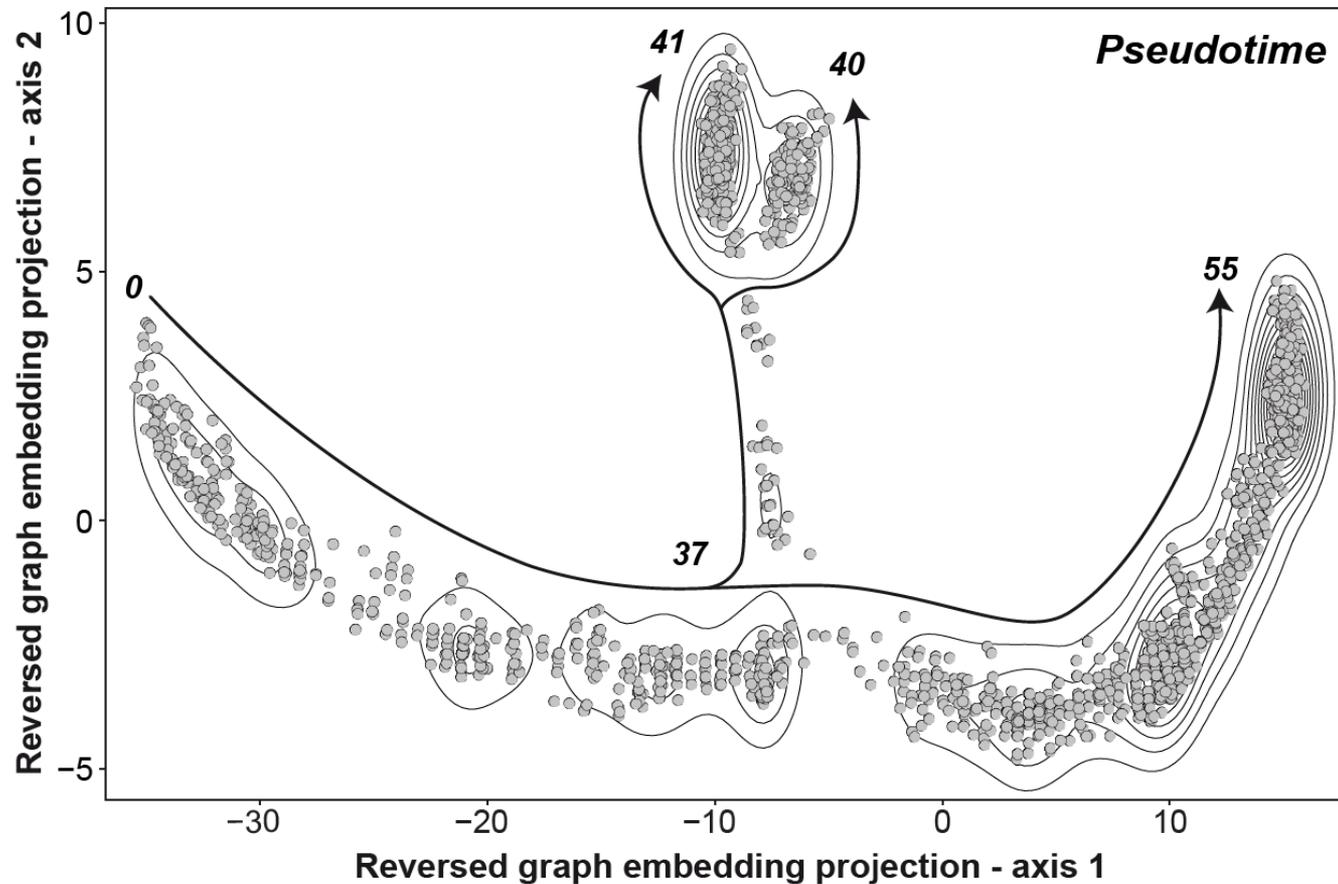
Expansion



Pseudo-time:

Statistical path the likeliest from one fate to another.

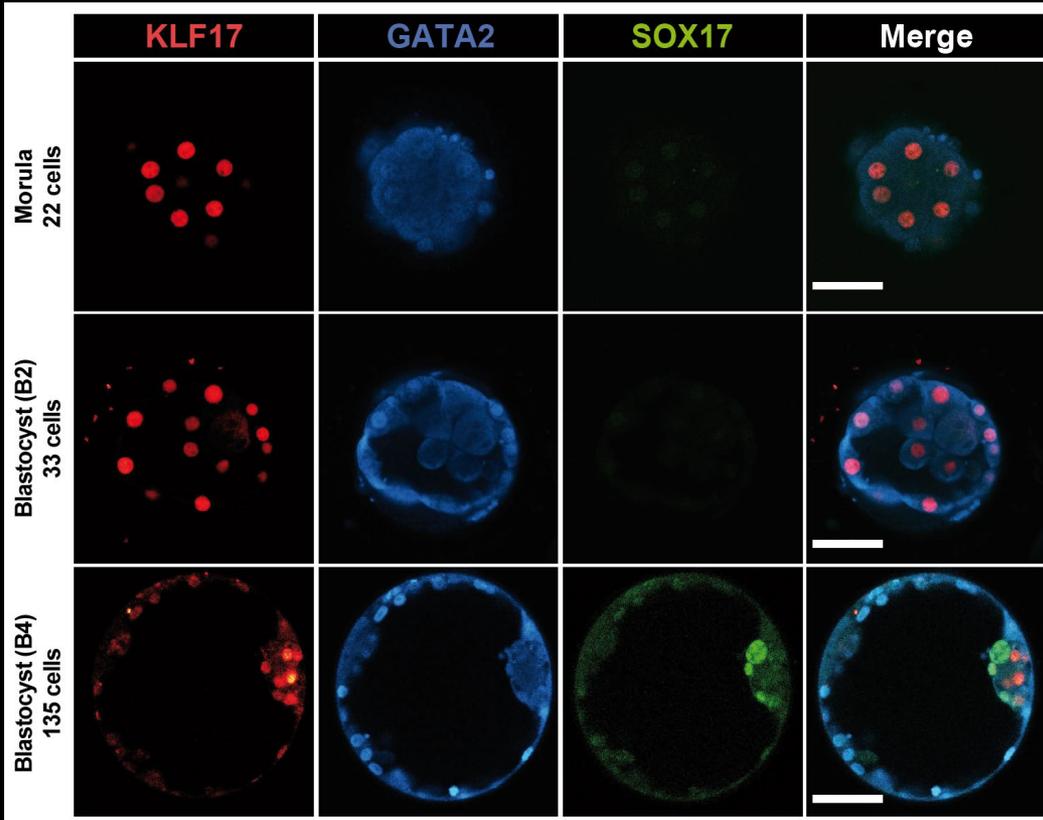
Human preimplantation development pseudotime model



Is this pseudotime valid?

- Positional information
- Markers of **EPI**, **TE** and **PE**.
- Morphokinetic

Lineage markers confirm identity of branches

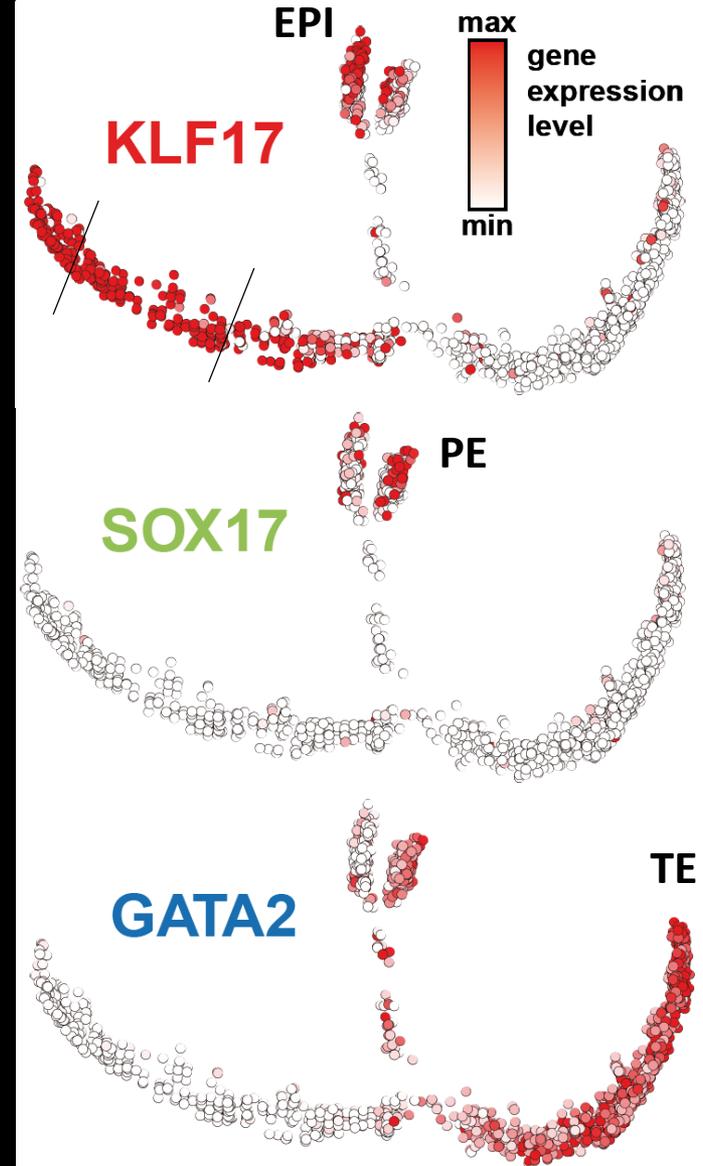


From Kilens, Meistermann et al, Nat Com, 2018

Morula (24 cells)

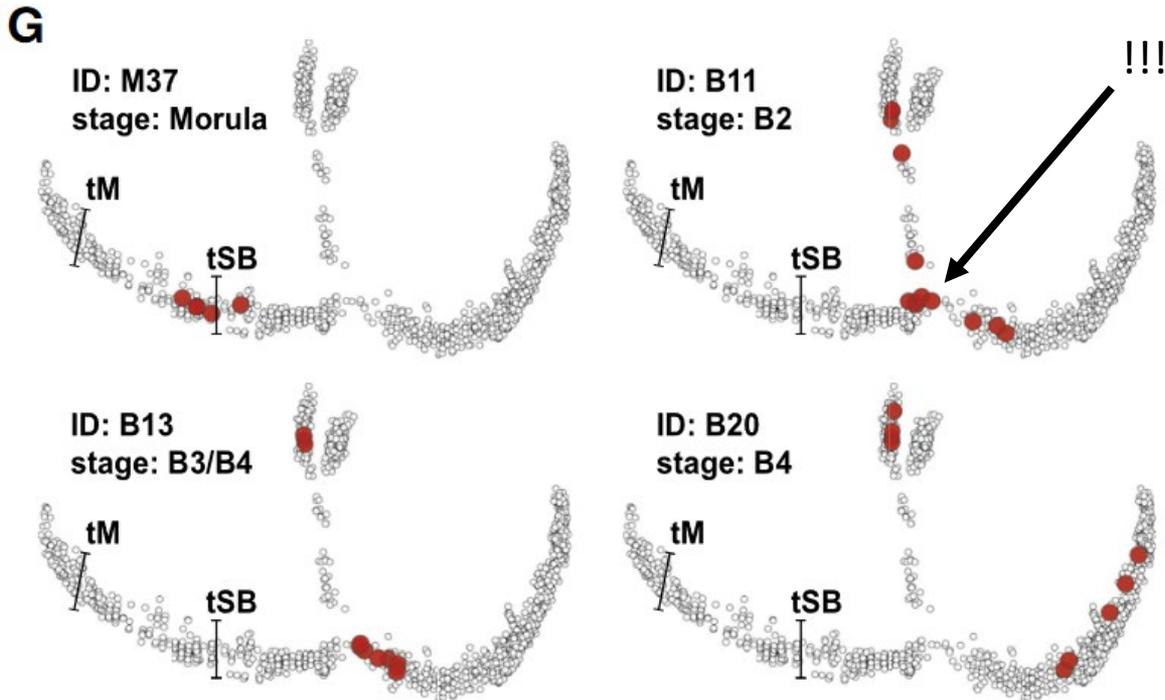
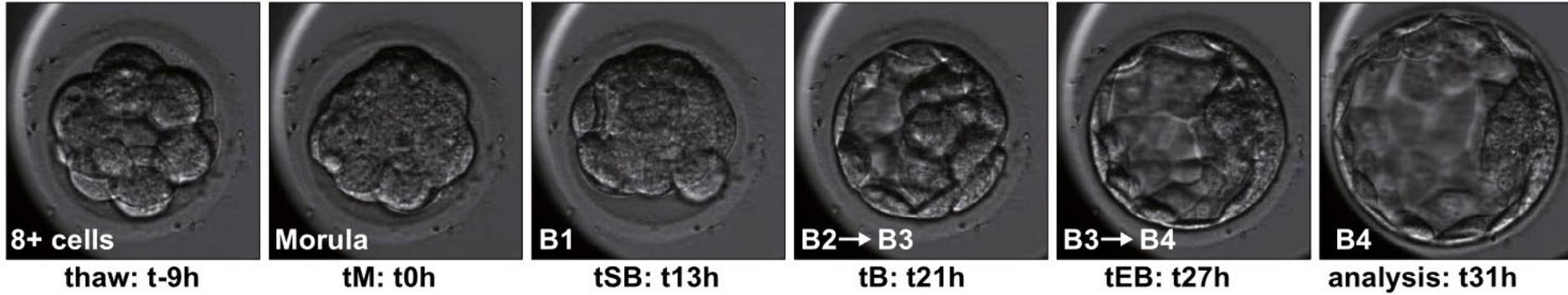
Morula $\xrightarrow{17h}$ B2 (33 cells)

