



HAL
open science

The AlcoBrain program. Characterization of placental biomarkers of fetal brain defects after in utero alcohol exposure

Bruno Gonzalez

► To cite this version:

Bruno Gonzalez. The AlcoBrain program. Characterization of placental biomarkers of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. Rouen Université Inserm. 2022. <hal-03831201>

HAL Id: hal-03831201

<https://hal.science/hal-03831201v1>

Submitted on 26 Oct 2022

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

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



HAL Authorization

Projet ANR- 18-CE17-0002-01

The AlcoBrain program

Characterization of placental biomarkers of fetal brain defects after *in utero* alcohol exposure

Programme AAPG ANR 2018

A	IDENTIFICATION.....	2
B	RESUME CONSOLIDE PUBLIC	2
B.1	Résumé consolidé public en français	3
B.2	Résumé consolidé public en anglais.....	4
C	MEMOIRE SCIENTIFIQUE.....	7
C.1	Résumé du mémoire	7
C.2	Enjeux et problématique, état de l'art	8
C.3	Approche scientifique et technique.....	9
C.4	Résultats obtenus	10
C.5	Exploitation des résultats.....	11
C.6	Discussion	11
C.7	Conclusions.....	12
C.8	Références.....	12
D	LISTE DES LIVRABLES.....	13
E	IMPACT DU PROJET	14
E.1	Indicateurs d'impact	14
E.2	Liste des publications et communications.....	15
E.3	Liste des éléments de valorisation.....	17
E.4	Bilan et suivi des personnels recrutés en CDD (hors stagiaires) .	19

Ce document est à remplir par le coordinateur en collaboration avec les partenaires du projet. L'ensemble des partenaires doit avoir une copie de la version transmise à l'ANR.

Ce modèle doit être utilisé uniquement pour le compte-rendu de fin de projet.

A IDENTIFICATION

Acronyme du projet	AlcoBrain
Titre du projet	Caractérisation de biomarqueurs placentaires d'atteintes cérébrales fœtales lors d'une alcoolisation in utero
Coordinateur du projet (société/organisme)	Dr Bruno Gonzalez (Inserm U1245/Rouen Université)
Période du projet (date de début – date de fin)	1-12-2018 31-05-2022
Site web du projet, le cas échéant	

Rédacteur de ce rapport	
Civilité, prénom, nom	Dr Bruno Gonzalez
Téléphone	0235148547
Adresse électronique	bruno.gonzales@univ-rouen.fr
Date de rédaction	Août 2022

Si différent du rédacteur, indiquer un contact pour le projet	
Civilité, prénom, nom	
Téléphone	
Adresse électronique	

Liste des partenaires présents à la fin du projet (société/organisme et responsable scientifique)	<p><u>Partenaire 1</u> : Bruno Gonzalez, DR Inserm, U1245-Team 4, Université Rouen Normandie (coordonnateur).</p> <p><u>Partenaire 2</u> : Pr Stéphane Marret, Chef du Service de Pédiatrie Néonatale et Réanimation, Neuropédiatrie, CHR Charles Nicolle, Hôpitaux de Rouen.</p> <p><u>Partenaire 3</u> : Pr Sophie Gil, Inserm U1139, Université Paris Cité.</p> <p><u>Partenaire 4</u> : Pr Valérie Biran, Chef du Service de Néonatalogie et réanimation néonatale, Hôpital Robert-Debré, Paris.</p>
---	--

B RESUME CONSOLIDE PUBLIC

B.1 RESUME CONSOLIDE PUBLIC EN FRANÇAIS

Titre d'accroche du projet : Diagnostic précoce des troubles causés par l'alcoolisation fœtale

Titre 1 : Alcoolisation fœtale : placenta et troubles du développement cérébral de l'enfant

La consommation d'alcool au cours de la grossesse constitue une cause majeure de troubles du comportement et de handicap chez l'enfant. Sur la base de dysmorphies faciales caractéristiques, il est possible pour un clinicien d'établir un diagnostic néonatal du Syndrome d'Alcoolisation Fœtale (SAF). Toutefois, la plupart des nouveau-nés exposés *in utero* à l'alcool vont échapper à un diagnostic précoce en raison de l'absence de dysmorphies faciales. Nombre d'entre eux (1% des naissances) vont progressivement développer des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF ; troubles de l'attention, de l'apprentissage, hyperactivité...) dont le diagnostic est posé tardivement, souvent avec la

scolarisation. Plusieurs années de prise en charge par les équipes de santé sont alors perdues. Au cours de la dernière décennie, des avancées significatives ont permis d'établir un lien fonctionnel entre le placenta et le cerveau fœtal. En particulier, la communication placenta-cerveau fœtal, qui est impliquée dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale, est dérégulée par une exposition *in utero* à l'alcool. Une angiogenèse cérébrale normale étant un prérequis au neurodéveloppement correct de l'enfant, ces avancées ont ouvert la voie à l'identification d'une génération de biomarqueurs placentaires d'atteinte cérébrale fœtale pour un diagnostic précoce des enfants TCAF. L'objectif principal du programme AlcoBrain vise à l'identification et la validation fonctionnelle de biomarqueurs placentaires d'atteinte cérébrale suite à l'exposition *in utero* à l'alcool de l'enfant. Il associe les compétences de chercheurs académiques et de cliniciens.

Titre 2 : Le programme AlcoBrain : mise en œuvre d'une recherche translationnelle

Les objectifs spécifiques du programme AlcoBrain sont triples et visent (i) à démontrer les conséquences neurodéveloppementales d'une dysfonction placentaire, (ii) à rechercher l'impact de l'alcool sur les fonctions sécrétrices du placenta humain normal et pathologique et (iii) à valider la valeur diagnostique du/des biomarqueur(s) candidat(s). Pratiquement, le premier objectif est mené *in vitro* et *in vivo* par une démarche pré-clinique chez le rongeur en utilisant des approches de répression et surexpression géniques après électroporation placentaire *in utero*. L'analyse des placentas murins et des cerveaux fœtaux appariés est ensuite réalisée par des approches conventionnelles de biologie moléculaire et cellulaire. Le second objectif, à l'interface avec la clinique est mené par des approches de perfusion materno-fœtale de placentas humains exposés ou non *in utero* à l'alcool. Il requiert des techniques de culture d'explants couplés à des analyses de transcrits et protéomiques. Enfin, le dernier objectif est mis en œuvre au niveau clinique et consiste en l'établissement d'un protocole visant d'une part à doser les biomarqueurs candidats dans des extraits placentaires de deux groupes (Témoins et Alcool) et, d'autre part, à effectuer un suivi à 6 ans de la trajectoire développementale des enfants.

Résultats majeurs du projet

Chez l'Homme, le projet AlcoBrain a permis d'établir une caractérisation moléculaire et fonctionnelle des effets de l'alcool au niveau placentaire. L'analyse des données a permis d'identifier plusieurs facteurs placentaires dont le PIGF et le CD146 dérégulés par l'alcool et connus dans la littérature pour être impliqués dans le développement cérébral et le contrôle de l'angiogenèse. Il s'agit donc de très bons candidats biomarqueurs. Chez la Souris, les expériences de répression/surexpression géniques au niveau placentaire de certains de ces candidats a permis d'évaluer les conséquences neurodéveloppementales associées à une dysfonction placentaire induite par l'alcool. En particulier, les modèles précliniques ont permis de démontrer les conséquences d'une dérégulation de l'angiogenèse cérébrale sur la mise en place et la différenciation de deux populations cellulaires nerveuses, à savoir les interneurons GABAergiques et les oligodendrocytes. Enfin, le programme AlcoBrain a permis la mise en place du protocole clinique. L'analyse des données (dosage des biomarqueurs au niveau placentaire et au sang de cordon) est en cours et devra être corrélée avec le suivi des enfants qui lui s'inscrit dans la durée (jusqu'à l'âge de 6 ans). Le programme AlcoBrain a également contribué à i) l'intégration des partenaires au sein du GIS « Autisme et TND », ii) l'obtention de co-financements (Fondation de France, Région Normandie), iii) la réalisation de plusieurs conférences internationales et iv) l'émergence de deux nouveaux projets qui s'inscrivent dans la continuité de la thématique « Diagnostic précoce des TCAF ».

