

DANY PLOURDE

**ANALYSE DU TRANSCRIPTOME ET DE LA
QUALITÉ DE L'EMBRYON BOVIN PRODUIT
SOUS DIFFÉRENTES CONDITIONS**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en sciences animales
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES ANIMALES
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2011

© Dany Plourde, 2011

Résumé

La qualité embryonnaire est un concept en pleine évolution. Depuis quelques années, plusieurs caractéristiques morphologiques ont été étudiées dans le but de définir la qualité des embryons bovins produits in vitro en fonction de ceux produits in vivo. Plus récemment, l'évaluation de l'expression génique embryonnaire a été utilisée comme un nouvel outil pour caractériser un embryon de qualité. Plusieurs facteurs ont potentiellement la capacité de faire fluctuer le niveau d'expression génique des quelques 16 121 gènes connus à ce jour pour être impliqués dans le développement embryonnaire précoce. Parmi ceux-ci, notons la source des complexes ovocytes-cumulus mis en maturation (ponction à partir d'ovaires d'abattoir, ponction transvaginale in vivo, etc.), les milieux de développement (SOF avec ou sans sérum, avec ou sans support cellulaire, etc.), l'environnement de culture embryonnaire (conditions de laboratoire, expérience du manipulateur, etc.) ainsi que la qualité de l'ARN utilisé pour hybrider les biopuces.

L'objet de nos démarches expérimentales a été de déterminer la variation de la qualité de l'embryon bovin produit in vitro entre deux laboratoires pour évaluer l'impact de l'environnement de culture ainsi que d'observer la variation d'expression génique présente chez les embryons produits selon différents systèmes de production in vitro.

Bien que peu de variations furent observées entre les blastocystes en expansion produits sur deux sites, la proportion de cellules apoptotiques et l'expression génique pour certains gènes liés à l'apoptose se sont avérées être significativement différentes d'un laboratoire à l'autre. Des variations significatives ont également été observées entre la production in vivo et certains systèmes in vitro, où les gènes impliqués dans le métabolisme, la synthèse et la modification des lipides et du cholestérol, ainsi que dans le facteur de transcription Aryl Hydrocarbon Receptor, sont exprimés de façon beaucoup plus marquée. Un nombre imposant de nouveaux transcrits non caractérisés a également été affecté par l'environnement de culture in vitro. Sur le plan du taux de blastocyste, le système in vitro-SOF avec ponction transvaginale des ovocytes a produit les meilleurs résultats, sans engendrer les phénotypes anormaux de la co-culture.

Abstract

Embryo quality is a concept yet to be defined. Since some years now, many phenotypical characteristics have been studied to define this concept by comparing bovine embryos produced *in vitro* to their *in vivo* counterparts. More recently, microarrays have been used as a new tool to refine the characteristics related to a healthy embryo. Gene expression variations may be explained in many ways, such as the source of immature oocytes (aspirated from post-mortem ovaries, collected by *in vivo* ovum pickup, etc.), the development media (SOF with or without serum, with or without cellular support, etc.), the culture environment (laboratory conditions, manipulator skills, etc.) as well as RNA quality used to hybridize microarrays.

The aim of this study was to determine embryo quality variations between two production sites to assess the culture environment impact and to observe the gene expression variations between several *in vitro* embryo production systems.

Even if slight differences have been noted between blastocysts produced from the two laboratories, only the apoptotic cell proportion as well as apoptosis gene related gene expression were found to be significantly different. Significant variations were observed as well between embryos produced *in vivo* to some of their *in vitro* counterparts, for which the metabolism, the synthesis and the modification of lipids and cholesterol, as well as the transcription factor Aryl Hydrocarbon Receptor, were expressed more importantly. A large contingent of uncharacterized novel transcripts was also influenced by the *in vitro* environment. On the practical side, these results provides evidence that the combination of ovum pick-up and a semi-defined *in vitro* system provides a high yield of blastocysts without the known ill effects of co-culture.