Morula $\xrightarrow{16h}$ B2 $\xrightarrow{7h}$ B4 (135 cells)

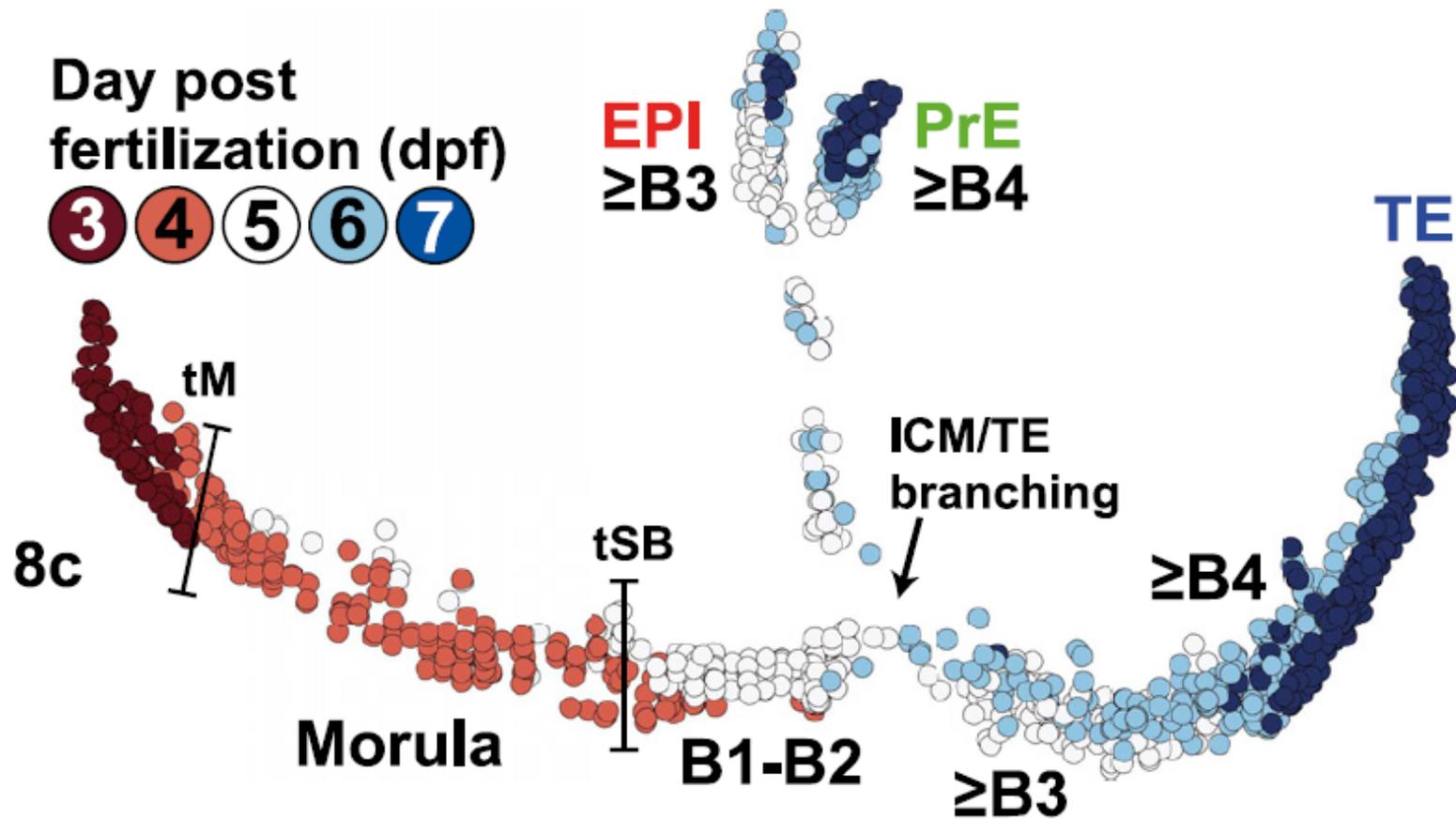


ICM/TE specification in human occurs at B2/B3 stage

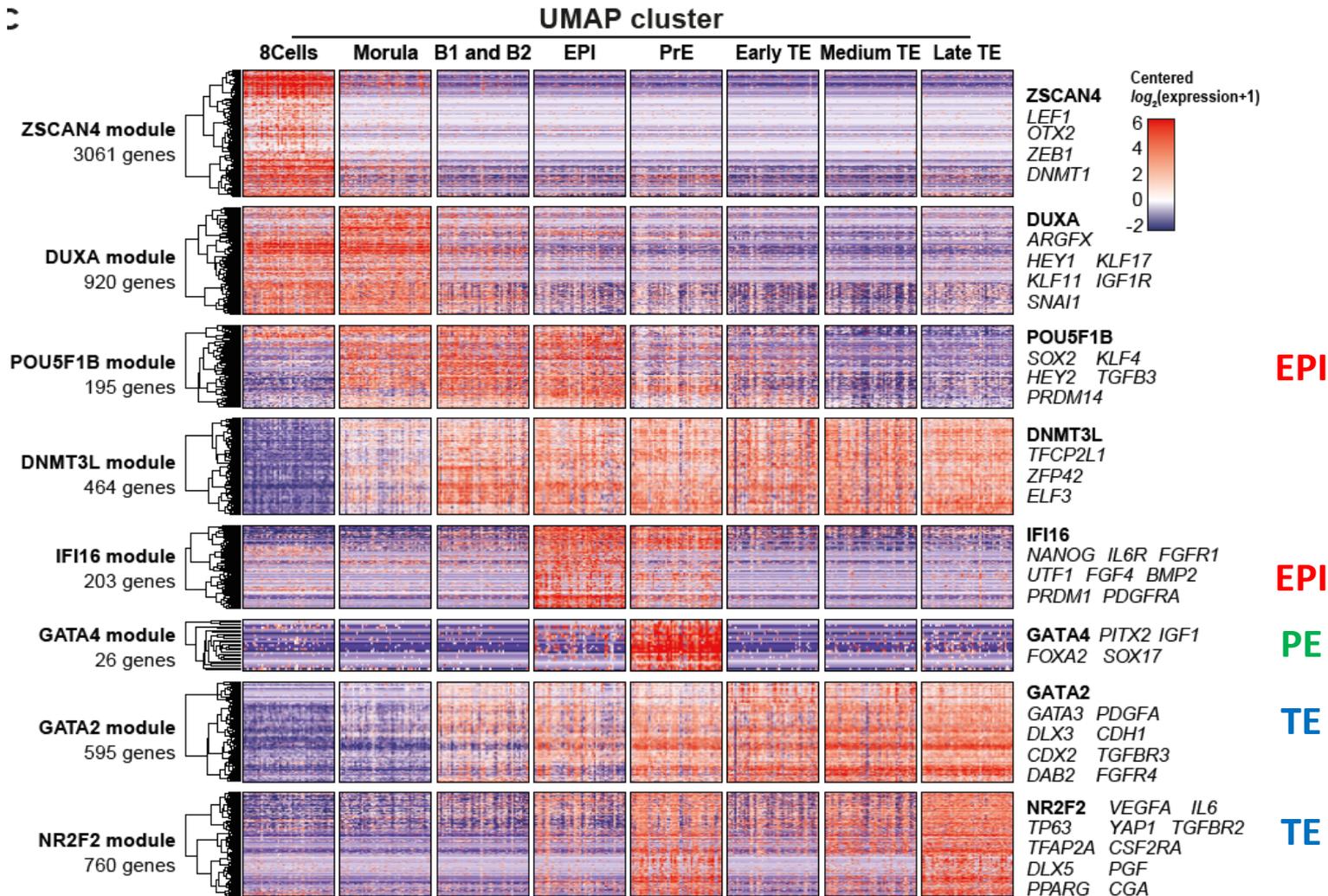
ID: B13



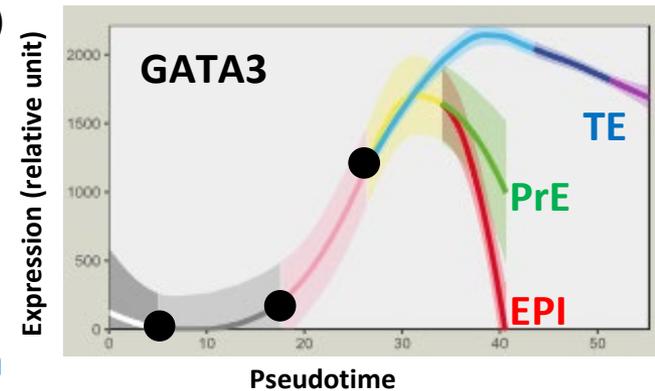
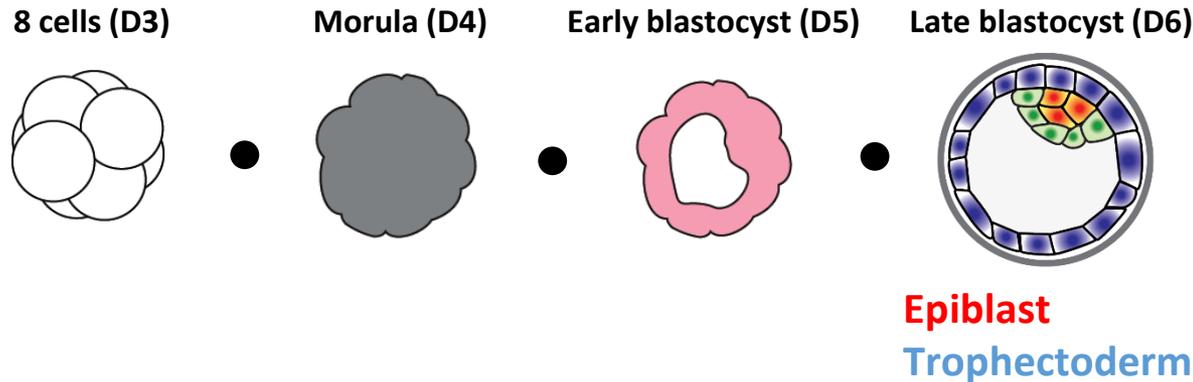
Pseudotime accurately describes human preimplantation development