Production scientifique et brevets depuis le début du projet

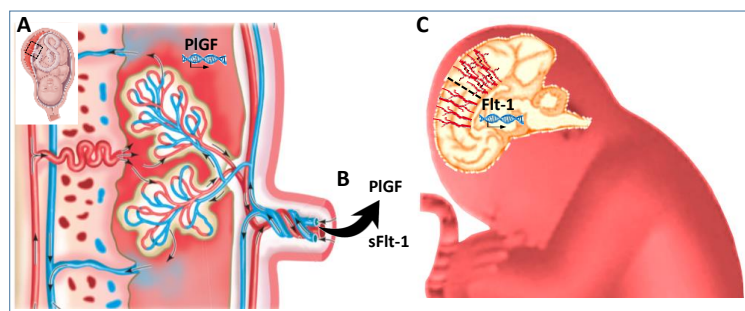
Ne pas mettre une simple liste mais faire quelques commentaires. Vous pouvez aussi indiquer les actions de normalisation

- Léger et al., *Cell Mol Life Sci*, 2020 : Première démonstration du rôle des microvaisseaux corticaux dans la migration radiale des interneurons GABAergiques
- Léger et al., *Neurobiol Dis*, 2020 : Première démonstration des effets de l'alcool sur l'activité vasculaire et sur la migration vasculo-associée des interneurons GABAergiques corticaux
- Marguet et al., *Acta Neuropathol Commun*, 2020 : Première transposition des données pré-cliniques chez l'humain et caractérisation des interneuropathies liées à l'alcoolisation fœtale

- Brosolo et al., *Neurobiol Dis*, 2022 : Première démonstration des effets de l'alcoolisation fœtale sur la migration vasculo-associée et la différenciation du lignage oligodendrocytaire
- Marguet et al., *Acta Neuropathol Commun*, 2022 : Première transposition chez l'Homme des effets de l'alcool sur la mise en place du lignage oligodendrocytaire cortical
- Savage et al., *Front Neurosci.*, 2020 : Valorisation d'une collaboration internationale sur Alcool et placenta/cerveau
- Sautreuil et al., *M/S*, 2019 : Revue de synthèse sur l'axe « placenta-cerveau » et l'exposition prénatale à l'alcool
- Sautreuil et al., *J Physiol, en révision* : Première démonstration de l'implication du facteur angiogénique CD146 dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale
- Dalmaso et al., *AJOG, soumis* : Première caractérisation protéomique et fonctionnelle des effets de l'alcool sur le trophoblaste humain
- Dalmaso et al., *Neurotoxicology and Teratology, soumis* : Revue de synthèse sur l'alcool et la physiopathologie placentaire

Commentaire du coordonnateur : Les détails de chaque publication sont mentionnés dans le paragraphe E.2.

Illustration



Synthèse graphique des effets de l'alcoolisation *in utero* sur l'angiogenèse cérébrale du fœtus et la dysfonction de l'axe placenta-cerveau. **A** : Chez l'Homme et le rongeur (Rat, Souris), le placenta est une source importante de facteurs angiogéniques tels que le PlGF. L'exposition *in utero* à l'alcool induit une réduction de l'expression du PlGF tant au niveau des transcrits que de la protéine. **B** : Le PlGF et son récepteur soluble sFlt-1 sont détectés au niveau du sang de cordon. Chez la Souris, du PlGF recombinant humain administré au niveau placentaire est rapidement véhiculé dans le cerveau fœtal alors que chez l'Homme, de faibles taux circulants de PlGF au niveau du sang de cordon sont associés à un retard de croissance du fœtus. **C** : L'effet de l'alcool sur l'expression du PlGF placentaire est impliqué dans les anomalies de l'angiogenèse cérébrale dont les conséquences neurodéveloppementales sont particulièrement mal connues. En accord avec l'Editeur, cette figure est issue de la revue publiée par les auteurs dans *Médecine/Sciences* (Sautreuil et al., 2019).

Informations factuelles

Le programme AlcoBrain est un projet de recherche translationnelle coordonné par le Dr Bruno Gonzalez. Il associe deux Services hospitaliers de pédiatrie néonatale et deux Laboratoires Inserm (U1139 et U1245). Le projet a commencé en décembre 2018 pour une durée initiale de 36 mois prolongée de 6 mois en raison de la crise du Covid19. Il a bénéficié d'une aide ANR de 376000 € pour un coût global de l'ordre de 909000 €.

B.2 RESUME CONSOLIDE PUBLIC EN ANGLAIS

Main title: Early diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders

Title 1: Fetal alcohol exposure: placenta and neurodevelopmental troubles of the child

Alcohol consumption during pregnancy is a major cause of behavioral disorders and disability. Based on typical facial features, it is possible for a clinician to make a neonatal diagnosis of Fetal Alcohol Syndrome (FAS). However, most infants exposed *in utero* to alcohol are late or even misdiagnosed due to the absence of facial traits. Moreover, many of them (up to 1% of births) will gradually develop Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASD) such as attention and learning deficits or hyperactivity. Therefore, diagnosis is frequently done with schooling and several years of clinical care are lost at a period (birth to 5 years) where brain plasticity is important. Over the last decade, significant advances have demonstrated a functional link between the placenta and the fetal brain. In particular, it has been evidenced that placenta is involved in the control of brain angiogenesis and that *in utero* exposure to alcohol dysregulates this process. As normal brain angiogenesis is a prerequisite for a correct neurodevelopment, these advances have paved the way for the identification of a new generation of placental biomarkers of fetal brain damage after prenatal alcohol exposure. The main objective of the AlcoBrain program is to identify and validate functional placental biomarkers of fetal brain damage for an early diagnosis of FASD. The AlcoBrain program combines skills of academic researchers and clinicians.

Title 2: The AlcoBrain program: development of a translational research

Specific objectives of the AlcoBrain program are threefold and aim (i) to demonstrate the neurodevelopmental consequences of placental dysfunction, (ii) to investigate the impact of alcohol on the secretion activity of the human placenta, and (iii) to validate the diagnostic value of candidate biomarker(s). Practically, the first objective was conducted *in vitro* and *in vivo* using gain and loss of function experiments in a mouse model of FASD. Experiments were conducted by placental *in utero* electroporation with CRISPR/Cas9 or dCAS9 plasmids. The analysis of placentas and their respective fetal brains was performed using conventional molecular and cellular biology approaches. The second objective, at the interface with clinic, was led by the technic of materno-fetal perfusion of human placentas exposed or not to alcohol during pregnancy. It required explant culture approaches coupled with transcripts and proteomics analyses. Finally, the last objective (still going on) was at the clinical level and consisted in the implementation of a clinical protocol. The protocol (still going on) is structured in two parts: (i) a biochemical validation of candidate biomarkers in placental extracts from controls and alcohol groups and (ii) a follow-up of the developmental trajectory of children up to 6 years.

Main results of the project

In human, the AlcoBrain project contributed to establish a molecular and functional characterization of the effects of alcohol on the placenta. In particular, results allowed to identify at least two placental factors (PIGF and CD146) which expression is impaired by prenatal alcohol exposure and that are known in the literature to be involved in brain development and in the control of angiogenesis. So these factors are very good biomarker candidates of alcohol-induced neurodevelopmental defects. In mouse, gain and loss of function experiments by *in utero* electroporation of CRISPR/Cas9/dCas9 plasmids at the placenta level have assessed the neurodevelopmental consequences associated with alcohol-induced placental dysfunction. These preclinical models have demonstrated the consequences of a deregulation of cerebral angiogenesis on the establishment and differentiation of two nerve cell populations, namely the GABAergic interneurons and the oligodendrocytes. Finally, the AlcoBrain program enabled the implementation of a clinical protocol which consists in quantifying levels of the biomarker candidates in the human placenta and in the fetal blood. The analysis of the data is currently in progress and they'll have to be correlated with the developmental trajectory of the children (up to 6 years). The AlcoBrain program has also contributed i) to the integration of partners within the GIS «Autism and TND», ii) to get additional funding (Fondation de France, Région Normandie), iii) to participate at several international conferences and iv) to promote the emergence of new projects in line with the theme "Early diagnosis of FASD".

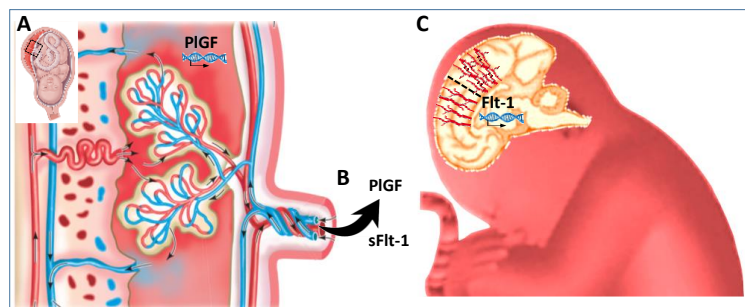
Scientific production from the beginning of the project

- Léger et al., *Cell Mol Life Sci*, 2020 : First demonstration of the contribution of cortical microvessels on the radial migration of GABAergic interneurons.