Avant-propos

La réalisation d'un mémoire pourrait être comparée à la traversée d'un épais brouillard à grandes enjambées, constamment en proie à un croc-en-jambe scientifique des plus imprévisibles. Durant cette année et demie qui circonscrit sans l'ombre d'un doute les moments les plus stimulants de ma vie professionnelle, plusieurs personnes m'ont permis d'avancer dans ce flou, que ce soit pour jeter de la lumière sur de nouvelles connaissances ou encore pour apposer un relief plus ludique à ma trajectoire.

Merci tout d'abord et principalement à mon directeur de recherche Claude Robert. Merci Claude pour la confiance, l'autonomie et la liberté que tu m'as accordées au cours de ce passage. Merci pour les discussions en périphérie de mon projet qui ont su me faire grandir personnellement et professionnellement. Tu es une source d'inspiration pour moi grâce à ta détermination et ton intégrité ainsi que pour incarner cet électron libre qui brave complaisance et adversité.

Un généreux merci également à Isabelle Laflamme qui m'a pris en charge dans les premiers mois de ma maîtrise, alors que mon cursus scolaire ne faisait intervenir ni pipettes ni spermogramme. Merci pour la patience et l'humour décapant. Dans une même optique, merci à Dominic Gagné et Isabelle Dufort pour votre disponibilité, votre générosité et votre prédisposition indéniable à l'enseignement.

Un merci amical à ma complice Élise Mondou pour ta générosité, ton originalité, ton sens de l'humour hors pairs et pour tes compétences q-RT-PCResques. Nos dérives absurdes vont me manquer au plus haut point. Un énorme merci à ma grande sœur de laboratoire Sara Scantland pour le renforcement positif, pour personnifier un exemple marquant de courage et pour la joie de vivre hyperactive que tu témoignes quotidiennement. Merci également à Isabelle Gilbert et Éric Fournier pour avoir su mettre leurs compétences informatiques au profit de ce mémoire. Enfin, je tiens à remercier tous les artisans de l'équipe de Claude Robert et de Marc-André Sirard ainsi que Patrick Blondin et Christian Vigneault à BOVITEQ pour l'appui, le respect, le sens du dépassement mais surtout

l'amitié témoigné tout au long de mon passage au Centre de recherche en biologie de la reproduction.

Merci finalement à mes parents pour la liberté, le sens des valeurs et l'absence d'éditorial concernant mes décisions. L'indépendance d'esprit est sans doute le plus beau cadeau que vous m'avez jamais offert.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Avant-propos	iv
Table des matières	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations.....	xi
Chapitre I : Revue de littérature	1
<i>Introduction</i>	<i>1</i>
<i>La production in vitro.....</i>	<i>5</i>
1. Maturation ovocytaire	5
a. Maturation moléculaire.....	6
b. Maturation nucléaire	7
c. Maturation cytoplasmique	9
2. La «compétence» de l'ovule	9
a. Grosseur du follicule.....	10
b. Morphologie de l'ovule	11
c. Phénomène de maturation post-mortem	12
d. Température de ponction des COCs	13
e. Ovocytes issus d'une superovulation.....	14
3. Fécondation in vitro	14
4. Développement embryonnaire	17
a. In vitro.....	17
b. Abondance d'ARN	18
<i>La qualité de l'embryon.....</i>	<i>20</i>
1. Normes de la qualité d'un embryon.....	20
a. Clivage	20
b. Taux de blastocyste.....	21
c. Taux de gestation	22
2. Phénotypes de l'embryon.....	23
a. Cryotolérance de l'embryon	23
b. Ratio mâle / femelle	24
c. Syndrome du veau anormal	27
d. Fréquence des avortements	29
3. Différences des embryons produits in vitro et in vivo	30
a. Paramètres morphologiques.....	30
b. Communication intercellulaire	32
c. Métabolisme énergétique	33
d. Aberrations chromosomiques	34
e. Expression génique	36
f. Épigénome	38
<i>Milieux et conditions de culture.....</i>	<i>40</i>
1. Milieu non-défini	41
a. Développement embryonnaire	41