Gene modules are sequentially expressed



GATA3 is asymmetrically expressed at the morula stage



Morula

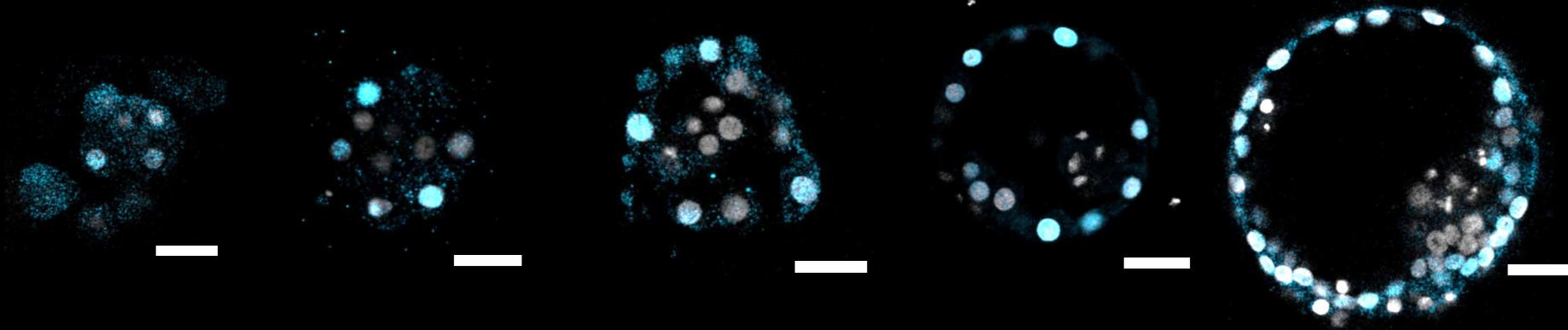
Morula

B1/B2

B3

B4

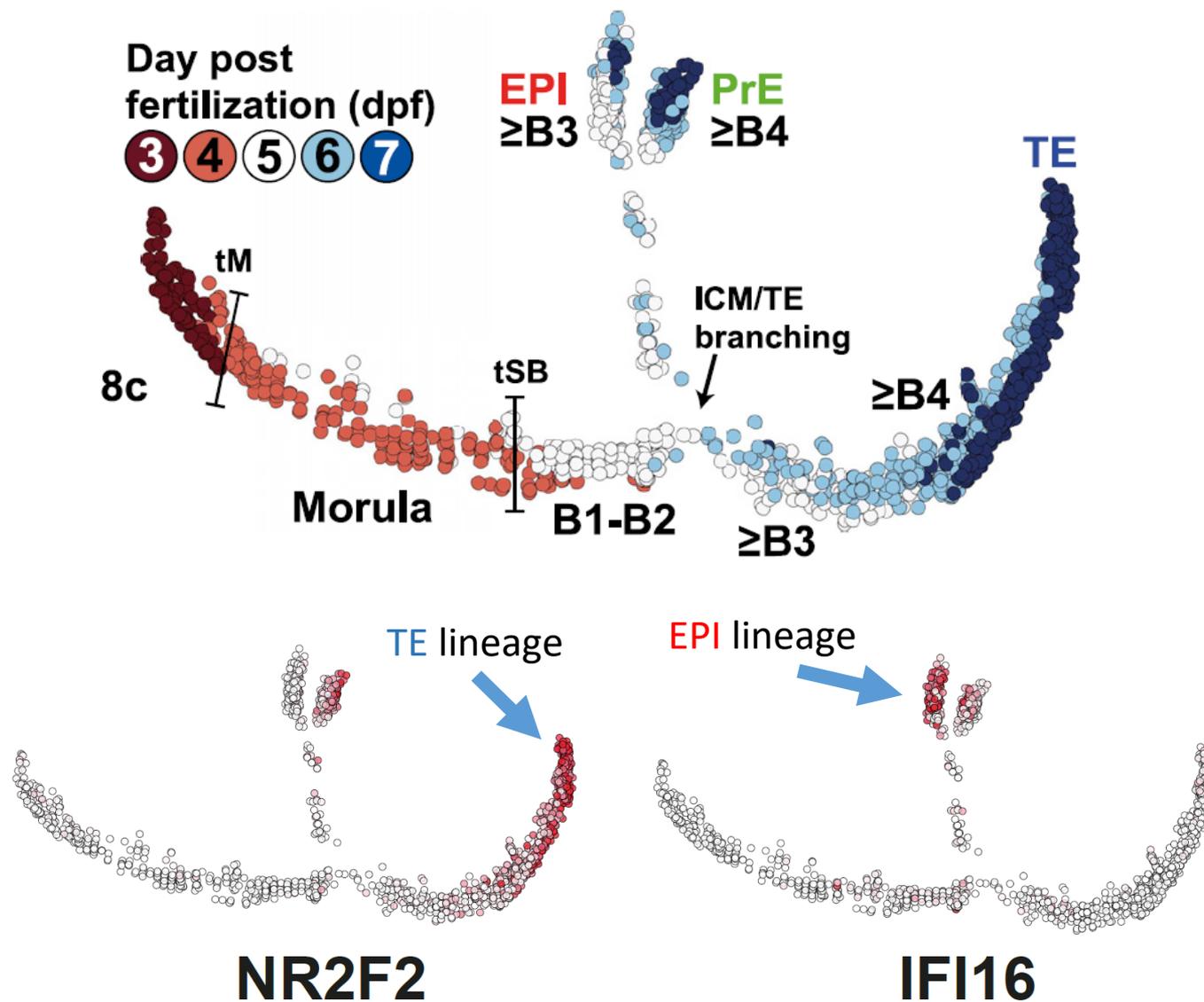
GATA3
DAPI



n = 10 Echelle = 50µm



NR2F2 and IFI16 are expressed in late expanded (B4) blastocysts

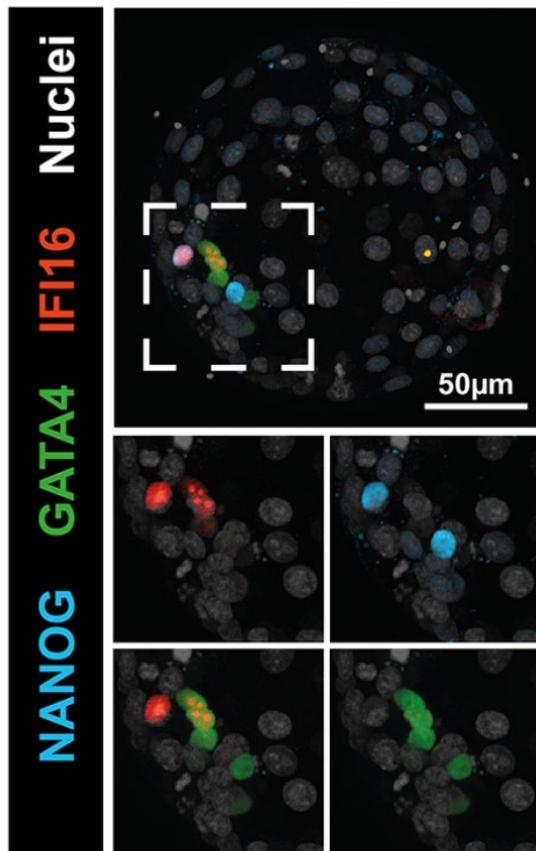




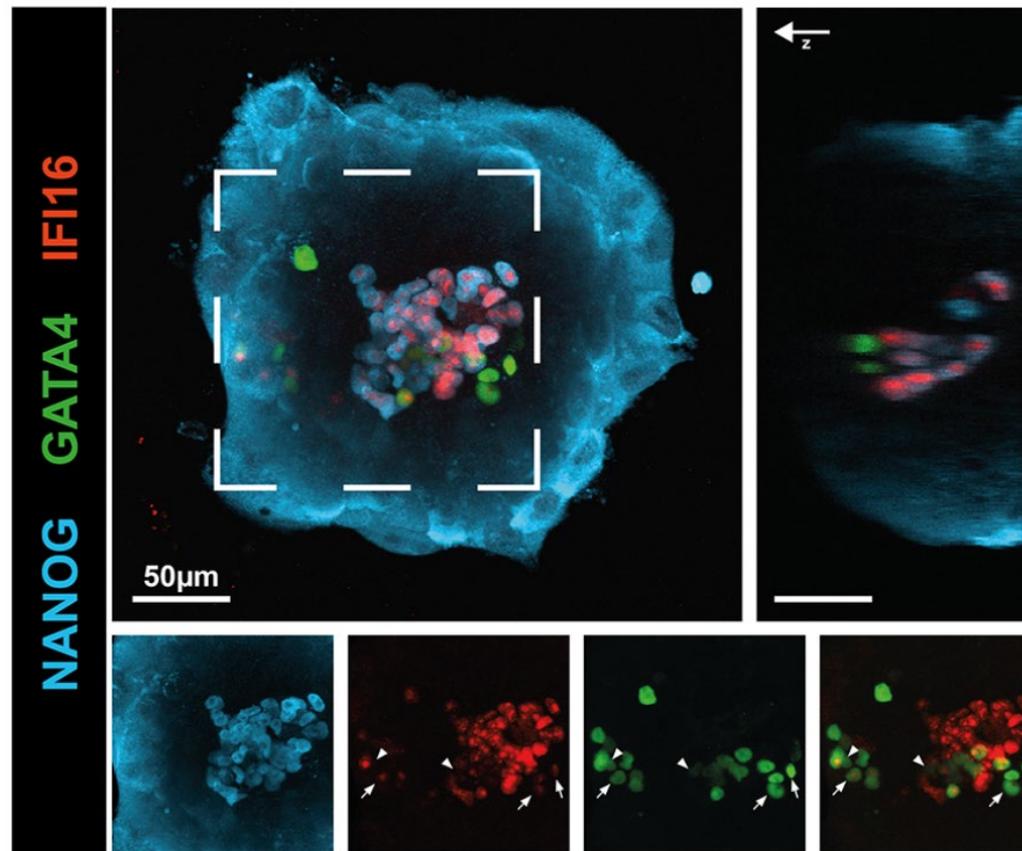
IFI16 (EPI) and GATA4 (PrE) reveal the dynamic of 2nd specification

Blastocyst B4
131 cells

B3 + 72h "day 8" embryo
190+ cells



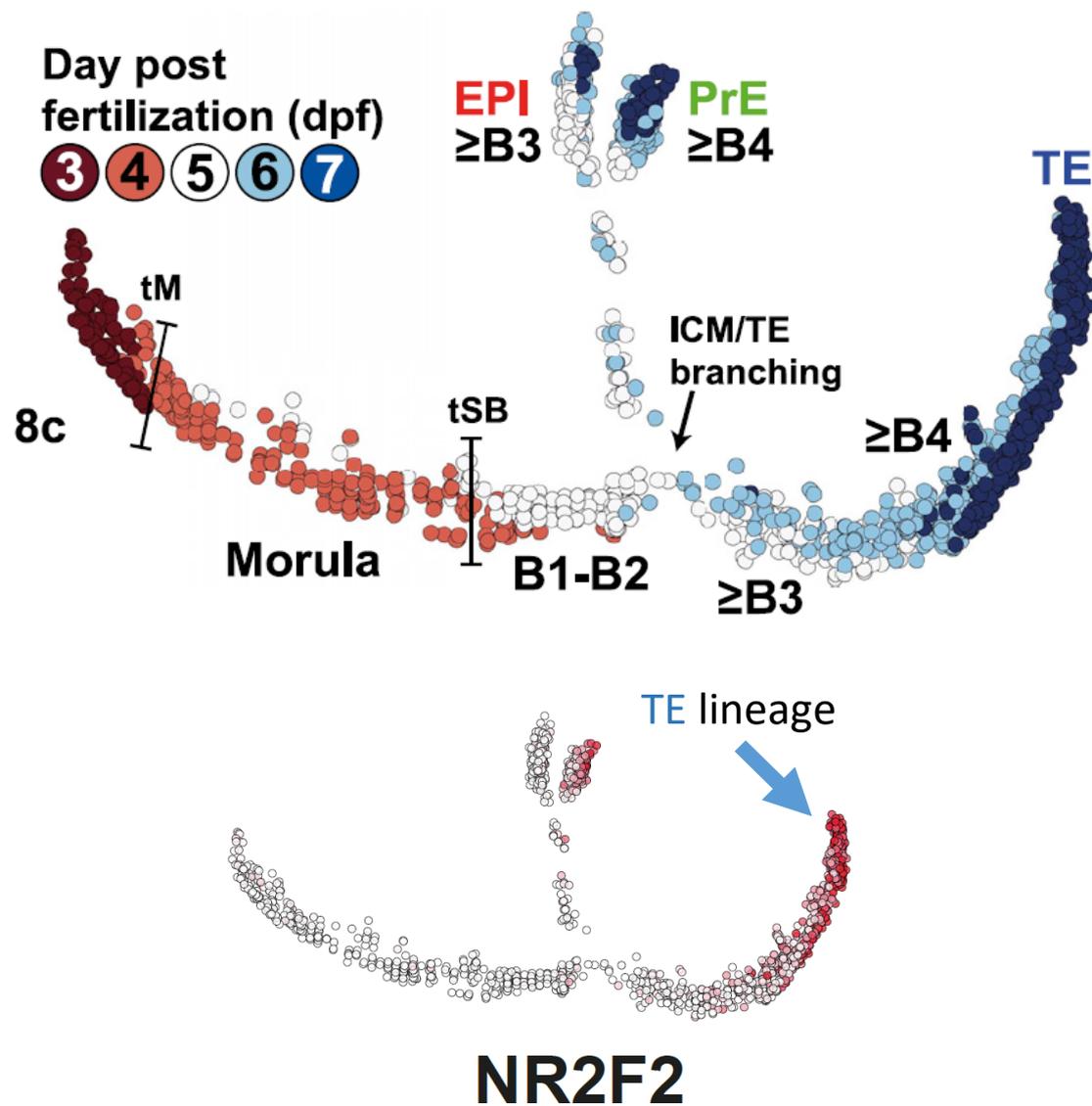
IFI16 can co-localize with NANOG and GATA4 in blastocyst B4