- Léger et al., *Neurobiol Dis*, 2020 : First demonstration that prenatal alcohol exposure impairs the endothelial activity of cortical microvessels resulting in ectopic migration and positioning of cortical interneurons.
- Marguet et al., *Acta Neuropathol Commun*, 2020 : First transposition of pre-clinical data to human regarding the characterization of fetal alcohol-related interneuropathies.
- Brosolo et al., *Neurobiol Dis*, 2022 : First demonstration of the effect of prenatal alcohol exposure on the vessel-associated migration and differentiation of oligodendrocytes.
- Marguet et al., *Acta Neuropathol Commun*, 2022 : First transposition of pre-clinical data to human regarding the positioning and differentiation of cortical oligodendrocytes.
- Savage et al., *Front Neurosci.*, 2020 : Publication valuing an international collaboration on the topic “prenatal alcohol exposure and dysfunction of the placenta/brain axis”.
- Sautreuil et al., *M/S*, 2019 : Review on the topic “prenatal alcohol exposure and dysfunction of the placenta/brain axis”.
- Sautreuil et al., *J Physiol*, *under review*: First demonstration of the involvement of placental CD146 in the control of cortical angiogenesis.
- Dalmaso et al., *AJOG*, *submitted*: First proteomic and functional characterization of the effects of alcohol on the human trophoblast.
- Dalmaso et al., *Neurotoxicology and Teratology*, *submitted*: Review on the effects of alcohol on the placental pathophysiology.

Comment of the coordinator: Details on these publications are provided in the E.2 section.

Illustration



Graphical abstract summarizing the effects of alcohol consumption during pregnancy on the dysfunction of the placenta-brain axis and its consequences in term of fetal brain angiogenesis. A: In humans and rodents (Rat, Mice), the placenta is an important source of angiogenic factors such as PIGF. *In utero* exposure to alcohol induces a reduction of the expression of PIGF (transcripts and protein). **B:** PIGF and its soluble Flt-1 receptor are detected in umbilical cord blood. In mice, recombinant human PIGF administered at the placenta level is rapidly transferred to the fetal brain while in humans, low circulating levels of PIGF in umbilical cord blood are associated with fetal growth retardation. **C:** The effect of alcohol on placental PIGF expression is associated with impaired cortical angiogenesis which neurodevelopmental consequences are poorly characterized. This figure has been modified from the Review published in *Médecine/Sciences* (Sautreuil et al., 2019). The Editorial board of *Médecine/Sciences* previously gave its agreement.

Factual information

The AlcoBrain program is a translational research project coordinated by Dr Bruno Gonzalez. It associates two departments of neonatal pediatric (Charles Nicolle Hospital, Rouen and Robert Debré Hospital, Paris) and two Inserm research units (U1139, Paris and U1245, Rouen). The project began in December 2018 for an initial duration of 36 months extended by 6 months due to the Covid19 pandemic. It received from ANR a financial support of €376,000 for a total cost of around €909,000.

C MEMOIRE SCIENTIFIQUE EN FRANÇAIS

Mémoire scientifique confidentiel : non

C.1 RESUME DU MEMOIRE

Etat de l'art et hypothèse de travail. La consommation d'alcool au cours de la grossesse constitue une cause majeure de troubles du comportement et de handicap chez l'enfant. Sur la base de dysmorphies faciales caractéristiques, il est possible pour un clinicien d'établir un diagnostic néonatal du Syndrome d'Alcoolisation Fœtale (SAF). Toutefois, la plupart des nouveau-nés exposés *in utero* à l'alcool vont échapper à un diagnostic précoce en raison de l'absence de dysmorphies faciales. Nombre d'entre eux vont progressivement développer des troubles causés par l'alcoolisation fœtale ou TCAF (troubles de l'attention, de l'apprentissage, hyperactivité...) dont le diagnostic est posé tardivement, souvent avec la scolarisation. Plusieurs années de prise en charge par les équipes de santé sont alors perdues. Au cours de la dernière décennie, des avancées significatives ont permis d'établir un lien fonctionnel entre le placenta et le cerveau fœtal. En particulier, la communication placenta-cerveau fœtal est dérégulée par une exposition *in utero* à l'alcool et se traduit par une altération de l'angiogenèse cérébrale. Compte-tenu qu'une angiogenèse cérébrale normale constitue un prérequis à un bon neurodéveloppement de l'enfant, ces avancées ont ouvert la voie à l'identification d'une génération de marqueurs placentaires d'atteinte cérébrale pour le diagnostic précoce des enfants TCAF. L'objectif principal du programme AlcoBrain vise donc à l'identification et la validation fonctionnelle de biomarqueurs placentaires d'atteinte cérébrale suite à une exposition *in utero* à l'alcool de l'enfant. Il associe les compétences de chercheurs académiques et de cliniciens.

Mise en œuvre du projet. Les objectifs spécifiques du programme AlcoBrain sont triples et visent (i) à démontrer les conséquences neurodéveloppementales d'une dysfonction placentaire, (ii) à rechercher l'impact de l'alcool sur les fonctions sécrétrices du placenta humain normal et pathologique et (iii) à valider la valeur diagnostique du/des biomarqueur(s) candidat(s). Pratiquement, le premier objectif est mené *in vitro* et *in vivo* par une démarche pré-clinique chez le rongeur en utilisant des approches de répression et surexpression géniques après électroporation placentaire *in utero*. L'analyse des placentas murins et des cerveaux fœtaux appariés est ensuite réalisée par des approches conventionnelles de biologie moléculaire et cellulaire. Le second objectif, à l'interface avec la clinique est mené par des approches de perfusion materno-fœtale de placentas humains exposés ou non à l'alcool. Il requiert des techniques de culture d'explants couplés à des analyses de transcrits et protéomiques. Enfin, le dernier objectif est mis en œuvre au niveau clinique et consiste en l'établissement d'un protocole visant d'une part à doser les biomarqueurs candidats dans des extraits placentaires de deux groupes (Témoins et Alcool) et, d'autre part, à effectuer un suivi de la trajectoire développementale des enfants à 6 ans.

Résultats marquants du projet. Chez l'Homme, le projet AlcoBrain a permis d'établir une caractérisation moléculaire et fonctionnelle précise des effets de l'alcool sur le placenta humain. L'analyse des données a permis d'identifier plusieurs facteurs placentaires dérégulés par l'alcool et connus dans la littérature pour être impliqués dans le développement cérébral. Il s'agit donc de très bons candidats biomarqueurs. Chez la Souris, les expériences de répression/surexpression génique au niveau placentaire de deux candidats biomarqueurs a permis d'évaluer les conséquences neurodéveloppementales associées à une dysfonction placentaire induite par l'alcool. En particulier, ces modèles précliniques ont permis de démontrer les conséquences d'une dérégulation de l'angiogenèse cérébrale sur la mise en place et la différenciation de deux populations cellulaires nerveuses, à savoir les interneurons GABAergiques et les oligodendrocytes. Enfin, le programme AlcoBrain a permis la mise en place d'un processus de transposition chez l'humain avec la finalisation d'un protocole clinique dont l'analyse des données est en cours et devra être corrélée avec le suivi des enfants qui lui s'inscrit dans la durée (jusqu'à l'âge de 6 ans). Le programme AlcoBrain a également contribué à l'intégration des partenaires au sein du GIS « Autisme et TND », à l'obtention de co-financements (Fondation de France, Région Normandie), à 6 publications originales acceptées et 2 en révision, 2 revues, 4 communications orales internationales et plusieurs nationales, à la soutenance de 4 thèses et à l'émergence de deux nouveaux projets qui s'inscrivent dans la continuité de la thématique « Diagnostic précoce des TCAF ».

En conclusion, hormis les avancées significatives obtenues au niveau scientifique, le projet AlcoBrain a favorisé des interactions durables et fructueuses entre les partenaires qui souhaitent poursuivre les

collaborations initiées et a favorisé une structuration nationale. De plus, les publications d'ores et déjà parues se sont traduites par une ouverture à l'international avec plusieurs présentations orales récentes.

C.2 ENJEUX ET PROBLEMATIQUE, ETAT DE L'ART

L'alcoolisation fœtale, un enjeu de santé publique

Le rapport de l'OMS parus en 2018 a révélé que l'alcool constitue la première cause de décès sur l'ensemble de la population mondiale.¹ A titre de comparaison, l'action de l'alcool sur la mortalité est plus importante que celles du sida, de la tuberculose et de la violence réunies.¹ Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux nouveau-nés, les méfaits de l'alcool demeurent gravissimes. Ainsi, la consommation d'alcool au cours de la grossesse (alcoolisation fœtale) est la première cause de handicap et notamment de retard mental et de troubles comportementaux d'origine non génétique dans le monde mais également en France. Il est d'ailleurs important de constater que l'alcoolisation fœtale n'est pas restreinte aux pays les plus pauvres mais qu'elle touche également les pays industrialisés. A titre d'exemple, 2 à 5 % des enfants nés en Amérique du nord sont concernés par une alcoolisation anténatale sévère.² Ainsi, les coûts annuels de prise en charge et de réinsertion sociale évalués pour les USA en 2014 sont énormes et ont été chiffrés à 4 milliards de dollars.² En France, la prévalence du syndrome d'alcoolisation fœtale ou SAF (l'atteinte la plus sévère) est estimée entre 1 et 2 % dans sa forme complète.³

Commentaire du coordonnateur : Ces données sont à la fois élevées et sous-estimées ; « élevées » car elles concernent une population jeune dont le suivi médical, éducatif et social sera long. Ainsi, 43 % des enfants américains exposés in utero à l'alcool sont exclus du système scolaire, 70 % interrompent leur scolarité.⁴ « Sous-estimées » car s'il est aisé pour un clinicien d'établir le diagnostic des formes les plus sévères (SAF), un nombre important d'enfants échappe à un diagnostic précoce néonatal. En effet, contrairement aux enfants « SAF » qui présentent des dysmorphies faciales caractéristiques, la majorité des enfants atteints de troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF) en sont dépourvus.