b.	Métabolisme lipidique	42
c.	Aberrations chromosomiques	42
d.	Cryotolérance.....	43
e.	Expression génique	43
2.	Milieu semi-défini.....	47
3.	Milieu défini.....	48
4.	Concentrations gazeuses	49
5.	Additifs hormonaux	50
a.	IGF-1.....	50
b.	Hormone de croissance (GH)	51
c.	EGF.....	53
d.	TGF- β	53
	<i>Hypothèses de recherche</i>	55
	<i>Bibliographie</i>	57
	Chapitre II : Expérimentation	68
	<i>Identification of sources of variance in bovine in vitro embryo production: impact of laboratory setup</i>	68
1.	Abstract	70
2.	Introduction	71
3.	Materials and methods	73
a.	In vitro embryo production.....	73
b.	Inner cell mass, trophoblast and apoptotic cells staining.....	74
c.	Determination of sex ratio	75
d.	Microarray description and experimental design.....	75
e.	RNA extraction and amplification.....	76
f.	aRNA labelling and microarrays hybridization	76
g.	Quantitative RT-PCR.....	77
h.	Data processing and statistical analyses	77
4.	Results.....	78
a.	Performance of in vitro system between production sites	78
b.	Sex ratio	78
c.	Total cell count and cellular allocation.....	79
d.	TUNEL positive cells	79
e.	Gene expression profiles.....	79
f.	Gene list interpretation.....	80
5.	Discussion	81
6.	Conclusion	83
7.	References	85
	<i>Different embryo production systems impact the embryonic transcriptome</i>	99
1.	Abstract	101
2.	Introduction.....	102
3.	Materials and methods	104
a.	In vitro embryo production.....	104
b.	In vivo blastocyst production.....	106
c.	Performance assessment of embryo production systems.....	106
d.	Microarray description and experimental design.....	107
e.	RNA extraction and amplification.....	107

f.	aRNA labelling and microarrays hybridization	108
g.	Quantitative RT-PCR.....	108
h.	Statistical analyses	109
4.	Results.....	110
a.	Production system efficiency.....	110
b.	Transcriptome profiles of different production systems.....	110
c.	Impact of the in vitro embryo production system on gene expression	111
5.	Discussion	114
6.	Conclusion	118
7.	References.....	120
	<i>Conclusion</i>	<i>140</i>

Liste des tableaux

Chapitre II

Identification of sources of variance in bovine in vitro embryo production: impact of laboratory setup

Table 1.1 PCR primer sequences and reaction conditions.....	88
Table 1.2 Efficiency of embryo production systems and gender proportions between the two production sites	89
Table 1.3 Embryo quality parameters of day 7 expanded blastocysts produced on different production sites	90

Different commercially employed embryo production systems impact the embryonic transcriptome

Table 2.1 PCR primer sequences and reaction conditions.....	124
Table 2.2 Efficacy of different embryo production systems	125

Liste des figures

Chapitre II

Identification of sources of variance in bovine *in vitro* embryo production: impact of laboratory setup

Figure 1.1 Picture of an expanded blastocyst typically collected at each production	93
Figure 1.2 Differential cellular staining of day 7 expanded blastocysts.....	94
Figure 1.3 Relationship between treatments.....	96
Figure 1.4 Contrasting the two embryo production sites at the gene expression level.....	97
Figure 1.5 Validation of microarray data by quantitative RT-PCR.....	97

Different commercially employed embryo production systems impact the embryonic transcriptome

Figure 2.1 Images of blastocysts.....	126
Figure 2.2 Between group analysis (BGA)	128
Figure 2.3 Impact of oocyte source and of <i>in vitro</i> culture conditions.....	129
Figure 2.4 Functions and gene network impacted by <i>in vitro</i> culture conditions.....	132
Figure 2.5 Comparative analyses of microarray data across treatments	134
Figure 2.6 Quantification of mRNA for candidates involved in the Aryl Hydrocarbon Receptor pathway.....	136
Figure 2.7 Distribution of differentially expressed Novel transcribed elements.....	138
Figure 2.8 Venn diagram of Distribution of differentially expressed NTR.....	139