IFI16 is expressed in all NANOG+ cells
IFI16+ cells lose GATA4 expression

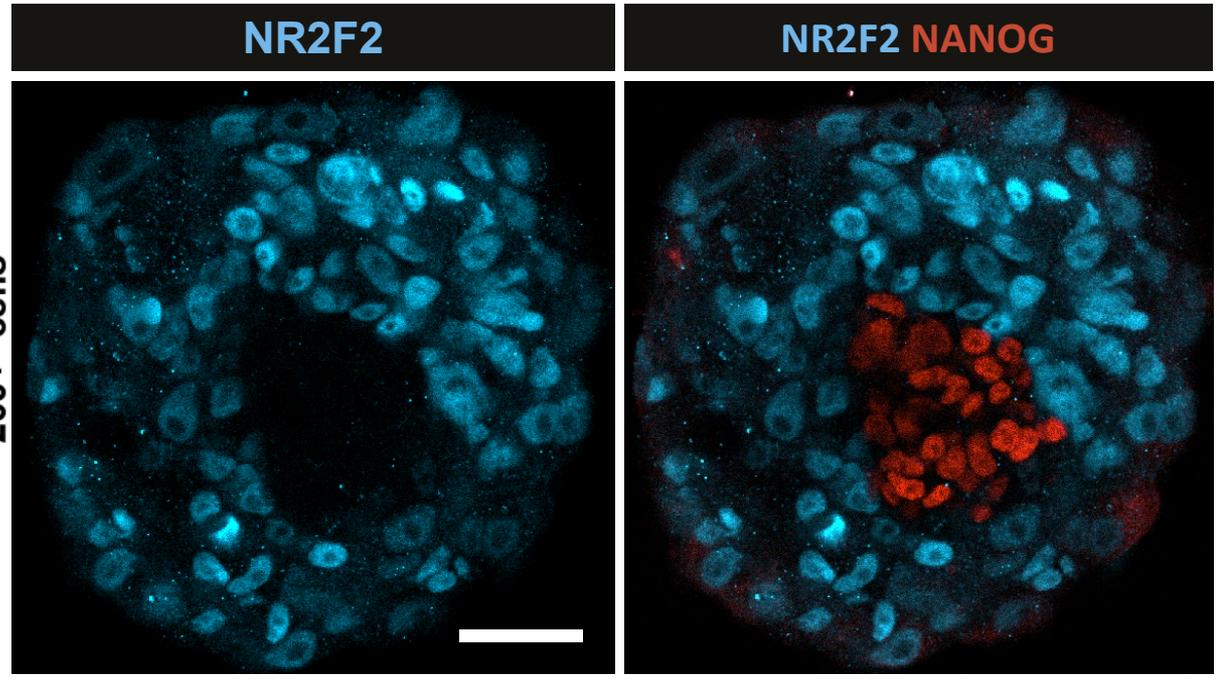
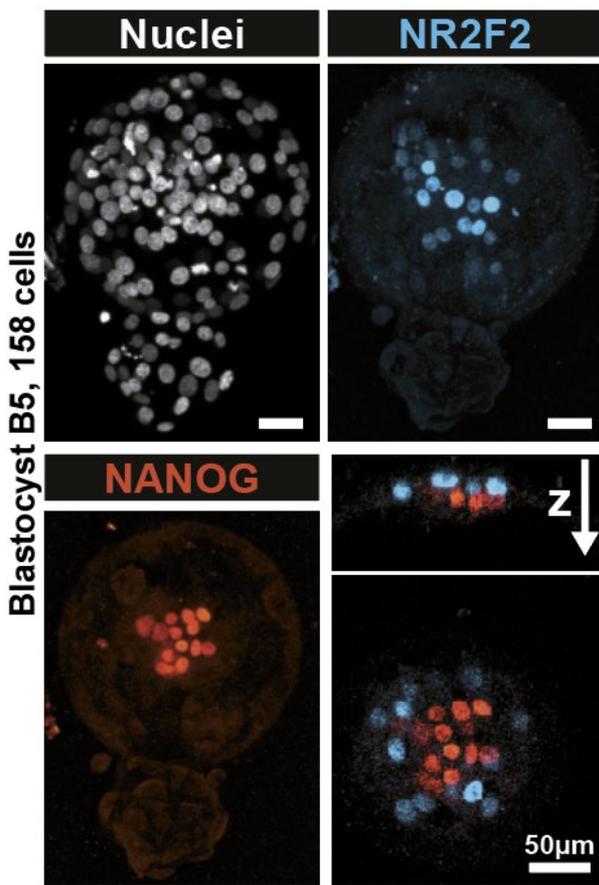


NR2F2 is expressed in late expanded (B4) blastocysts





Polar trophectoderm matures first with NR2F2 expression that spreads to all TE cells upon implantation



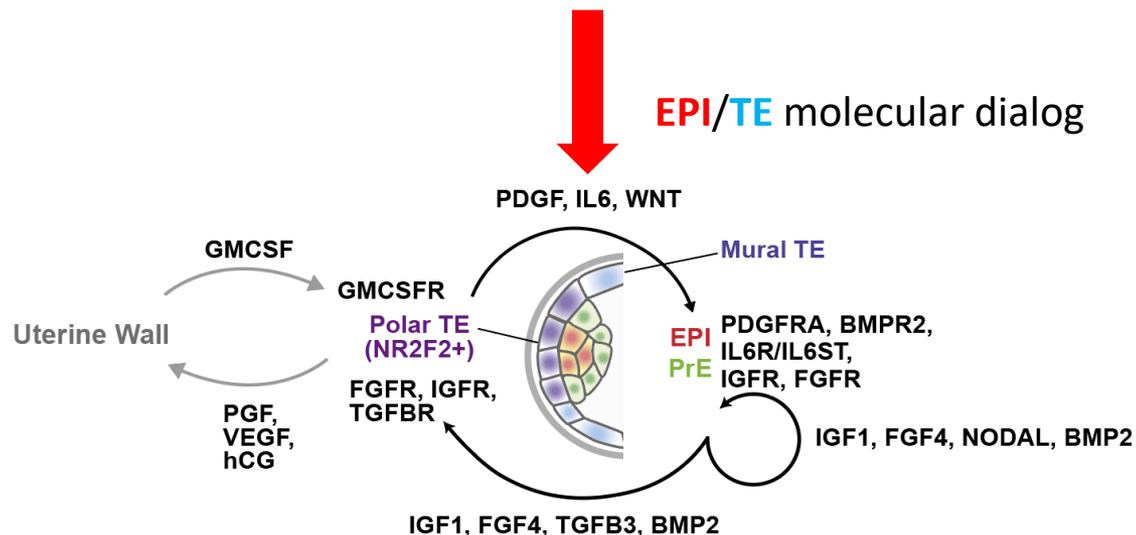
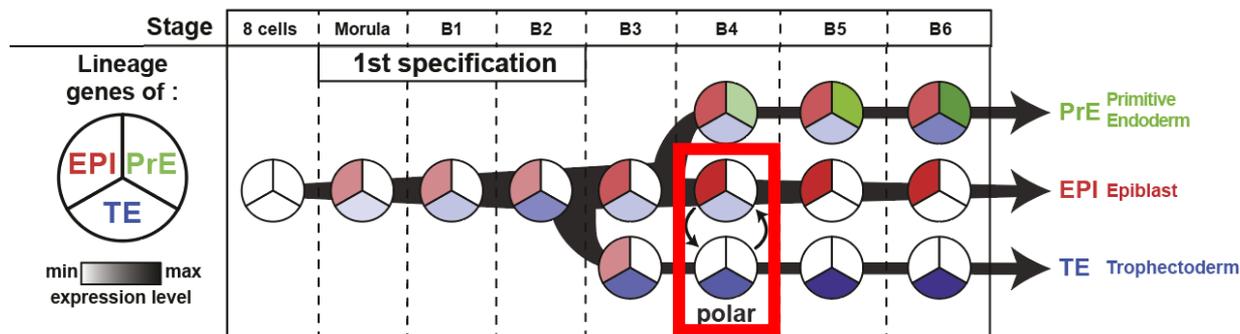
NR2F2 arises from the polar TE, front of the epiblast

EPI/TE molecular dialog ?



Conclusion : human preimplantation development model

- Trophectoderm/ICM transcriptomes diverge at B2/B3 stage
- **EPI** is specified before **PrE**
- **EPI/TE** molecular dialog



Key transcriptomics resources to modelise embryo development with cellular models

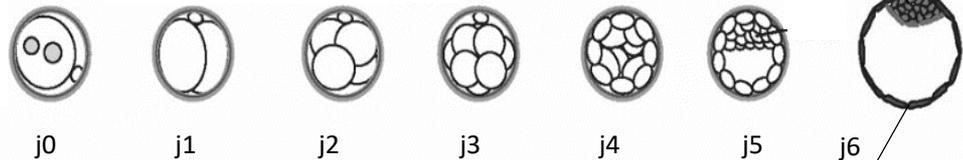
Reprogramming cells towards preimplantation fates

Multiple cell states matching specific developmental stages

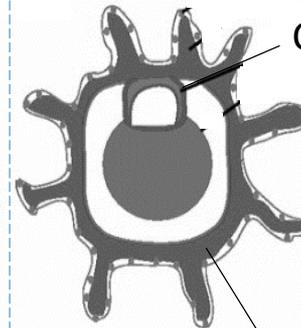
implantation

Pre-implantation

Post-implantation



2014
 Internal cells : **epiblast**
 Cell.model : **naive iPSC**



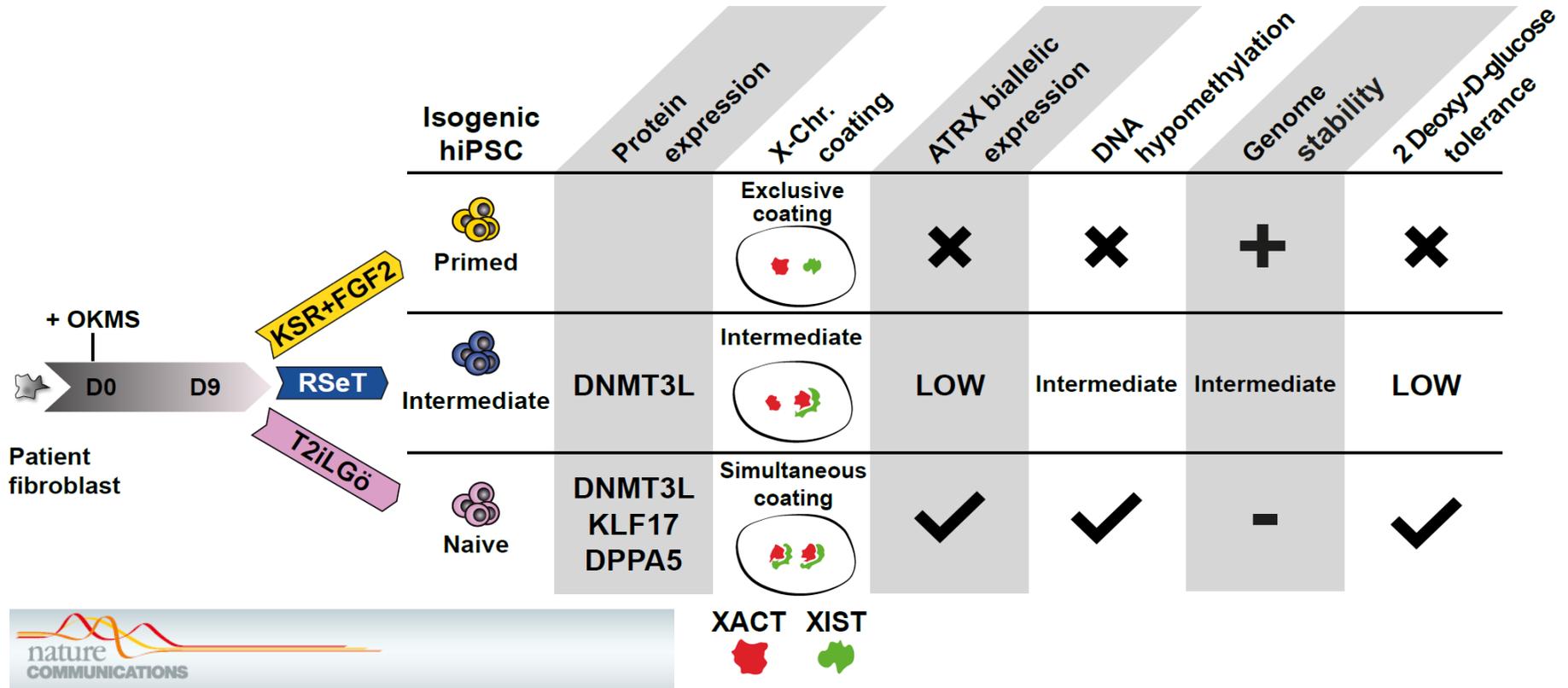
1998
 Internal cells : **epiblast**
 Cell. Model : **primed iPSC**

External cells : **trophectoderm**
 Cell. model : 2021 ?