Devenir à moyen et à long termes des enfants TCAF

La plupart des enfants TCAF ne présentent pas les anomalies morphologiques des enfants SAF ce qui compromet un diagnostic précoce, mais ces enfants vont présenter des atteintes qui se révéleront avec l'enfance, lors de la période de scolarisation, et qui seront indubitablement délétères au cours de leur vie d'adulte.^{5,6} Ainsi, les déficiences sur le système nerveux central vont à moyen terme se traduire par des troubles du comportement, des fonctions cognitives telles que des déficits dans l'apprentissage de la lecture, du langage ou encore de la mémoire.⁵ Ces incapacités/handicaps sont fréquemment décelé(e)s avec la scolarisation alors que des mois précieux de prise en charge auraient pu être valorisés au cours des premières années de vie. Ces déficits vont à plus long terme être associés à des inaptitudes sociales, professionnelles et familiales.⁴ Le devenir de ces enfants et leur insertion professionnelle sont donc sérieusement hypothéqués.

Commentaire du coordonnateur : Le lien entre les atteintes neurodéveloppementales et l'apparition des troubles étant plus que probable, identifier précocement les atteintes faciliterait l'identification des enfants à risque de développer des troubles associés aux TCAF. Une prise en charge précoce constituerait un progrès à la fois médical, social et économique.

Dépistage précoce : un gage de meilleure prise en charge

Le cerveau est un organe extrêmement plastique qui suite à une lésion peut, lorsqu'il est stimulé, compenser une partie des atteintes subies. Ce processus est perceptible chez les adultes ayant souffert d'un accident vasculaire cérébral (AVC) où, selon la sévérité des lésions, une récupération motrice et cognitive pourra être constatée. Chez le nourrisson, le cerveau est encore très immature à la naissance et la plasticité (et donc le potentiel de récupération) plus élevée que chez l'adulte. Ainsi, des études réalisées dans le cadre de pathologies autres que le SAF comme, par exemple, l'autisme, ont montré qu'une prise en charge précoce accroissait significativement les progrès de l'enfant.^{7,8} Cette prise en charge va notamment consister à stimuler les fonctions motrices ou encore sensorielles et cognitives de l'enfant. Par conséquent, plus un trouble du développement ou une atteinte cérébrale aura été décelé(e) précocement, plus efficace pourrait être la prise en charge. Compte tenu de ces éléments, il apparaît essentiel d'améliorer le dépistage précoce des enfants TCAF.

Le placenta, un organe mixte source de facteurs pro-angiogéniques

Le placenta est un organe transitoire dont les multiples fonctions endocrines et immunomodulatrices contribuent au bon développement du fœtus.⁹ Ainsi, des hormones peptidiques telles que l'hormone de

croissance placentaire (PGH) ou l'hormone lactogène placentaire (hPL) peuvent être sécrétées et vont contribuer à la croissance fœtale.¹⁰ Des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGFA sont également synthétisés par le placenta et, en particulier, le PlGF, un membre de la famille du VEGFA, est très fortement exprimé par différents types cellulaires tels que les trophoblastes et les cellules endothéliales fœtales.^{11,12} Alors que les études de transcrits ou protéiques indiquent que le PlGF est peu exprimé dans le système nerveux central, son unique récepteur, le VEGFR1/Flt-1 est, quant à lui, fortement exprimé au niveau cérébral et existe également sous une forme circulante.¹³⁻¹⁵ Sur la base de ces éléments, la contribution de facteurs pro-angiogéniques d'origine placentaire dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale de l'enfant est devenue une hypothèse plausible.

Alcoolisation fœtale et anomalies de l'angiogenèse cérébrale

Au cours du développement, le système nerveux central acquiert sa vascularisation par angiogenèse, un processus physiologique défini comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants.¹⁶ Les mécanismes moléculaires de l'angiogenèse sont complexes et mettent en jeu plusieurs familles de protéines telles que les systèmes VEGFs/VEGFR. Ils impliquent également des protéases de la matrice extracellulaire telles que les MMPs ou encore des protéines d'adhésion telles que les sélectines ou les intégrines.¹⁷ Toutefois, bien que de très nombreuses études se soient intéressées aux effets de l'alcoolisation *in utero* sur les processus de neurogenèse, de gliogenèse, de différenciation ou de survie cellulaire,¹⁸ ce n'est que plus récemment que certains groupes de recherche ont exploré la contribution possible d'une composante endothéliale dans les atteintes cérébrales décrites chez les enfants exposés *in utero* à l'alcool.^{15,19} Ainsi, en 2012, une première étude révélait chez l'Homme et la Souris qu'une exposition prénatale à l'alcool induisait au niveau cérébral une désorganisation importante des microvaisseaux corticaux se traduisant par la perte de leur orientation radiale.¹⁹ Cette anomalie de l'angiogenèse cérébrale était associée à une diminution importante de l'expression du récepteur Flt-1. Ainsi, la dérégulation de l'expression placentaire du PlGF, d'une part, et les anomalies corticales de l'angiogenèse cérébrale et du Flt-1 observées dans le cerveau fœtal, d'autre part, laissent suspecter l'existence d'un axe fonctionnel « placenta-cerveau » impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale et pouvant être dérégulé chez les enfants exposés *in utero* à l'alcool.

Hypothèses du programme de recherche

Compte-tenu de ces éléments, le programme de recherche repose sur les trois hypothèses suivantes :

- Il existe une interaction fonctionnelle entre les facteurs angiogéniques d'origine placentaire et le contrôle de l'angiogenèse cérébrale fœtale,
- Une désorganisation de la vascularisation cérébrale va impacter la mise en place des populations cellulaires nerveuses qui nécessitent une migration vasculo-associée (interneurones GABA, oligodendrocytes),
- L'identification de facteurs angiogéniques dont l'expression placentaire est dérégulée par l'alcoolisation *in utero* ouvre la voie à des biomarqueurs d'atteinte cérébrale

Objectifs spécifiques du programme de recherche

Ce programme de recherche est mené à la fois chez l'animal (Souris) et chez l'Homme par des approches précliniques et cliniques. Les travaux ont été mis en œuvre de façon à répondre aux objectifs spécifiques (OS) suivants :

OS1. Caractériser les conséquences neurodéveloppementales des anomalies de l'angiogenèse cérébrale induites par une alcoolisation *in utero* en ciblant deux populations cellulaires, les interneurones GABAergiques et les oligodendrocytes (Partenaires 1 et 2)

OS2. Caractériser les effets de l'exposition à l'alcool sur les fonctions sécrétrices placentaires en ciblant notamment les facteurs angiogéniques (Partenaires 1, 3 et 4)

OS3. Mettre en place un protocole clinique afin d'évaluer les effets de la consommation d'alcool au cours de la grossesse sur l'expression et les taux circulants de facteurs angiogéniques et notamment le PlGF et effectuer un suivi neurodéveloppemental des enfants jusqu'à l'âge de 6 ans (Partenaires 1, 2, 3 et 4)

C.3 APPROCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

Mise en œuvre OS1 : Cet objectif a été mené chez l'animal et chez l'humain. Chez l'animal, les expérimentations ont été conduites sur plusieurs lignées de souris (Gad67-GFP, Grin1^{lox}/VeCad^{Cre},...). Les repressions et/ou surexpressions géniques réalisées au niveau placentaire ont été effectuées par

électroporation *in utero* couplée à l'expression de plasmides CRISPR-Cas9 ou CRISPR-dCas9 ciblant les gènes candidats. L'analyse des tissus placentaires et cérébraux a été réalisée par des approches conventionnelles de biologie cellulaire et moléculaire. Une partie des résultats obtenus chez la Souris a été transposée à l'humain sur des coupes de placentas et de cortex (Pr A Laquerrière, U1245) ou sur des placentas frais (Pr S Gil, U1139) par des approches d'immunohistochimie et/ou de Western blot.

Mise en œuvre OS2 : Cet objectif a été mené chez l'humain. Il a reposé sur l'expertise du Partenaire 3 qui maîtrise les approches de mise en culture de cotylédons et de perfusion des placentas humains. Les travaux ont pu être réalisés sur des placentas contrôles et pathologiques (femmes ayant consommé de l'alcool au cours de leur grossesse). L'analyse des prélèvements a ensuite été menée par des approches de protéomique, Western blot, ELISA, immunohistochimie.

Mise en œuvre OS3 : Cet objectif a été mené chez l'humain. Un protocole clinique multicentrique a été mis en place et validé. Le dosage des facteurs placentaires candidats est mené par une approche multiplex sur des échantillons de placentas, de sang de cordon et de sang maternel. Parallèlement, un suivi de la trajectoire développementale des enfants est effectué par les équipes de soin (CHU de Rouen, Hôpital Robert Debré) jusqu'à l'âge de 6 ans.