Liste des abréviations

%	pourcentage
ADN ou DNA	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	analyse de la variance
ARN ou RNA	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BAX	bcl-2-associated X protein
Bcl-2	b-cell lymphoma 2
BGA	between group analysis
BSA	bovine serum albumin
CO ₂	gaz carbonique
COC	complexe ovocyte-cumulus
Cx31	connexin 31
Cx43	connexin 43
E ₂	œstradiol
EGF	epidermal growth factor
FBS	fetal bovine serum
FIV	fécondation in vitro
FSH	hormone stimulant la folliculogénèse
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GH	growth hormone
GLUT1	glucose transporter 1
GLUT5	glucose transporter 5
GnRH	gonadotropin releasing hormone
GV	vésicule germinale
GVBD	germinal vésicule breakdown
IA	insémination artificielle
ICM	inner cell mass
IFN-t	interferon-tau
IGF-I	insulin-like growth factor 1
IGF-II	insulin-like growth factor 2
Igf2r	IGF Type-II receptor
LH	hormone lutéinisante
Lif	leukemia inhibitory factor
LR-β	lif receptor-beta
MET ou MZT	transition maternelle embryonnaire
MI	métaphase I
MII	métaphase II
ml	millilitre
MnSOD	manganese superoxide dismutase
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
ng	nanogramme

OPU	ovum pick up
PBS	phosphate buffered saline
PGF2- α	prostaglandine F2alpha
PVA	polyvinyl-alcohol
PVP	polyvinyl-pyrrolidone
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction
RLC	réseau laitier canadien
SOF	synthetic oviduct fluid
SOX	sulfur oxidising enzyme
TE	trophectoderm
TGF- β	transforming growth factor beta
μ l	microlitre
TLH	tyrode lactate medium
ZP	zone pellucide

Chapitre I : Revue de littérature

Introduction

Au fil des années, l'avancement de la science a permis une compréhension de plus en plus grande de la génétique. De la domestication des animaux (28 000 à 10 000 avant J-C), à la théorie patrocline de Pythagore (580 à 504), en passant par la théorie de l'évolution de Darwin (1809 à 1882), la théorie de l'hérédité de Mendel (1822 à 1884), la découverte de la double hélice d'ADN par Watson, Crick et Wilkins, le développement du modèle du BLUP par Charles Roy Henderson (1911-1989) et le séquençage du génome bovin (2004), la génétique est une science en constante évolution, avec la génétique fonctionnelle et l'épigénomique qui s'annoncent pour être les prochains grands sujets de recherche.

Dans le milieu agricole, cette expertise génétique acquise a comme répercussions premières le raffinement de la sélection des animaux d'élevage selon des critères zootechniques précis (production, conformation, santé et fertilité), le développement d'alternatives aux problèmes de fertilité de certains animaux et le gain génétique rapide, grâce, en particulier, à des technologies de reproduction assistée comme l'insémination artificielle (IA) mais aussi le transfert embryonnaire et la production in vitro. Ces dernières technologies permettent de diminuer l'intervalle entre les générations et d'augmenter la pression de sélection, c'est-à-dire de développer des lignées qui répondent le mieux aux critères recherchés pour chaque production.

Le Réseau Laitier Canadien (RLC) publie à chaque année l'avancement de la génétique chez les bovins laitiers par le biais de l'évolution de la base mobile. Ainsi, chez la Holstein, la base de données génétique utilisée en 2010 en production (données de 2002 à 2004) montre une augmentation de 90kg de lait, 1,9kg de gras et 2,6kg de protéine par rapport à la base de données utilisée en 2009 (données de 2001 à 2003). Cette amélioration est également observable pour la cote de conformation (0,72), de cellules somatiques (-0,03), de durée de vie (0,25), alors que seule la cote pour la fertilité des filles est en baisse (-0,3) (RLC, 2010). L'évolution aussi rapide du gain génétique est principalement attribuable à

l'IA, alors qu'une étude réalisée en 2002 par le RLC démontrait que seulement 8% des animaux enregistrés, animaux qui participent par ailleurs aux évaluations génétiques, provenaient de taureaux d'étable. L'IA permet à chaque producteur une accessibilité presque sans limite à la semence des meilleurs géniteurs au monde à un prix plus ou moins abordable.