External cells : **trophoblast**
 Cell. Model : **iTSC AV01**
2018

⇒ **Reprogramming = genetic diversity**

Naive hiNPSC, a good model to understand regulation of human pluripotency



ARTICLE

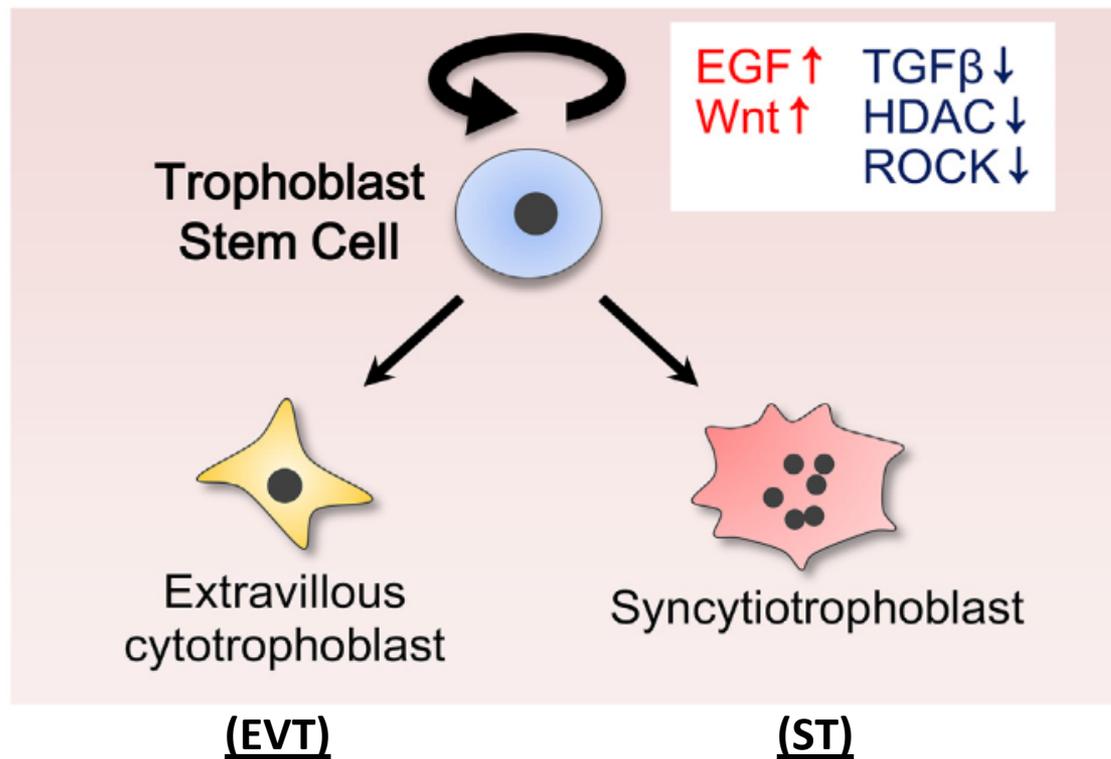
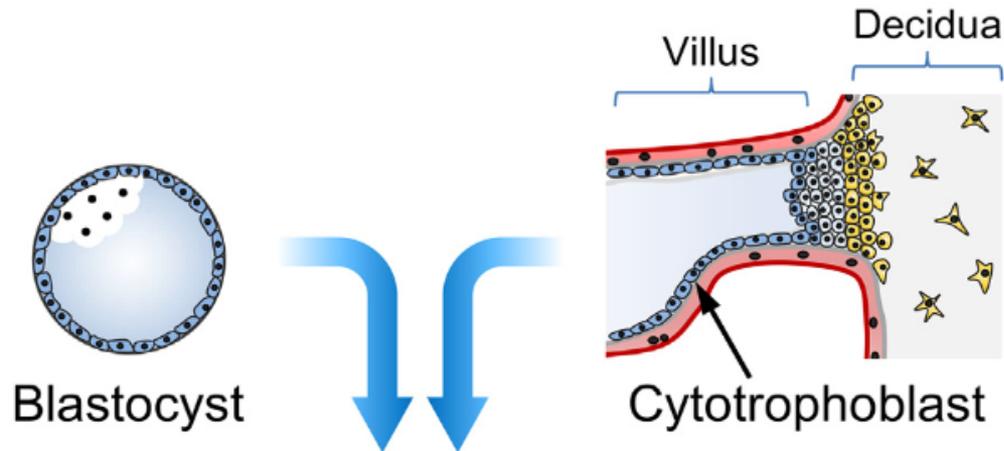
DOI: 10.1038/s41467-017-02107-w

OPEN

Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells

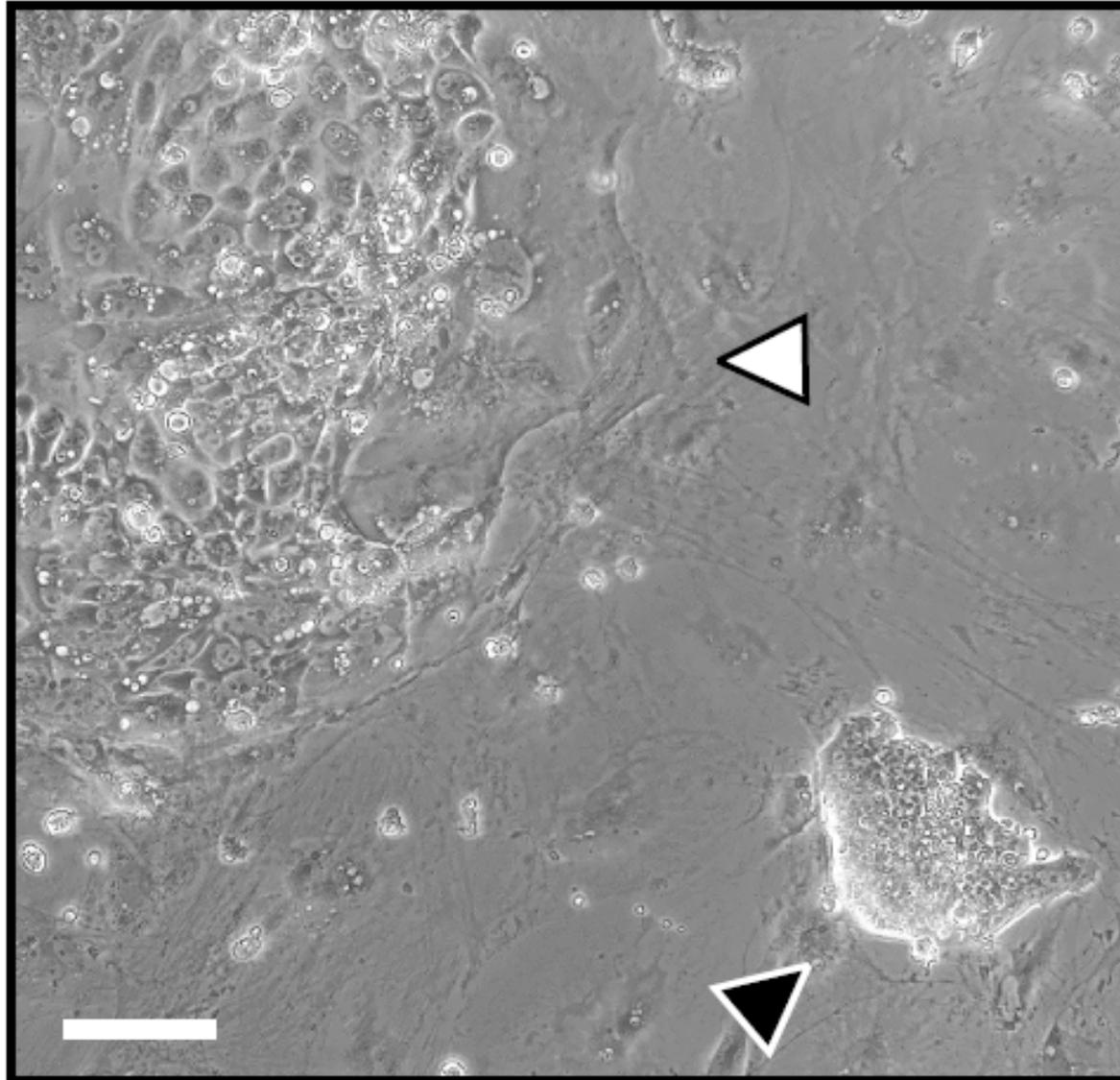
Stéphanie Kilens^{1,2,3}, Dimitri Meistermann^{1,2,3,4}, Diego Moreno^{1,2,3}, Caroline Chariou⁵, Anne Gaignerie⁵, Arnaud Reignier^{1,2,3,6}, Yohann Lelièvre⁴, Miguel Casanova⁷, Céline Vallot⁷, Steven Nedellec⁸, Léa Flippe^{1,2,3}, Julie Firmin^{1,2,3,6}, Juan Song⁹, Eric Charpentier¹⁰, Jenna Lammers^{1,2,3,6}, Audrey Donnart¹⁰, Nadège Marec¹¹, Wallid Deb¹², Audrey Bihouée¹⁰, The Milieu Intérieur Consortium, Cédric Le Caignec^{12,13}, Claire Pecqueur¹⁴, Richard Redon^{10,15}, Paul Barrière^{1,2,3,6}, Jérémie Bourdon⁴, Vincent Pasque⁹, Magali Soumillon^{16,17}, Tarjei S. Mikkelsen^{16,18}, Claire Rougeulle⁷, Thomas Fréour^{1,2,3,6} & Laurent David^{1,2,3,5}

Trophoblast stem cells form the placenta



Okoe et al, 2018,
CellStemCell

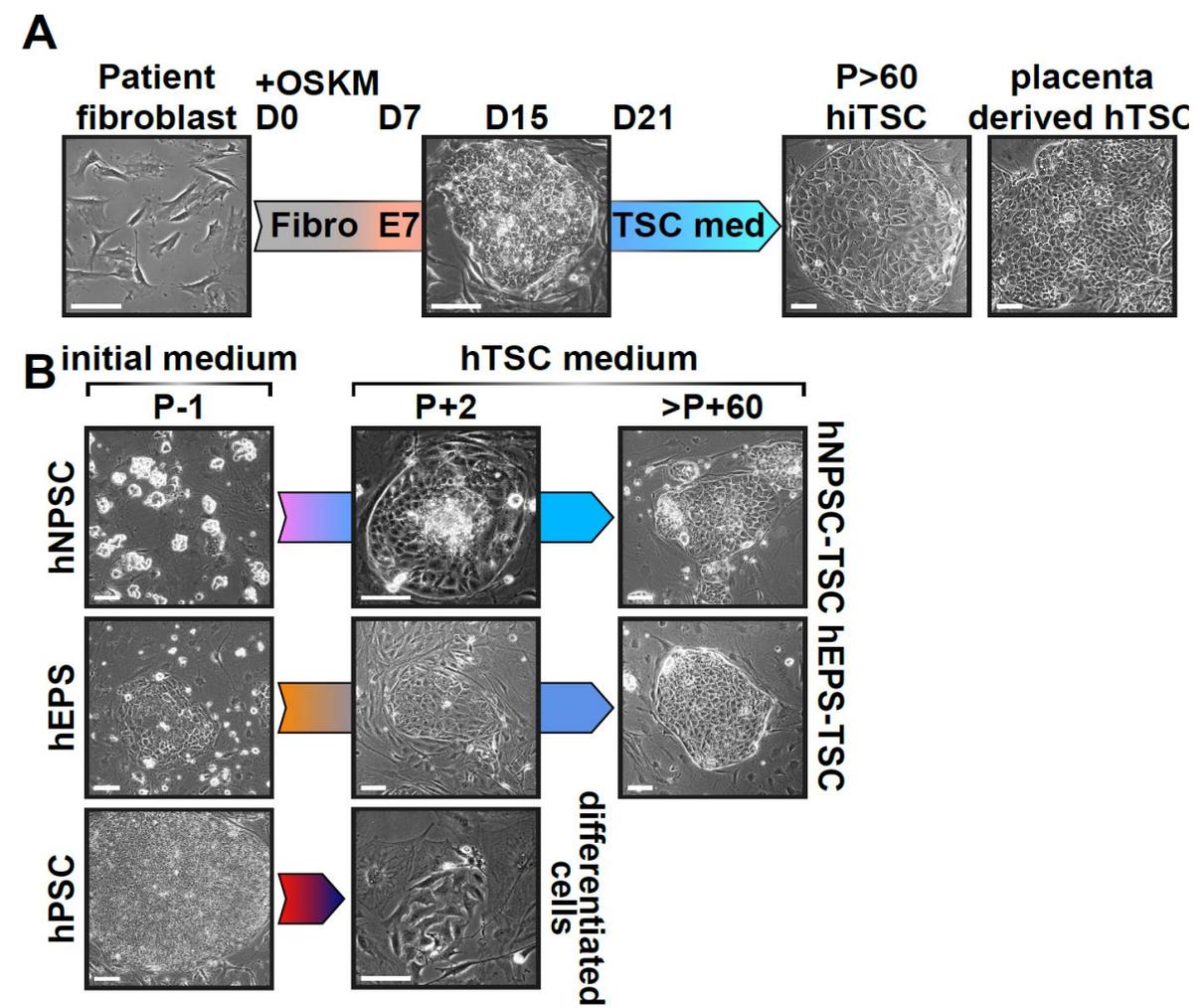
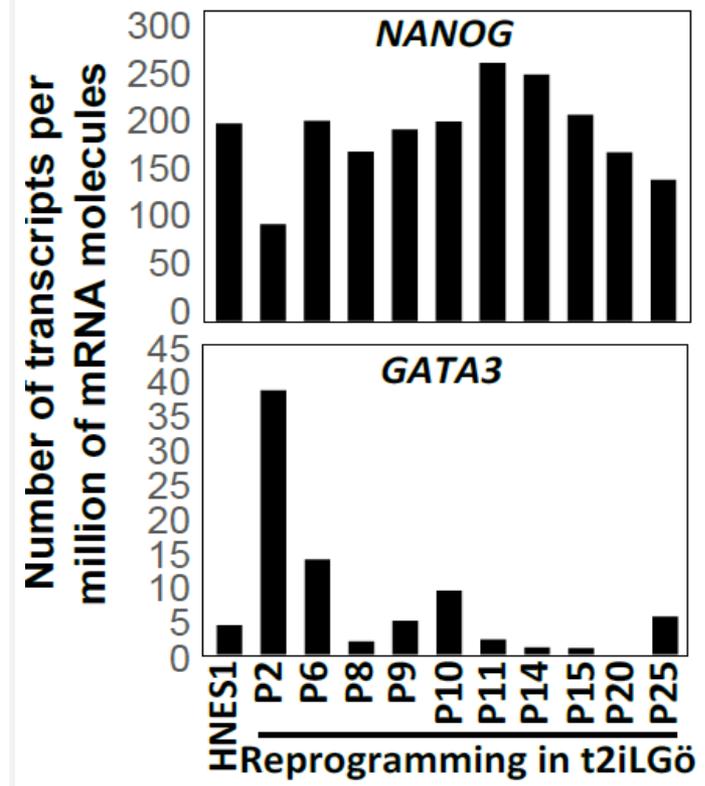
Concomitant generation of other cells during reprogramming