C.4 RESULTATS OBTENUS

OS1. Caractériser les conséquences neurodéveloppementales des anomalies de l'angiogenèse cérébrale induites par une alcoolisation in utero en ciblant deux populations cellulaires, les interneurones GABAergiques et les oligodendrocytes

Concernant les interneurones, les travaux ont permis de démontrer que les neurones originaires des éminences ganglionnaires et intégrant le néocortex *via* de la route de migration piale utilisent les vaisseaux corticaux radiaux pour migrer. Leur déplacement est centripète depuis la zone piale vers les couches corticales II à IV. L'alcoolisation fœtale altère l'activité endothéliale et modifie notamment l'expression du récepteur NMDA endothélial et l'activation des metalloprotéinases. Il en résulte un mauvais positionnement des interneurones. Cette anomalie développementale est retrouvée chez l'Homme où nous avons pu mettre en évidence des interneuropathies.

Concernant les oligodendrocytes, nous avons mis en évidence que l'alcoolisation *in utero* altère la migration vasculo-associée des précurseurs oligodendrocytaires. En particulier, le profil de maturation est modifié avec une altération de la transition entre les stades pré-oligodendrocyte et oligodendrocyte immature. Cet effet se traduit par un déficit de myélinisation des fibres efférentes corticales. A nouveau, l'interaction avec les médecins a permis de mettre en évidence des résultats comparable chez le fœtus exposé à l'alcool. *Cette partie du projet a donné lieu à 6 publications originales parues (Léger et al., 2020a ; Léger et al., 2020b ; Marguet et al., 2020 ; Savage et al., 2020 ; Brosolo et al., 2022 ; Marguet et al., 2022).*

OS2. Caractériser les effets de l'exposition à l'alcool sur les fonctions sécrétrices placentaires en ciblant notamment les facteurs angiogéniques

Dans un premier temps, cette étude a permis d'établir une cartographie protéique et fonctionnelle de l'alcool sur le placenta humain et ainsi d'avancer la notion de Syndrome d'Alcoolisme Placentaire. Les approches protéomique, d'analyse de transcrits et de sécrétions ont notamment permis de montrer que des fonctions placentaires endocrines sont impactées par l'alcoolisation fœtale. En particulier, les modèles de trophoblastes en culture et d'explants villositaires ont révélé que la sécrétion de l'hCG, communément appelée « hormone de grossesse » est fortement augmentée par la consommation d'alcool chez la femme enceinte.

Dans un second temps, nous avons exploré le champ de la neuroplacentologie et avons établi un panel de gènes dérégulés par l'alcool au niveau placentaire et pour lesquels un rôle primordial dans le développement cérébral est connu. A titre d'exemple et, sans les citer pour des raisons de confidentialité, 26 récepteurs de neurotransmetteurs ont été identifiés comme dérégulés au niveau placentaires. Des études d'inactivations fonctionnelles dans un modèle murin ont été et vont être mises en œuvre pour les gènes les plus prometteurs afin d'étudier la contribution de ces facteurs placentaires dans les atteintes cérébrales du fœtus. *Cette partie du projet a donné lieu à 2 publications originales dont l'une est en révision (Sautreuil et al., 2022) et l'autre soumise (Dalmasso et al., 2022). Elle a*

également donné lieu à 2 revues dont l'une est parue (Sautreuil et al., 2019) et l'autre en révision (Dalmasso et al., 2022). Enfin, elle a donné lieu à un article de vulgarisation dans *Inserm Actualités*.

OS3. Mettre en place un protocole clinique afin d'évaluer les effets de la consommation d'alcool au cours de la grossesse sur l'expression et les taux circulants de facteurs angiogéniques et effectuer un suivi neurodéveloppemental des enfants jusqu'à l'âge de 6 ans

Un protocole multicentrique impliquant 5 centres d'inclusion des prélèvements (Brest, Caen, Le Havre, Robert-Debré et Rouen) a été mis en place. Il prévoit 2 groupes de sujets et de prélèvements (exposés et non exposés à l'alcool) avec des effectifs respectifs de 30 par groupe. Les inclusions des prélèvements (placenta, sang maternel, sang de cordon) ont été finalisées en mai 2021. Les dosages des facteurs candidats dont le PIGF ont été effectués et l'analyse des données est en cours au CHU de Rouen. Les résultats devront dans un second temps être corrélés avec le suivi à 6 ans des enfants. *Cette partie du projet s'inscrit sur un terme qui va au-delà du financement ANR compte-tenu du suivi des enfants par les équipes de santé.*

C.5 EXPLOITATION DES RESULTATS

OS1. Caractériser les conséquences neurodéveloppementales des anomalies de l'angiogenèse cérébrale induites par une alcoolisation in utero en ciblant deux populations cellulaires, les interneurones GABAergiques et les oligodendrocytes. Les travaux menés dans le cadre de l'axe OS1 ont donné lieu à 6 publications originales, 4 communications orales internationales, 4 communications orales nationales, 2 co-financements et 2 soutènements de thèse. Ils ont contribué en 2019 à l'extension au niveau européen (EP3548060) du brevet FR3059550.

OS2. Caractériser les effets de l'exposition à l'alcool sur les fonctions sécrétrices placentaires en ciblant notamment les facteurs angiogéniques. Les travaux menés dans le cadre de l'axe OS2 ont donné lieu à 2 publications originales, 4 communications orales nationales et 1 soutènement de thèse.

OS3. Mettre en place un protocole clinique afin d'évaluer les effets de la consommation d'alcool au cours de la grossesse sur l'expression et les taux circulants de facteurs angiogéniques et effectuer un suivi neurodéveloppemental des enfants jusqu'à l'âge de 6 ans. Les travaux menés dans le cadre de l'axe OS3 ont donné lieu à la mise en place effective d'un protocole clinique dont les données sont en cours d'analyse et devront être corrélés au suivi des enfants à 6 ans. Suivi qui, *de facto*, s'étend au-delà de la durée du financement ANR. L'ANR et l'ensemble des partenaires devront être associés à l'analyse et la valorisation des données cliniques.

C.6 DISCUSSION

Degré de réalisation des objectifs initiaux : Les travaux menés dans le cadre des objectifs spécifiques OS1 et OS2 et concernant respectivement les approches pré-cliniques et les études fonctionnelles sur le placenta humain ont permis l'aboutissement des livrables scientifiques initialement envisagés (voir Tableau, section D, liste des livrables). Ils se sont également traduits par une valorisation sous la forme de publications, de soutènements de thèse, de communications orales internationales et par une structuration collaborative notamment au travers du GIS « Autisme et Troubles du NeuroDéveloppement ». Les travaux menés dans le cadre du protocole clinique (objectif spécifique OS3) se sont concrétisés par l'inclusion effective des prélèvements et des patients dont l'analyse et le suivi sont en cours.

Degré de validation des hypothèses de travail: A ce jour, deux des trois hypothèses initialement avancées semblent avérées à savoir : *i)* il existe une interaction fonctionnelle entre les facteurs angiogéniques d'origine placentaire et le contrôle de l'angiogenèse cérébrale fœtale et *ii)* une désorganisation de la vascularisation cérébrale va impacter la mise en place de certaines populations cellulaires nerveuses qui nécessitent une migration vasculo-associée.

Verrou identifié : Un atout majeur du projet AlcoBrain réside dans le fait que la plupart des travaux ont pu être menés en parallèle chez l'animal et chez l'humain. La forte interaction entre chercheurs et cliniciens a donc permis de renforcer fortement le caractère transposable des résultats pré-cliniques vers la clinique. Toutefois, la validation du dernier objectif à savoir « la démonstration de la valeur diagnostique de marqueurs placentaires en pratique clinique » reste assujéti à la finalisation des

analyses du protocole clinique et du suivi des enfants. Les effectifs des inclusions (30 par groupe) pourraient constituer un verrou en termes de puissance statistique.

Élargissements possibles et perspectives ouvertes par le projet : Les données obtenues dans le modèle murin confrontées à celles obtenues au niveau du placenta humain ont permis d'identifier de nouveaux facteurs placentaires candidats dont l'implication dans les désordres neurovasculaires du cerveau fœtal va devoir être démontrée. Par ailleurs, les dérégulations observées en termes de transcrits suggèrent un mode d'action épigénétique de l'alcool sur l'axe placenta-cerveau. Cet élargissement a ouvert une nouvelle voie de recherche dans la compréhension des modes d'action de l'alcool sur la dysfonction placentaire et le neurodéveloppement. Un nouveau projet de recherche collaboratif est envisagé.

C.7 CONCLUSIONS

En conclusion, hormis les avancées significatives obtenues au niveau scientifique, le projet AlcoBrain a permis d'établir des interactions durables entre les partenaires qui souhaitent poursuivre les collaborations initiées. Il a également contribué à l'identification de nouveaux partenaires nationaux et internationaux avec lesquels de nouveaux projets collaboratifs sont en cours de maturation. Enfin, il a contribué à une structuration au niveau national en permettant aux équipes associées au projet d'intégrer le GIS « Autisme et TND » et d'échanger avec d'autres Laboratoires sur la thématique « Alcoolisation fœtale ».