Autre source importante d'amélioration génétique, le transfert embryonnaire est pratiqué sur une base commerciale depuis le début des années 80. Selon certaines études, il est estimé que le transfert embryonnaire pourrait augmenter de 20 à 30% le gain génétique pour la production de lait. Révélateur de l'importance du transfert embryonnaire pour l'avancement de la génétique, il est estimé que 95% des taureaux qui font leur entrée en IA proviennent d'un transfert embryonnaire (Bousquet, 2002). Du côté femelle, en 2007, 5,2% des bovins laitiers qui ont été enregistrés étaient issus d'un transfert embryonnaire (RLC, 2007). Alors que l'IA, tout comme l'accouplement naturel, peut potentiellement permettre à une femelle d'engendrer un seul descendant par année, le transfert embryonnaire a le potentiel de décupler ce nombre, faisant augmenter de façon très significative la pression de sélection, en considérant le fait que les vaches élites sont les candidates les plus considérées pour cette technologie. À la puberté, il est estimé que 3 descendants peuvent être obtenus suite à une suroovulation, diminuant ainsi du même coup l'intervalle entre génération (Bousquet, 2002).

Outre l'avancement génétique, le transfert embryonnaire permet également de pallier à certains problèmes de fertilité ainsi qu'à diminuer la transmission de certaines maladies. Le sexage des embryons (fiable à 95%) et la congélation des embryons dans un cryoprotecteur sont également d'autres techniques qui permettent de maximiser la vente de génétique élite par le biais du transfert embryonnaire (Bousquet, 2002).

En 2009, l'exportation de semence de bovins laitiers a généré plus de 63,6 millions de dollars canadiens en revenus pour l'industrie laitière canadienne alors que l'exportation d'embryons en a généré près de 7,8 millions. Par rapport aux recettes totales provenant de l'exportation de la génétique canadienne qui s'élevaient à près de 99,7 millions en 2009,

l'exportation de semence de bovins laitiers et d'embryons représentaient environ 63,8% et 7,8% respectivement (Statistique Canada, 2009).

Pratiquée sur une base commerciale depuis le début des années 90, la production d'embryons in vitro consiste à prélever les ovocytes d'ovaires de vaches vivantes ou abattues, dans le but de réaliser la maturation, la fécondation et le développement in vitro. De plus en plus utilisée, la production in vitro permet d'augmenter le nombre de descendants engendrés par année (3,5 fois plus chez une vache mature) par rapport au transfert embryonnaire, alors que les ovocytes peuvent être prélevés de génisses immatures mais également de vaches gestantes de trois mois et moins. Alors qu'il est estimé qu'environ 20% des femelles ne répondent pas à la stimulation hormonale menant à la suroovulation ou encore ne produisent que des ovules non fécondés, la production in vitro peut s'avérer une belle alternative pour tirer profit du potentiel génétique de celles-ci (Bousquet, 2002). Selon Leitch et al. (1995), la production in vitro peut augmenter le gain génétique de 10 à 30% par rapport au simple transfert embryonnaire, entre autres en raison du fait que plusieurs géniteurs mâles (diminution de la consanguinité) peuvent être utilisés pour une seule et même suroovulation, grâce à la fécondation in vitro.