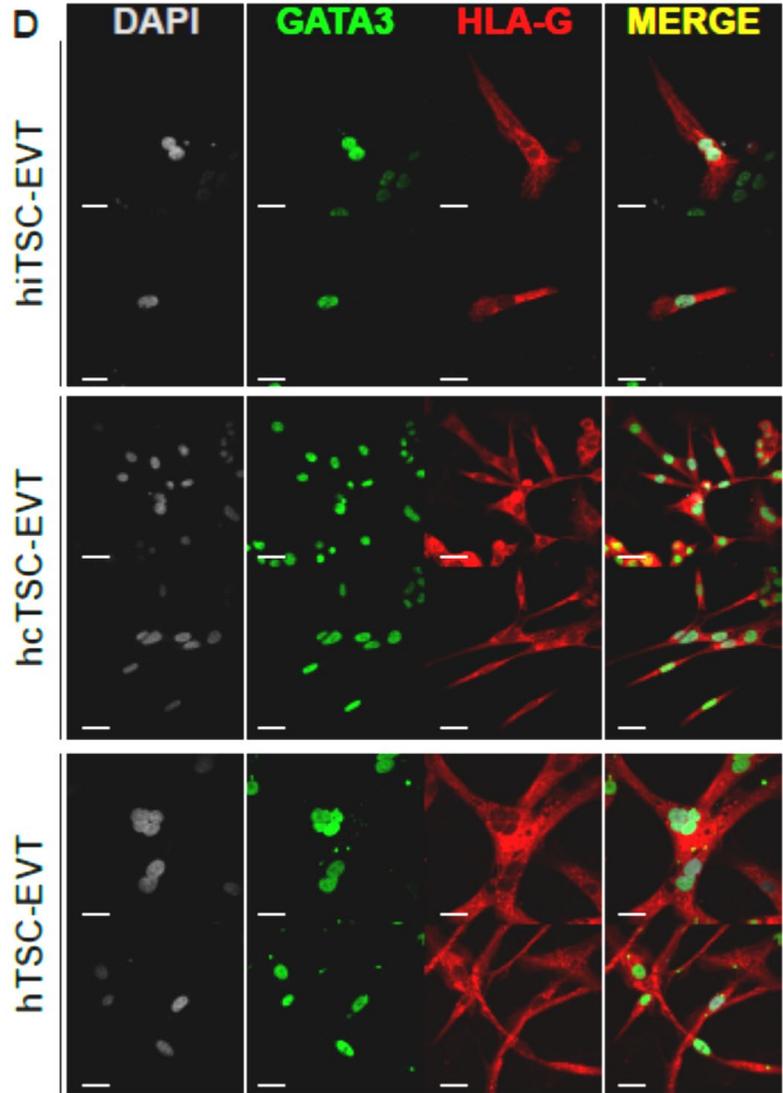
Looks like trophoblast stem cells

Pluripotent stem cells

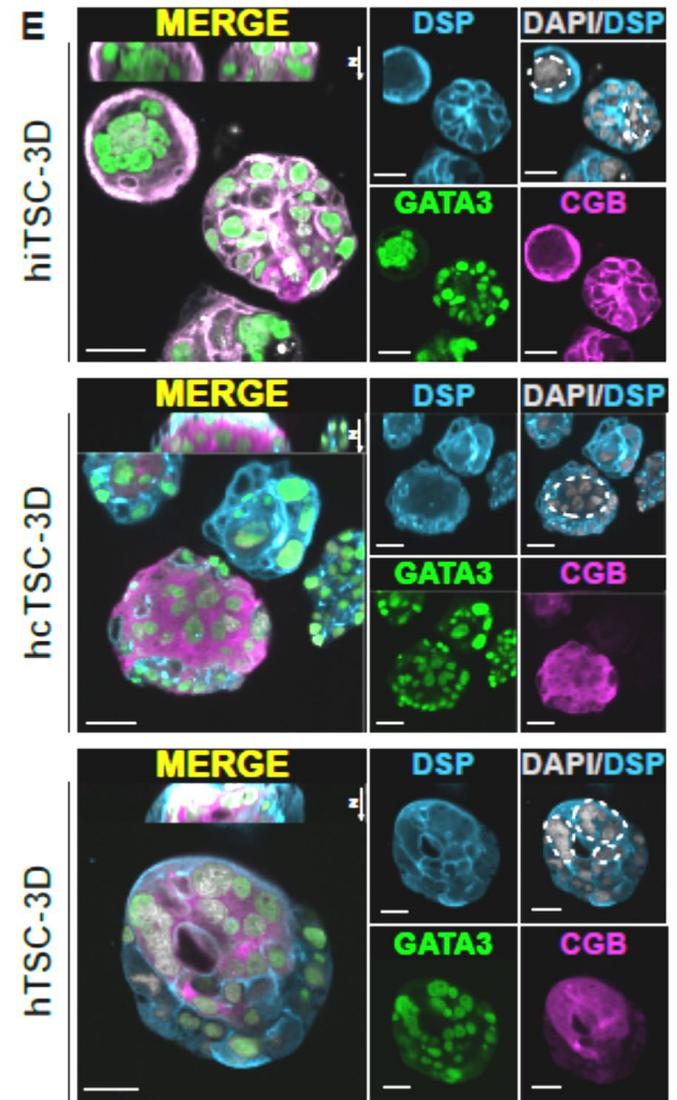
Generation of iTSC with OSKM



hiTSC can differentiate into EVT and ST

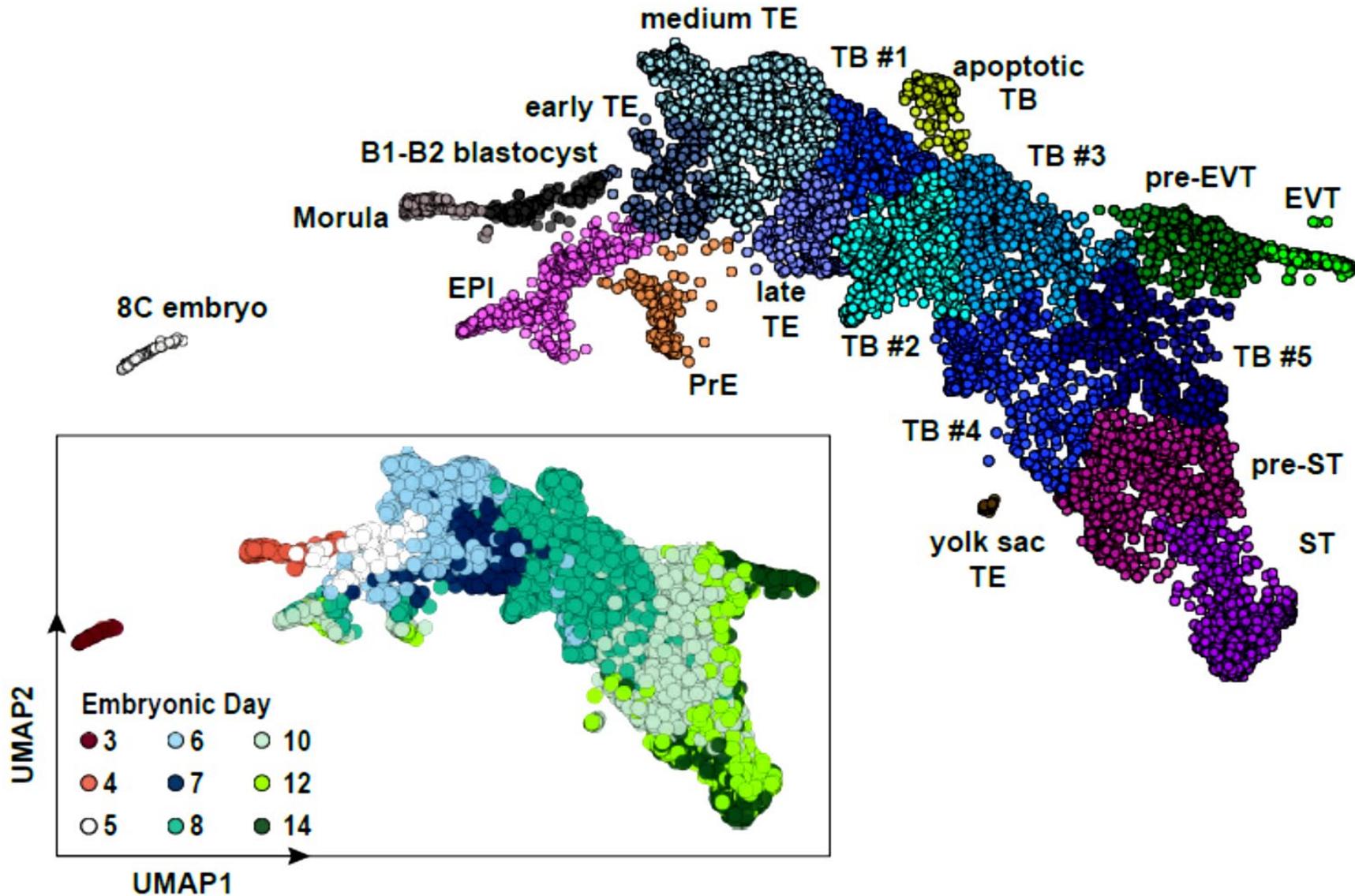


iTSCs can differentiate into either
ExtraVillous Trophoblast ...

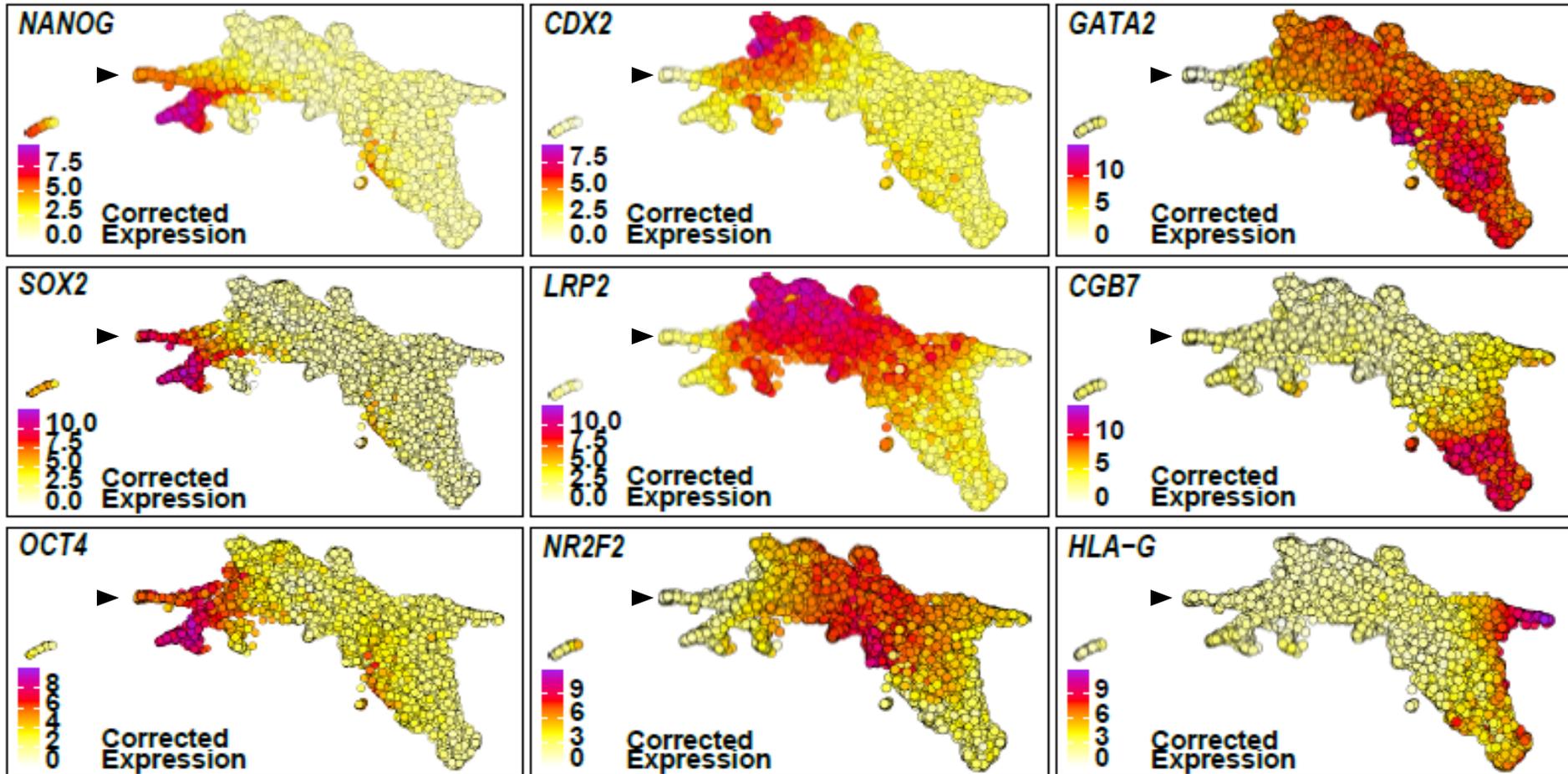


...or Syncytiotrophoblast

D3 – D14 human development transcriptomic analysis



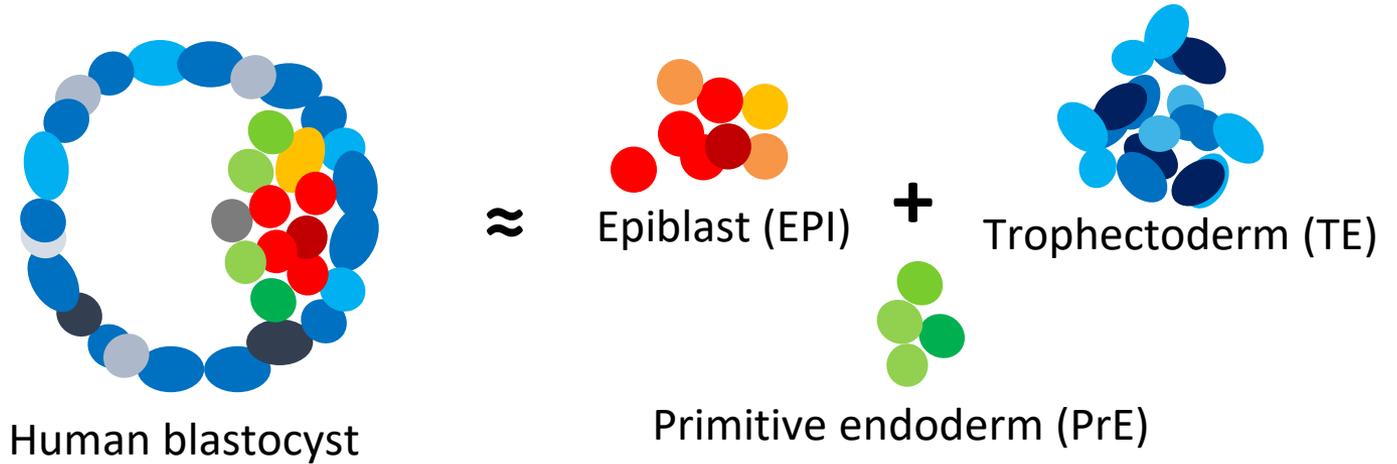
D3 – D14 human development transcriptomic analysis