C.8 REFERENCES

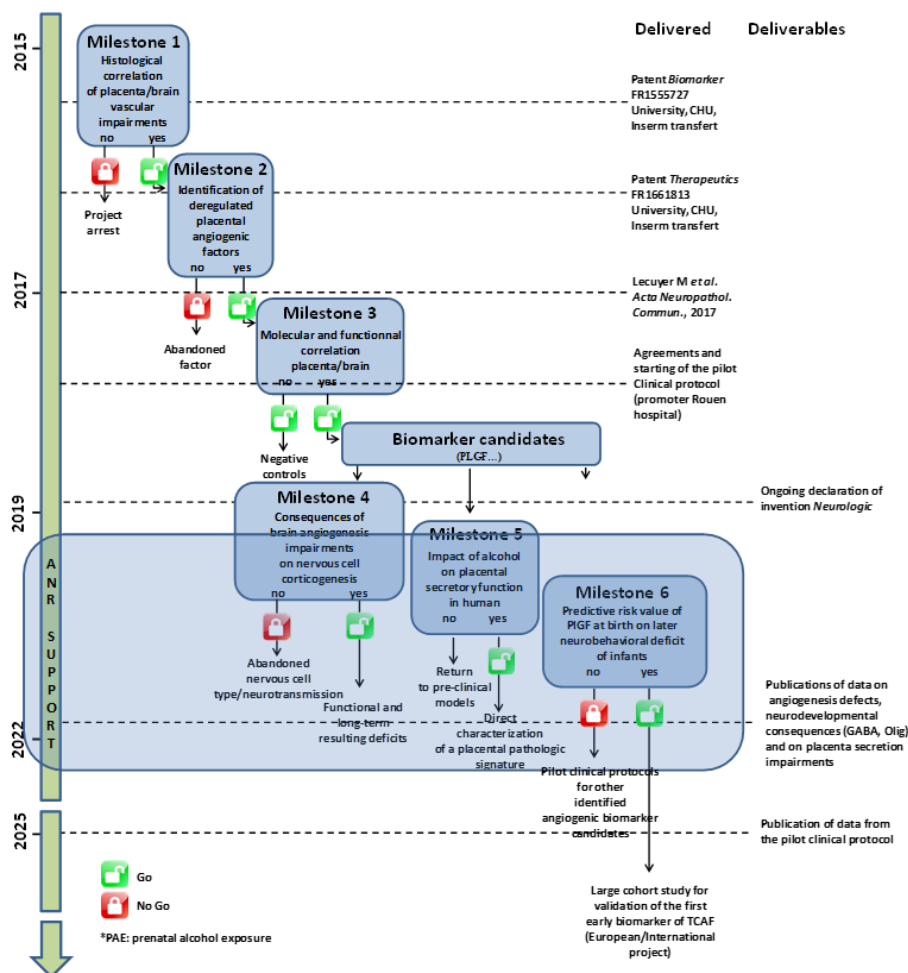
1. World Health Organization. Global status report on alcohol and health. https://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/gsr_2018/en 2018.
2. Bakoyiannis I, Gkioka E, Pergialiotis V, Mastroleon I, Prodromidou A, Vlachos GD, Perrea D. Fetal alcohol spectrum disorders and cognitive functions of young children. *Rev Neurosci*. 2014, 25:631-9.
3. Toutain S, Germanaud D. Exposition prénatale à l'alcool et troubles causés par l'alcoolisation fœtale. *Expertise collective Inserm "Déficiences intellectuelles"*. <http://www.ipubli.inserm.fr> 2016.
4. Streissguth AP, Aase JM, Clarren SK, Randels SP, LaDue RA, Smith DF. "Fetal alcohol syndrome in adolescents and adults" – In *Journal of the American Medical Association*, 1991, 265: 1961-7.
5. Mattson SN, Roesch SC, Glass L, Deweese BN, Coles CD, Kable JA, May PA, Kalberg WO, Sowell ER, Adnams CM, Jones KL, Riley EP; CIFASD. Further development of a neurobehavioral profile of fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res*. 2013, 37:517-8.
6. Breiner P, Nulman I, Koren G. Identifying the neurobehavioral phenotype of fetal alcohol spectrum disorder in young children. *J Popul Ther Clin Pharmacol*. 2013, 20:e334-9.
7. Lerna A, Esposito D, Conson M, Massagli A. Long-term effects of PECS on social-communicative skills of children with autism spectrum disorders: a follow-up study. *Int J Lang Commun Disord*. 2014, 49:478-85.
8. Pickles A, Anderson DK, Lord C. Heterogeneity and plasticity in the development of language: a 17-year follow-up of children referred early for possible autism. *J Child Psychol Psychiatry*. 2014, 2014, 55:1354-62.
9. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res*. 2004, 114:397-407.
10. Alsat E, Guibourdenche J, Couturier A, Evain-Brion D. Physiological role of human placental growth hormone. *Mol Cell Endocrinol*. 1998, 140:121-7.
11. Clark DE, Smith SK, Licence D, Evans AL, Charnock-Jones DS. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J Endocrinol*. 1998, 159:459-67.
12. Woods L, Perez-Garcia V, Hemberger M. Regulation of placental development and its impact on fetal growth—new insights from mouse models. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018, 9:570.
13. Belagodu AP, Fleming S, Galvez R. Neocortical developmental analysis of vasculature and their growth factors offer new insight into fragile X syndrome abnormalities. *Dev Neurobiol*. 2017, 77:1321-33.
14. Bergen NE, Bouwland-Both MI, Steegers-Theunissen RP, Hofman A, Russcher H, Lindemans J, Jaddoe VVW, Steegers EAP. Early pregnancy maternal and fetal angiogenic factors and fetal and childhood growth: the Generation R Study. *Hum Reprod*. 2015, 30:1302-13.
15. Lecuyer M, Laquerrière A, Bekri S, Lesueur C, Ramdani Y, Jégou S, Uguen A, Marcorelles P, Marret S, Gonzalez BJ. PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. *Acta Neuropathol Commun*. 2017, 5:44.
16. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*. 2005, 436:193-200.

17. Hodivala-Dilke K. alphavbeta3 integrin and angiogenesis: a moody integrin in a changing environment. *Curr Opin Cell Biol.* 2008, 20:514-9.
18. Wilhelm CJ, Guizzetti M. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview from the glia perspective. *Front Integr Neurosci.* 2016, 9:65.
19. Jégou S, El Ghazi F, de Lendeu PK, Marret S, Laudenbach V, Uguen A, Marcorelles P, Roy V, Laquerrière A, Gonzalez BJ. Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. *Ann Neurol.* 2012, 72:952-60.

D LISTE DES LIVRABLES

Quand le projet en comporte, reproduire ici le tableau des livrables fourni au début du projet. Mentionner l'ensemble des livrables, y compris les éventuels livrables abandonnés, et ceux non prévus dans la liste initiale.

Commentaire du coordonnateur : Dans l'échéancier des livrables établi dans la demande, la valorisation des données cliniques est mentionnée après l'échéance de l'ANR AlcoBrain (voir extraction et tableau ci-dessous).



Extraction du calendrier des livrables tel que mentionné dans la demande initiale

Date de livraison	N°	Titre	Nature (rapport, logiciel, prototype, données, ...)	Partenaires (souligner le responsable)	Commentaires
2019	1	Valorisation des données sur alcool et angiogenèse	1 publication	<u>BJ Gonzalez</u> (part 1), S Gil (part 2), S Marret (part 3)	Article de synthèse
2020	2	Valorisation des données sur alcool et anomalies neurodevelopmentales (interneurones)	2 publications	<u>BJ Gonzalez</u> (part 1), S Marret (part 3)	2 articles originaux
2022	3	Valorisation des données sur alcool et anomalies neurodevelopmentales (Oligodendrocytes)	2 publications	<u>BJ Gonzalez</u> (part 1), S Marret (part 3)	2 articles originaux
2022/23	4	Valorisation des données sur alcool et dysfonction placentaire	3 publications	<u>S Gil</u> (part 3), <u>BJ Gonzalez</u> (part 1)	2 articles originaux et 1 revue (soumis)

E IMPACT DU PROJET

E.1 INDICATEURS D'IMPACT

Nombre de publications et de communications (à détailler en E.2)

Comptabiliser séparément les actions monopartenaire, impliquant un seul partenaire, et les actions multipartenaires résultant d'un travail en commun.

Attention : éviter une inflation artificielle des publications, mentionner uniquement celles qui résultent directement du projet (postérieures à son démarrage, et qui citent le soutien de l'ANR et la référence du projet).