En 2007, plus d'un demi-million d'embryons bovins issus de fécondation in vivo et récoltés par lavage utérin ont été transférés au niveau mondial. L'Amérique du Nord dominait largement avec le transfert de plus de 52% de ce nombre, alors que l'Europe arrivait bon deuxième avec 17%. Le ratio d'embryons transférés frais versus transférés après congélation était d'environ de 49:51 mondialement, ce qui est représentatif de la situation en Amérique du Nord où ce ratio était de 45:55. En moyenne, chaque suroovulation a généré 6,2 embryons jugés «transférables». Du côté de la production in vitro, plus de 200 000 embryons transférables ont été produits mondialement, largement en Amérique du Sud (environ 49%) et en Amérique du Nord (environ 32%). En Amérique du Nord, 9252 embryons produits in vitro ont été répertoriés comme étant transférés en 2007. Mondialement, environ 88% des embryons in vitro ont été transférés directement à des porteuses sans congélation, alors que ce pourcentage augmentait à plus de 99% en Amérique du Nord. Toujours sur le plan mondial, un très faible pourcentage (0,5%) des

embryons produits in vitro était issu de la ponction transvaginale échoguidée des ovocytes (Thibier, 2008).

Puisque la production d'embryons in vitro entraîne des avantages évidents, des efforts sont requis en recherche pour optimiser les systèmes de production, afin d'augmenter en particulier le taux de blastocyste, le taux de gestation des embryons transférés et leur cryotolérance, bref, la qualité des embryons produits. L'amélioration des systèmes de production permettra une augmentation de la quantité d'embryons produits et une diminution des coûts de production, ce qui résultera en une plus grande accessibilité de ces technologies pour l'ensemble des producteurs de bovins laitiers.

La production in vitro

1. Maturation ovocytaire

À la naissance, les génisses possèdent un complexe ovarien contenant une banque de follicules primordiaux dans lesquelles se trouvent les ovogonies, aussi appelées cellules germinales primordiales. Celles-ci se divisent par une importante succession de mitoses. L'entrée en méiose suivant cette étape de multiplication marque le passage des ovogonies en ovocytes. Ceux-ci sont bloqués à la phase dictiée (stade diplotène) de la prophase I jusqu'à la puberté, en raison des inhibiteurs à la reprise méiotique produits par les cellules de granulosa et de la thèque (Thibault, 2001).

Dès la puberté et à chaque nouveau cycle sexuel, une nouvelle cohorte de follicules primordiaux et d'ovocytes est recrutée et se développe durant la folliculogénèse (Thibault, 2001). Synthétisé par les cellules de granulosa, kit ligand initie la folliculogénèse (Celestino, 2009). Les follicules primordiaux, qui ne sont entourés que de quelques cellules de granulosa aplaties passeront au stade de follicule primaire, stade caractérisé par la présence d'une simple couche de cellules de granulosa et par le début de la formation de la zone pellucide. Les follicules primaires passent alors au stade secondaire, caractérisé pour sa part par la présence d'une double couche de cellules de granulosa, la migration en périphérie des mitochondries, l'élaboration des granules corticaux et le début de la synthèse d'ARNs. L'accroissement du diamètre ovocytaire est expliqué par l'activité transcriptionnelle importante dans le noyau de l'ovocyte, alors que le contenu en ARN total peut augmenter de 300 fois par rapport à la quantité initiale. Finalement, le stade follicule tertiaire est atteint avec la formation de l'antrum, le remplissage de liquide folliculaire, la présence d'une zone pellucide complètement élaborée, des jonctions gap zone pellucide/cellules du cumulus fonctionnelles et l'acquisition de la compétence à reprendre la méiose (follicule de 1 à 2mm de diamètre). La diminution, voire même l'arrêt total de l'activité transcriptionnelle, coïncide avec la capacité de reprise de la méiose lorsque l'ovocyte a atteint un diamètre d'environ 110 μm (Fair, 2003). Toujours au stade tertiaire mais seulement lorsque le diamètre folliculaire atteint 3 à 4mm, la dépendance de l'ovocyte