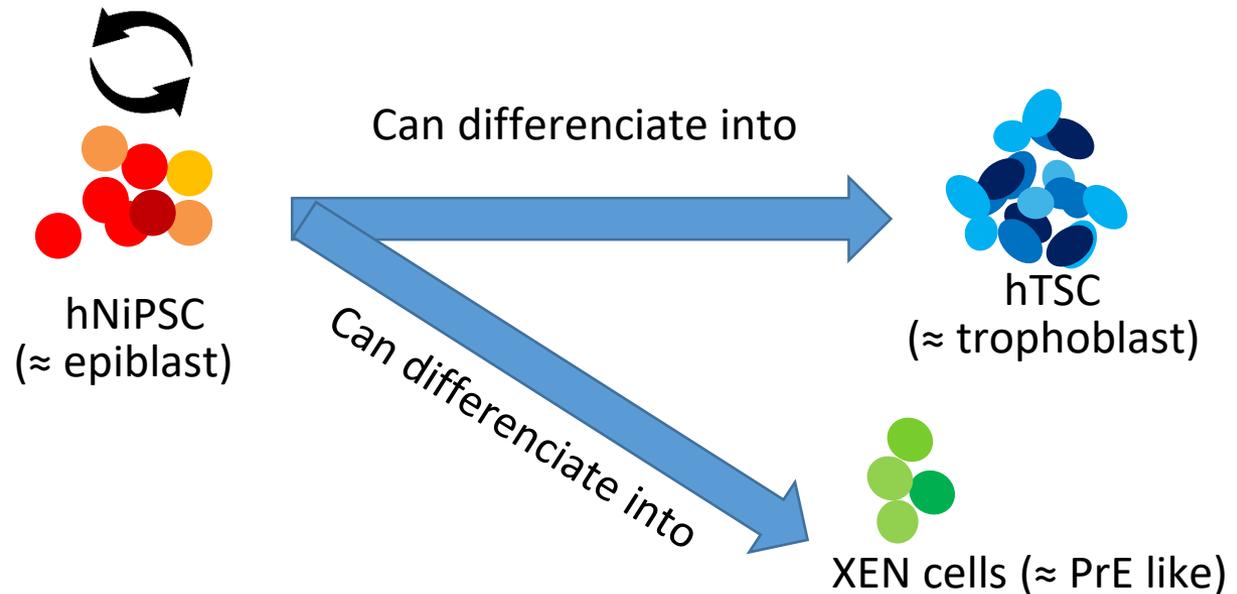
hi/cTSCs correspond
to day 8 cytotrophoblast

Naïve pluripotent stem cells modelize epiblast and can differentiate into trophoblast lineage

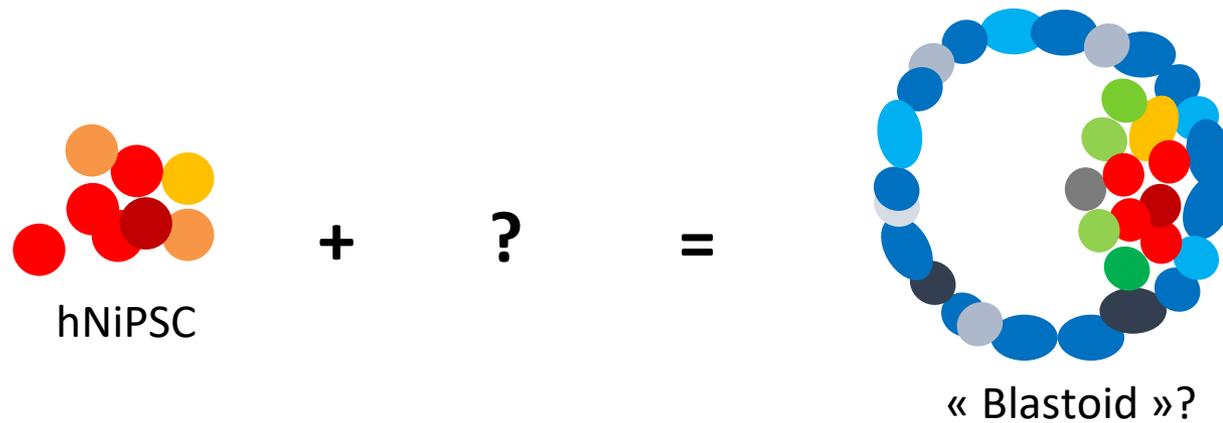
In vivo



In vitro



Is it possible to reform blastocyst-like structures with pluripotent stem cell ?



Self organisation of cellular models into embryo-like structure ?

Human blastoids modelize human embryo

Le Monde



Consulter
le journal

A. BRUNEAU ▾



ACTUALITÉS ▾

ÉCONOMIE ▾

VIDÉOS ▾

OPINIONS ▾

CULTURE ▾

M LE MAG ▾

SERVICES ▾



PLANÈTE • SCIENCES

Favoris ★

Partage



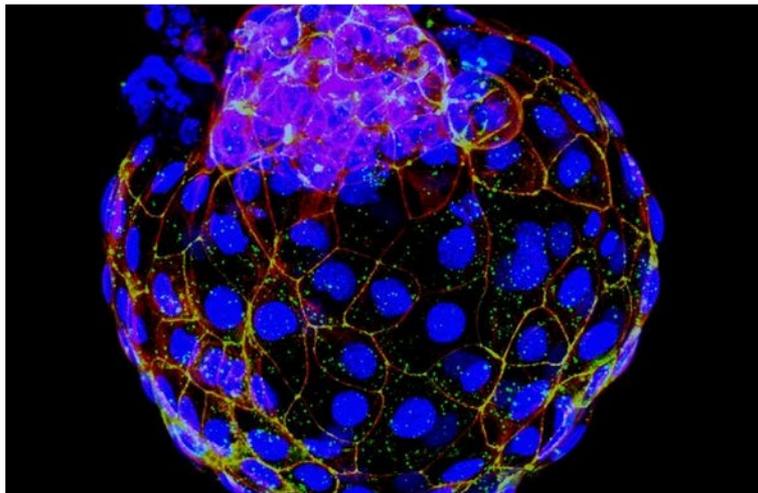
Des modèles d'embryons humains produits à partir de cellules souches

Deux laboratoires sont parvenus à créer, in vitro, des structures qui miment en partie l'architecture de très jeunes embryons humains. Ces blastoïdes posent déjà des questions éthiques.

Par Florence Rosier

Publié le 17 mars 2021 à 19h05 - Mis à jour le 19 mars 2021 à 08h24 - 🔊 Lecture 4 min.

🔒 Article réservé aux abonnés



Édition du jour

Daté du jeudi 1 avril

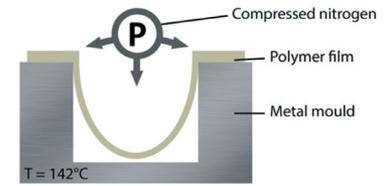


Lire le journal numérique

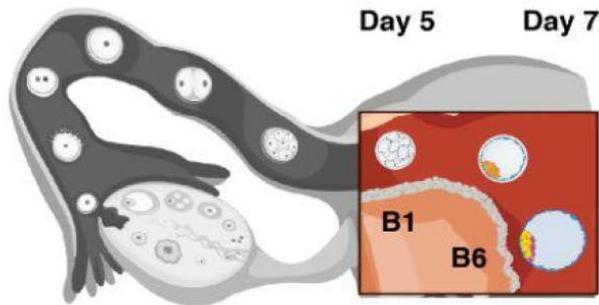
Les éditions précédentes

Human blastoids

a Micro-thermoforming process

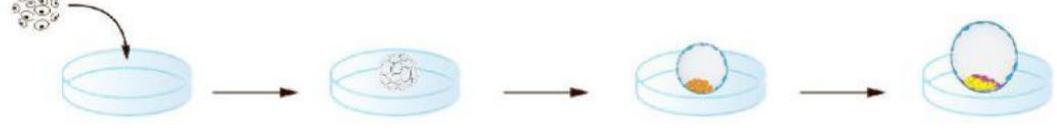


A Human preimplantation development



B Naive human pluripotent stem cells

PXGL cultures



Up to -1 day

0

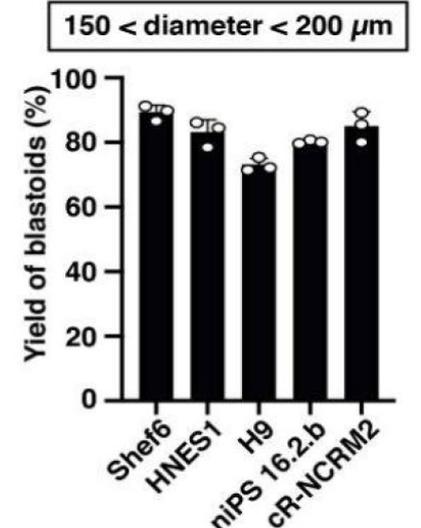
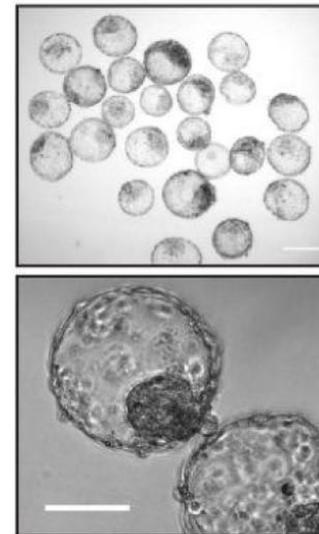
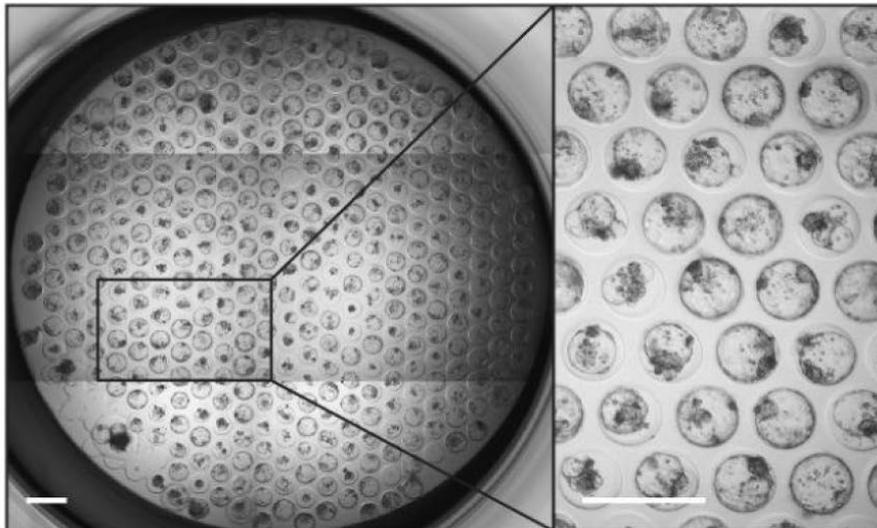
2