		Publications multipartenaires	Publications monopartenaire
International	Revue à comité de lecture	8 (7 articles originaux et 1 article de synthèse)	1 (article original)
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage		
	Communications orales (conférence)	4 (sélections sur résumés)	
France	Revue à comité de lecture	1 (article de synthèse)	
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage		
	Communications orales (conférence)	9 (8 sélections sur résumés et 1 sur invitation)	
Actions de diffusion	Articles vulgarisation	1 (Inserm actualité)	
	Conférences vulgarisation	2 (dont 2 sur invitation)	
	Autres		

Autres valorisations scientifiques (à détailler en E.3)

Ce tableau dénombre et liste les brevets nationaux et internationaux, licences, et autres éléments de propriété intellectuelle consécutifs au projet, du savoir faire, des retombées diverses en précisant les partenariats éventuels. Voir en particulier celles annoncées dans l'annexe technique).

	Nombre, années et commentaires (valorisations avérées ou probables)
Brevets internationaux obtenus	1. Extension au niveau mondial du brevet France sur la thérapie placentaire d'atteintes cérébrales dans le cadre de l'alcoolisation fœtale WO2018100143
Brevet internationaux en cours d'obtention	
Brevets nationaux obtenus	
Brevet nationaux en cours d'obtention	
Licences d'exploitation (obtention / cession)	
Créations d'entreprises ou essaimage	
Nouveaux projets collaboratifs	<ul style="list-style-type: none">- AlcoRet - Dr Serge Picaud - Institut de la Vision, Paris- Retigene – Pr Denis Vivien – Inserm U1237, Caen- AlcoBrain - Dr Dan Savage - Albuquerque – NM, USA- AlcoVasc – Dr Pascal Dournaud – Inserm U1141, Paris
Colloques scientifiques	<ul style="list-style-type: none">- Research Society on Alcoholism (RSA) Orlando, USA, 2022- EUFASD - Arendal, Norway, 2022- Société Française de Médecine Périnatale (SFMP), Le Havre- Congress of Fetal and Neonatal Neurology, Paris, 2021- 8th International Conference on FASD, Vancouver, Canada, 2019- 7th Meeting of the Mediterranean Neuroscience Society, Marrakech, Morocco, 2019
Autres (préciser)	<ul style="list-style-type: none">- Atelier FASD - GIS Autisme et TND, Paris, 2022- Workshop ICM - BB@C – Caen, 2021- Comité Autisme et Développement - Fondation de France, Paris, 2021- Assises de la plateforme d'Imagerie PRIMACEN, Mont-Saint-Aignan, 2018- Séminaire Inserm U1237 – Caen, 2018- Séminaire Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives – Strasbourg, 2018

E.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Répertorier les publications résultant des travaux effectués dans le cadre du projet. On suivra les catégories du premier tableau de la section E.1 en suivant les normes éditoriales habituelles. En ce qui concerne les conférences, on spécifiera les conférences invitées.

Articles internationaux originaux à comité de lecture

Léger C, Dupré N, Laquerrière A, Lecointre M, Dumanoir M, Janin F, Hauchecorne M, Fabre M, Jégou S, Frébourg T, Cleren C, Leroux P, Marcotelles P, Brasse-Lagnel C, Marret S, Marguet F, Gonzalez BJ. In utero alcohol exposure exacerbates endothelial protease activity from pial microvessels and impairs GABA interneuron positioning. *Neurobiol Dis.* 2020a Nov;145:105074. doi: 10.1016/j.nbd.2020.105074.

Léger C, Dupré N, Aligny C, Bénard M, Lebon A, Henry V, Hauchecorne M, Galas L, Frébourg T, Leroux P, Vivien D, Lecointre M, Marret S, Gonzalez BJ. Glutamate controls vessel-associated migration of GABA interneurons from the pial migratory route via NMDA receptors and endothelial protease activation. *Cell Mol Life Sci.* 2020b May;77(10):1959-1986. doi: 10.1007/s00018-019-03248-5.

- Marguet F, Friocourt G, Brosolo M, Sauvestre F, Marcorelles P, Lesueur C, Marret S, Gonzalez BJ, Laquerrière A. Prenatal alcohol exposure is a leading cause of interneuronopathy in humans. *Acta Neuropathol Commun.* 2020 Nov 30;8(1):208. doi: 10.1186/s40478-020-01089-z.
- Savage DD, Rosenberg MJ, Coquet L, Porch MW, Allen NA, Roux C, Aligny C, Jouenne T, Gonzalez BJ. Ethanol-Induced Alterations in Placental and Fetal Cerebrocortical Annexin-A4 and Cerebral Cavernous Malformation Protein 3 Are Associated With Reductions in Fetal Cortical VEGF Receptor Binding and Microvascular Density. *Front Neurosci.* 2020 Jun 3;14:519. doi: 10.3389/fnins.2020.00519.
- Brosolo M, Lecointre M, Laquerrière A, Janin F, Genty D, Lebon A, Lesueur C, Vivien D, Marret S, Marguet F, Gonzalez BJ. In utero alcohol exposure impairs vessel-associated positioning and differentiation of oligodendrocytes in the developing neocortex. *Neurobiol Dis.* 2022 Sep;171:105791. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105791.
- Marguet F, Brosolo M, Friocourt G, Sauvestre F, Marcorelles P, Lesueur C, Marret S, Gonzalez BJ, Laquerrière A. Oligodendrocyte lineage is severely affected in human alcohol-exposed fetuses. *Acta Neuropathol Commun.* 2022 May 14;10(1):74. doi: 10.1186/s40478-022-01378-9.
- Sautreuil C, Lecointre M, Dalmaso J, Leuillier M, Lecuyer M, Bekri S, Marret S, Laquerrière A, Brasse-Lagnel C, Gil S, Gonzalez BJ. Impaired expression of the placental angiogenic factor CD146 by prenatal alcohol exposure results in disorganized foetal brain vasculature. *J Physiol.* Under review
- Dalmaso J, Guibourdenche J, Vaiman D, Gonzalez BJ, Gil S. Placental alcohol exposure and endocrine dysfunctions in the trophoblast. *AJOG*, submitted.

Articles de synthèse internationaux à comité de lecture

Dalmaso J, Laquerrière A, Gonzalez BJ, Gil S. Review : Alcohol-related diseases and foetus-placenta interface. *Neurotoxicology and Teratology*, submitted.

Articles de synthèse nationaux à comité de lecture

Sautreuil C, Laquerrière A, Lecuyer M, Brasse-Lagnel C, Jégou S, Bekri S, Marcorelles P, Gil S, Marret S, Gonzalez BJ. [Fetal alcohol exposure: when placenta would help to the early diagnosis of child brain impairments]. *Med Sci (Paris)*. 2019 Nov;35(11):859-865. doi: 10.1051/medsci/2019167.

Articles de vulgarisation

Alcoolisation fœtale : un organe inattendu entre en scène. Inserm Actualité, Le magazine, vol 42, pp : 10, 11, 2019.

Présentations orales internationales

Gonzalez BJ. Prenatal alcohol exposure impairs endothelial cell activity and the vessel-associated migration of cortical interneurons. 45th RSA Meeting - Orlando, FL, USA, 2022.

Gonzalez BJ. In utero alcohol exposure alters foetal brain angiogenesis and impairs the vessel-associated migration of cortical interneurons: a translational study. EUFASD - Arendal, Norway, 2022.

Marguet F. In utero alcohol exposure impairs the vessel-associated positioning and differentiation of oligodendrocytes in the developing neocortex. EUFASD - Arendal, Norway, 2022.

Leroy A. Impairment of retinal angiogenesis in FASD: Involvement of the endothelial NMDA receptor. EUFASD - Arendal, Norway, 2022.

Présentations orales nationales

Dalmaso J. La fonction endocrine trophoblastique : indicateur biologique de la toxicité de l'alcoolisation prénatale sous-estimé ? Journée des jeunes chercheurs en toxicologie de la STCM (Société de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire). Webinaire, 2022.

Gonzalez BJ. Retentissement de l'imprégnation alcoolique maternelle sur le développement du système nerveux central du fœtus : Axe placenta/cerveau. Société Française de Médecine Périnatale, Le Havre, 2021. *Sur invitation.*

Brosolo M. Impact de l'alcoolisation in utero sur les interactions oligo-vasculaires au sein du néocortex en développement, Journées Francophones de Recherche en Néonatalogie (JFRN), Paris, 2021.

Conférencière primée

Brosolo M. Prenatal alcohol exposure effects on oligo-vascular interaction in the developing cortex, Journée de l'Ecole Doctorale, Distanziel, 2021.

Dalmasso J. Characterization of placental Alcohol biomarkers during pregnancy and impact on the human placental functions. FHU Senec, CHU Créteil, 2021

Dalmasso J. Caractérisation de biomarqueurs placentaires d'alcoolisation au cours de la grossesse et impact de l'alcool sur les fonctions placentaires essentielles au bon développement du fœtus. Groupe Franco-Placentaire, Nantes, 2021

Dalmasso J. Caractérisation de biomarqueurs placentaires d'alcoolisation au cours de la grossesse et impact de l'alcool sur les fonctions placentaires essentielles au bon développement du fœtus. Comparaison des effets observés sur le placenta lors d'une alcoolisation in utero avec ceux observés dans le cas d'une prématurité. Concours jeunes chercheurs du FHU prématurité, Maternité de Port Royal, Paris, 2021. **Conférencière primée**

Brosolo M. Effects of prenatal PIGF on neurovascular impairments induced by prenatal alcohol exposure : Focus on oligodendrocytes, Journée de l'Ecole Doctorale, Caen, 2019.