à l'hormone folliculo-stimulante (FSH), produite par l'hypophyse sous l'effet d'une décharge de GnRH par l'hypothalamus, favorise l'accroissement du diamètre folliculaire et du nombre de cellules de *granulosa*. C'est également à cette étape que surviendra le recrutement du follicule dominant, lequel sera, de façon générale, le premier follicule à atteindre le diamètre de 8,5mm, coïncidant avec l'apparition des récepteurs à la LH. Le follicule dominant devient progressivement à ce stade dépendant de la LH et ses cellules de *granulosa* sécrètent l'inhibine qui exercera une rétroaction négative sur la sécrétion de la FSH par l'hypophyse. Les follicules moins développés qui n'ont pas de récepteurs de LH et qui sont, par conséquent, dépendants à la FSH se dirigent alors vers l'apoptose (Sirard, 2009).

a. Maturation moléculaire

Plusieurs molécules interagissent dans les COCs lors de la maturation ovocytaire. Tout d'abord, les protéines kit-ligand sont responsables de l'augmentation du nombre de cellules de la *granulosa* et de la différenciation des cellules de la thèque, de la formation de l'antra folliculaire et de l'initiation de la croissance folliculaire. Chez la souris, GDF9 est également impliqué dans la croissance folliculaire et son absence provoque l'arrêt complet de la folliculogénèse au stade primaire. De son côté, BMP15 (GDF9B) va permettre la différenciation des cellules de *granulosa* en cellules du cumulus et la protection de ces dernières contre l'apoptose (Feuerstein, 2006). Plus tard, soit pendant la période périovulatoire, GDF9 va favoriser l'expansion des cellules du cumulus et la mucification, c'est-à-dire la sécrétion d'acide hyaluronique qui aura comme effet l'amoncellement des cellules du cumulus autour de l'ovocyte dans une matrice visqueuse. En plus de transmettre la signalisation des gonadotrophines à l'ovocyte mais aussi pour permettre une action maximale de GDF9 sur l'expansion des cellules du cumulus, les jonctions communicantes permettent également le transfert de petites molécules. En effet, chez la souris, Eppig et al. (2005) ont démontré que l'absorption des acides aminés se fait par les cellules du cumulus, tout comme l'absorption du glucose qui est

métabolisé en pyruvate et transféré par la suite à l'ovocyte par les jonctions communicantes.

b. Maturation nucléaire

La maturation nucléaire est caractérisée par l'acquisition de la compétence à reprendre la division méiotique par l'ovocyte, étape durant laquelle la première méiose sera complétée avec l'extrusion du premier globule polaire. Chez les mammifères, de hauts niveaux d'AMP cyclique et de GMP cyclique seraient nécessaires pour maintenir l'arrêt méiotique, alors que GMPc, inhibiteur de l'activité de la phosphodiesterase PDE3A dans l'ovocyte, empêche l'hydrolyse d'AMPc. Cependant, lors de la décharge de LH, une baisse de GMPc est observée, permettant l'activité d'hydrolyse d'AMPc par PDE3A et favorisant la reprise méiotique (Vaccari, 2009). L'enveloppe de la vésicule germinale se met alors à plisser, les pores nucléaires disparaissent et, finalement, l'enveloppe éclate et disparaît. L'ovule passe ainsi du stade GV (germinal vesicle) au stade GVBD (germinal vesicle breakdown) (Woudenberg, 2004). Lors du passage du stade GV à GVBD, les chromosomes se contractent en parallèle, ce qui inhibe les activités transcriptionnelles. Le nucléole est rapidement dissout dans le cytoplasme mais des saccules à double paroi s'accumulent près du complexe de réticulum endoplasmique. Celles-ci formeront les enveloppes nucléaires des pronoyaux suite à la fécondation. Les ovocytes sont alors ovulés en étant bloqués au stade métaphase de la seconde méiose (Thibault, 2001).

Cependant, dans le processus de maturation *in vitro*, le complexe ovocyte-cumulus (COC) est ponctionné à même le follicule, à un stade immature précédent le pic de LH qui provoque l'ovulation. La reprise de la méiose a lieu au moment de la ponction du COC et de sa mise en maturation (Thibault, 2001).