4

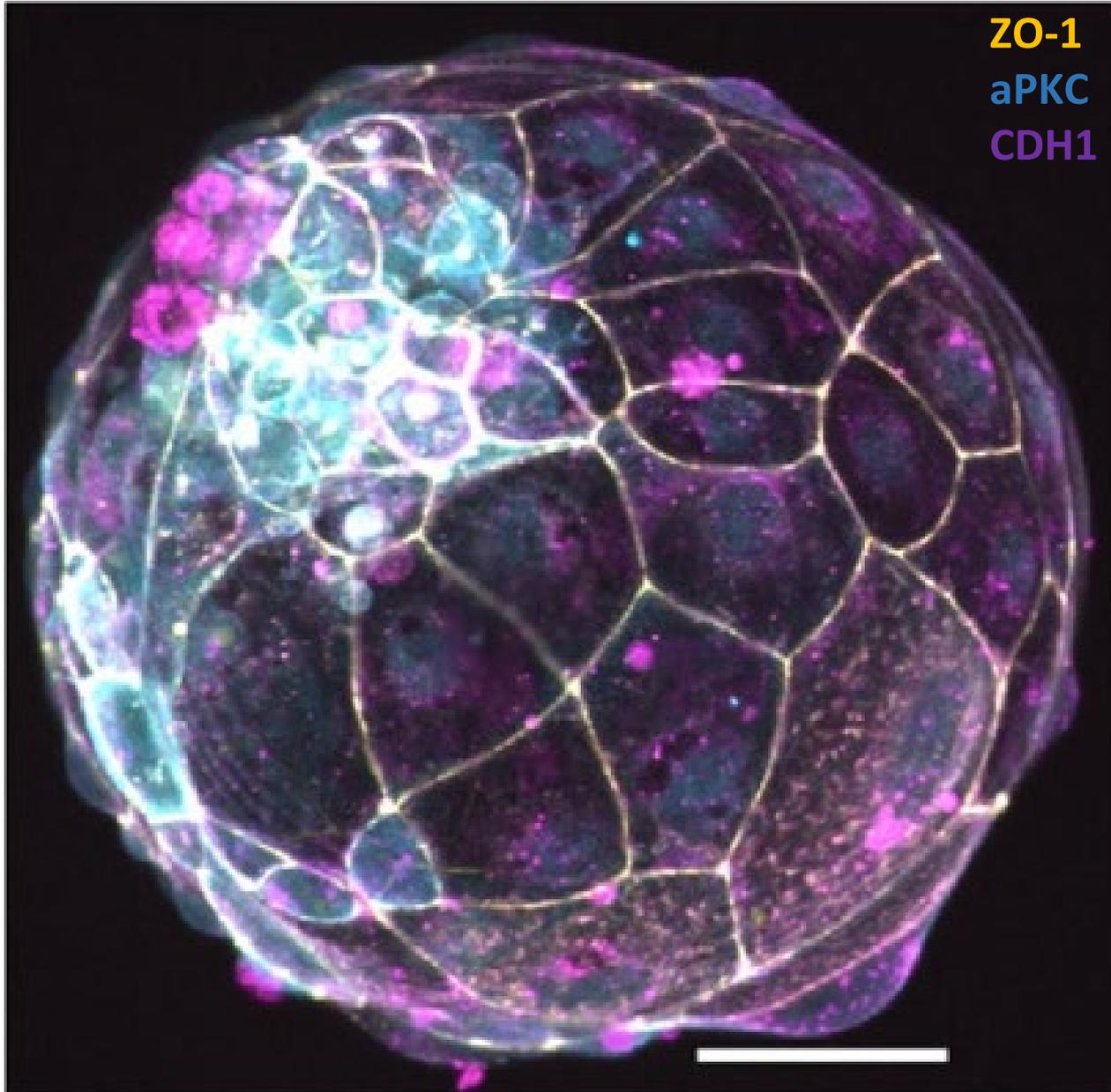
N2B27 + Y
Facultative (see *Methods*)

+ PALLY

+ LY



This is not a blastocyst



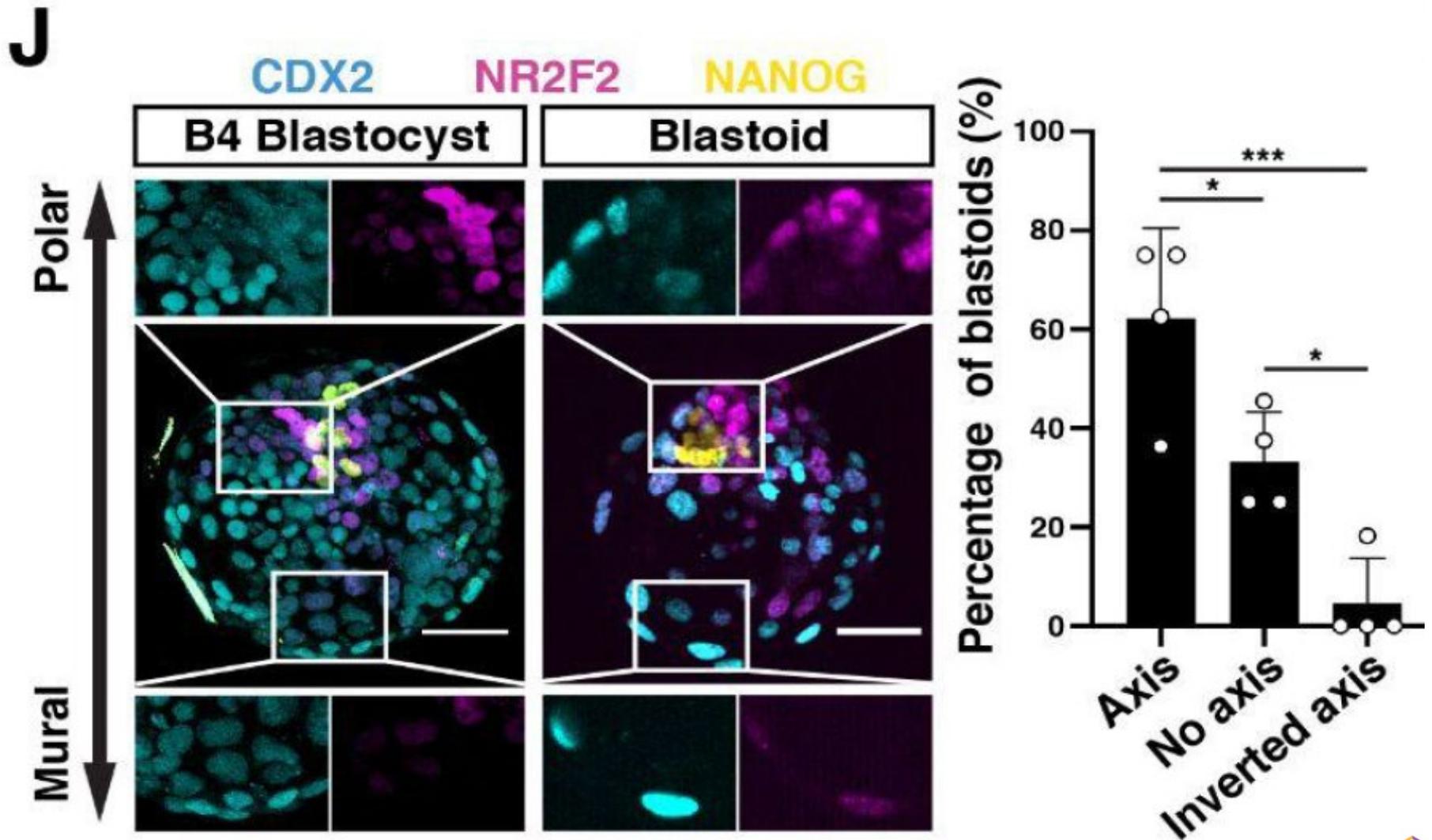
ZO-1

aPKC

CDH1

Kagawa et al.
Nature, 2021

Human blastoids recapitulates trophoctoderm maturation occurring in blastocyst

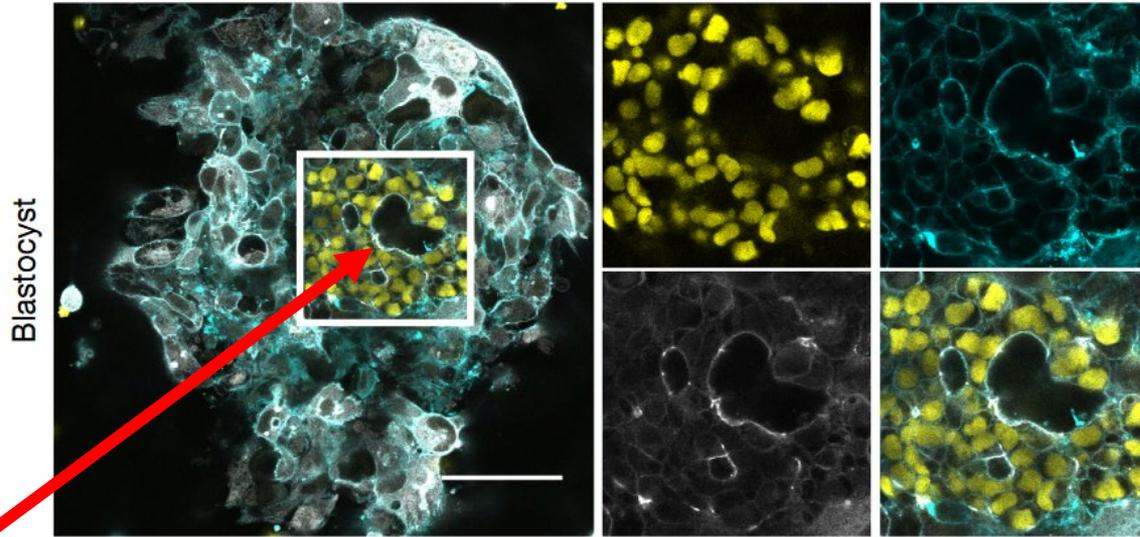


Human blastoids recapitulate implantation events occurring in *in vitro* cultured human embryos

g

OCT4 Phalloidin aPKC

Day10 human embryo

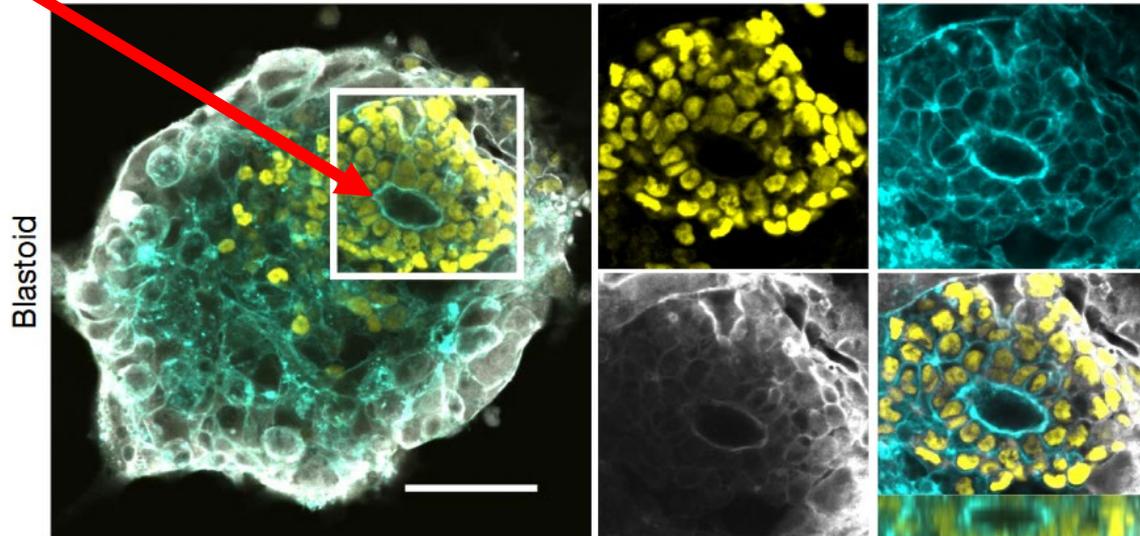


Blastocyst

Amniotic cavity !

OCT4 Phalloidin aPKC

« Day10 like » blastoid



Blastoid

f



Perspectives

Etude morphocinétique de l'embryon (ex :deep learning) :

- Faciliter la gradation des embryons (gain de temps, résultats uniformisés).
- Trouver des caractéristiques prédictives du potentiel de grossesse

Etude des lignées cellulaires dans l'embryon :

- Comprendre les mécanismes de régulation des lignées
- Identifier des **biomarqueurs de la qualité embryonnaire** sécrétés dans le milieu

«On détecte cette molécule dans le milieu, l'embryon a de fortes chances de s'attacher»

- Identifier des **régulateurs** des lignées cellulaires
- Modifier les milieux de culture des embryons avec ces **régulateurs** pour améliorer la survie et l'implantation de l'embryon (++ grossesses)

«En ajoutant cette molécule au milieu de culture, les embryons survivent mieux »

Acknowledgments



TEAM 2 / ART center

Paul Barrière
Alexandre Bruneau
Betty Bretin
Gael Castel
Julie Firmin
Valentin Francois-Campion
Thomas Fréour
Tristan Gomez
Stéphanie Kilens
Jenna Lammers
Sophie Loubersac
Dimitri Meistermann
Diego Moreno-Garcia
Constance Onfray
Arnaud Reigner

Actuellement

Anne Gaignerie (resp tech)
Caroline Chariou
Isabelle Leray
Elsa Lemaitre
Coline Rogue
Célia Courty

Magalie Feyeux
Philippe Hulin
Steven Nedellec

Audrey Bihouée
Eric Charpentier
Audrey Donnart



Tarjei Mikkelsen
Magali Soumillon



Jérémie Bourdon
Yohann Lelièvre

F. Lanner (Karolinska, Stockholm)
K. Niakan (Crick Institute, London)
J. Polo (Monash University, Melbourne)
H. Van de Velde (Universitair Ziekenhuis, Brussel)

Donations

Gedeon-Richter
MSD
Ferring Pharmaceuticals
Theramex
Genevrier



FDT20160435459