Brosolo M. Effet de l'exposition in utero à l'alcool sur l'angiogenèse et la corticogenèse cérébrale du fœtus : une étude préclinique, Journées Francophones de Recherche en Néonatalogie (JFRN) 2019, Paris. **Conférencière primée**

Conférences de vulgarisation

Lecoindre M et Gonzalez BJ. Parrainage "un Chercheur, un Enseignant, une Classe". Thématique abordée : Alcool et grossesse. Lycée Raymond Queneau, Yvetot. 2019.

Lecoindre M et Gonzalez BJ. Parrainage "un Chercheur, un Enseignant, une Classe". Thématique abordée : Alcool et grossesse. Lycée Raymond Queneau, Yvetot. 2018.

E.3 LISTE DES ELEMENTS DE VALORISATION

La liste des éléments de valorisation inventorie les retombées (autres que les publications) décomptées dans le deuxième tableau de la section E.1. On détaillera notamment :

- brevets nationaux et internationaux, licences, et autres éléments de propriété intellectuelle consécutifs au projet.
- lancement de nouveau projet, nouveau contrat,...
- le développement d'un nouveau partenariat,
- autres (ouverture internationale,...)

Organisation de conférences, colloques, séminaires majeurs...

Co-organisation par le Dr Dan Savage (Albuquerque, USA) avec le Dr Bruno Gonzalez (Rouen, France) du Symposium « *Impact of prenatal alcohol exposure on microvascular development and brain function* ». 45th Research Society on Alcoholism (RSA) Orlando, USA, 2022.

Modération par le Pr Olivier Pierrefiche (Amiens, France) et le Dr Bruno Gonzalez (Rouen, France) de la session « Alcoolisation fœtale et modèles animaux ». Atelier dématérialisé FASD - GIS Autisme et TND, 2021.

Formation doctorale

Brossolo Mélanie a été la doctorante du Dr B Gonzalez (Partenaire 1). Elle a soutenu sa thèse en mai 2022. *L'intitulé de la thèse était: Impact d'une alcoolisation in utero sur la mise en place vasculo-associée des oligodendrocytes.* Université de Rouen, Normandie.

Dalmasso Jessica a été la doctorante du Pr S Gil (Partenaire 3). Elle a soutenu sa thèse en juillet 2022. L'intitulé de la thèse est : *Le Syndrome d'Alcoolisme Placentaire : impact fonctionnel de l'alcoolisation in utero.* Université Paris Cité.

Sautreuil Camille a été la doctorante du Dr B Gonzalez (Partenaire 1). Elle a soutenu sa thèse en décembre 2019. *L'intitulé de la thèse est: Etude du CD146 placentaire comme biomarqueur de*

troubles de l'angiogenèse cérébrale suite à une alcoolisation in utero Université de Rouen, Normandie.

Lancement de nouveaux projets

Le programme **AlcoBrain** a contribué à l'émergence de deux projets : le projet **AlcoRet** et le projet **AlcoMICS**.

Le projet **AlcoRet** a pour objectif principal de transposer à la rétine du nouveau-né la valeur diagnostique des altérations de l'angiogenèse corticale suite à une alcoolisation *in utero*. Ce projet vise à élargir la fenêtre diagnostique des TCAF associée à la dysfonction placentaire.

Le projet **AlcoMICS** consiste à comparer par une approche sans a priori les signatures transcriptomiques « placenta-cerveau » entre un groupe témoin et alcool. Ce projet constitue la première approche inter-organe qui cible la communication entre le placenta et le cerveau fœtal.

E.4 BILAN ET SUIVI DES PERSONNELS RECRUTES EN CDD (HORS STAGIAIRES)

Ce tableau dresse le bilan du projet en termes de recrutement de personnels non permanents sur CDD ou assimilé. Renseigner une ligne par personne embauchée sur le projet quand l'embauche a été financée partiellement ou en totalité par l'aide de l'ANR et quand la contribution au projet a été d'une durée au moins égale à 3 mois, tous contrats confondus, l'aide de l'ANR pouvant ne représenter qu'une partie de la rémunération de la personne sur la durée de sa participation au projet.

Les stagiaires bénéficiant d'une convention de stage avec un établissement d'enseignement ne doivent pas être mentionnés.

Les données recueillies pourront faire l'objet d'une demande de mise à jour par l'ANR jusqu'à 5 ans après la fin du projet.

Identification				Avant le recrutement sur le projet			Recrutement sur le projet				Après le projet				
Nom et prénom	Sexe H/F	Adresse email (1)	Date des dernières nouvelles	Dernier diplôme obtenu au moment du recrutement	Lieu d'études (France, UE, hors UE)	Expérience prof. Antérieure, y compris post-docs (ans)	Partenaire ayant embauché la personne	Poste dans le projet (2)	Durée missions (mois) (3)	Date de fin de mission sur le projet	Devenir professionnel (4)	Type d'employeur (5)	Type d'emploi (6)	Lien au projet ANR (7)	Valorisation expérience (8)
BROSSOLO Mélanie	F	melanie.brossolo@etu.univ-rouen.fr	Juillet 2022	Doctorat es sciences	France	Master	Dr Bruno Gonzalez	Doctorante	6 mois	(soudure fin de thèse)	En recherche d'emploi	X	X	X	X
DALMASSO Jessica	F	jessica.dalmasso49@gmail.com	06-07-2022	Doctorat es sciences	France	Master	Pr Sophie Gil	Doctorante	36 mois	31 05 2022	CDD	Public hospitalier	Sage-femme	L'employeur n'est pas partenaire du projet	Expérience en lien direct avec l'intégration professionnelle
MESTRE Nathalie	F	nathalie.mestre@chu-rouen.fr	Juillet 2022	Infirmière	France	Ecole d'infirmière	Pr Stéphane Marret	Technicienne	36 mois	Non communiquée	En poste au CHU de Rouen	CHU de rouen	Infirmière	L'employeur est partenaire du projet	Expérience en lien direct avec l'intégration professionnelle
SAUTREUIL Camille	F	camille.sautreuil@gmail.com	Juillet 2022	Doctorat es sciences	France	Master	Dr Bruno Gonzalez	Doctorante	6 mois	(soudure fin de thèse au titre du handicap)	Financement post_doctoral puis en recherche d'emploi	Fondation de France puis Région Normandie	Post-doc	L'employeur est partenaire du projet	Expérience en lien direct avec l'intégration professionnelle
Hélène Le Cornu	F	helene.lecornu@aphp.fr	Juin 2022	Sage-femme	France	Ecole de Sage-femme	Pr Valérie Biran	Sage femme de recherche clinique à 50%	24 mois	Octobre 2021	Sage-femme	CHU Robert Debré	Sage-femme	L'employeur est partenaire du projet	Expérience en lien direct avec l'intégration professionnelle

Aide pour le remplissage

- (1) **Adresse email** : indiquer une adresse email la plus pérenne possible
- (2) **Poste dans le projet** : post-doc, doctorant, ingénieur ou niveau ingénieur, technicien, vacataire, autre (préciser)
- (3) **Durée missions** : indiquer en mois la durée totale des missions (y compris celles non financées par l'ANR) effectuées sur le projet
- (4) **Devenir professionnel** : CDI, CDD, chef d'entreprise, encore sur le projet, post-doc France, post-doc étranger, étudiant, recherche d'emploi, sans nouvelles
- (5) **Type d'employeur** : enseignement et recherche publique, EPIC de recherche, grande entreprise, PME/TPE, création d'entreprise, autre public, autre privé, libéral, autre (préciser)
- (6) **Type d'emploi** : ingénieur, chercheur, enseignant-chercheur, cadre, technicien, autre (préciser)
- (7) **Lien au projet ANR** : préciser si l'employeur est ou non un partenaire du projet
- (8) **Valorisation expérience** : préciser si le poste occupé valorise l'expérience acquise pendant le projet.

Les informations personnelles recueillies feront l'objet d'un traitement de données informatisées pour les seuls besoins de l'étude anonymisée sur le devenir professionnel des personnes recrutées sur les projets ANR. Elles ne feront l'objet d'aucune cession et seront conservées par l'ANR pendant une durée maximale de 5 ans après la fin du projet concerné. Conformément à la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 modifiée, relative à l'Informatique, aux Fichiers et aux Libertés, les personnes concernées disposent d'un droit d'accès, de rectification et de suppression des données personnelles les concernant. Les personnes concernées seront informées directement de ce droit lorsque leurs coordonnées sont renseignées. Elles peuvent exercer ce droit en s'adressant l'ANR (<http://www.agence-nationale-recherche.fr/Contact>).