Le milieu standard utilisé durant les 22 h que dure la maturation est généralement le TCM199 (tissu culture medium) contenant des sels minéraux, des sources de

carbone, d'énergie (glucose, glutamine), d'acides aminés et de vitamines. À ce milieu de base est ajouté dans des proportions variables du sérum fœtal bovin, du pyruvate et des hormones (LH, FSH). L'œstradiol est également ajouté dans le but d'augmenter l'activité réparatrice de l'ADN-polymérase β (Thibault, 2001). Les COCs qui sont mis en maturation sont ponctionnés de follicules entre 2 et 6mm. Les follicules situés dans cette classe sont les plus intéressants en production in vitro, en particulier en raison de leur nombre élevé dans le complexe ovarien. Déjà à 2mm de diamètre folliculaire, la taille maximale de 120 μm de l'ovocyte est déjà atteinte, même si la maturation ovocytaire finale sous l'action du LH n'est pas amorcée, celle-ci prenant seulement place chez les follicules dominants ayant atteint 8,5mm de diamètre. Les ovocytes provenant des follicules dominants ne sont pas désirables en production in vitro en raison de leur petit nombre par ovaire (normalement 0 ou 1), mais aussi en raison de la présence du haut taux de facteurs coagulants (fibrinogène) dans le liquide folliculaire, rendant ceux-ci difficiles à récolter. Suite à la ponction, une sélection des COCs est effectuée. Ainsi, les COCs dont les cellules du cumulus sont absentes totalement ou partiellement, qui ont un cytoplasme très foncé ou qui présentent des points noirs (signe d'atrésie) dans le cytoplasme ou dans le noyau sont laissés de côté. La mauvaise compétence au développement des COCs qui présentent peu de cellules somatiques peut être expliquée entre autres par l'état atrétique avancé du follicule (Feuerstein, 2006).

Chez le bovin, le stade GVBD (condensation de la chromatine, disparition du noyau et désintégration de la membrane nucléaire) est atteint de 6 à 8 heures après la mise en maturation et se caractérise par une activité transcriptionnelle nulle (Woudenberg, 2004). Cette phase, menant à la métaphase I, persiste de 8 à 10h suivant l'initiation de la maturation. Par la suite, l'anaphase I et la télophase I se succèdent entre 10 et 13h, avec la formation de microtubules qui viennent se fixer aux kinétochores sur les chromosomes, alors que ces derniers migrent vers des pôles opposés. Cette première division méiotique est réductionnelle avec le passage d'un génome diploïde à un génome haploïde avec l'expulsion du premier globule polaire. L'ovule atteint le stade métaphase II environ 22h après la mise en maturation et un

nouveau blocage de la méiose est observé. La deuxième division méiotique, équationnelle pour sa part (perte d'un complément chromatinien, soit le chromosome père, soit le chromosome mère), ne surviendra qu'après la fécondation, suivie de l'éjection du 2^e globule polaire (Thibault, 2001).

c. Maturation cytoplasmique

Les granules corticaux, en partie formés lors du développement cytoplasmique mais aussi par l'influence de l'appareil de Golgi au stade GVBD, vont fusionner à la membrane plasmique suite à une décharge de calcium. Suite à la pénétration du premier spermatozoïde, les granules corticaux peuvent expulser leurs enzymes qu'ils contiennent dans la zone périvitelline (entre la zone pellucide et la membrane plasmique), entraînant la modification des glycoprotéines de la zone pellucide. La protéine ZP3, qui est le site de fixation des spermatozoïdes, est altérée par ces derniers et les spermatozoïdes ne peuvent plus digérer la zone pellucide. Il s'agit de la réaction corticale (Thibault, 2001).

Cette migration des granules corticaux s'accompagne également de celle des mitochondries et de l'appareil de Golgi grâce aux microtubules. Au passage du stade GV à GVBD, une réorganisation des mitochondries autour de la vésicule germinale est essentielle, puisque, sans ce regroupement, la maturation pourrait être stoppée par manque d'énergie (ATP) au stade métaphase I. Également, il a été observé que la couche sous-corticale constituée de filaments d'actine tend à s'amplifier et à garder l'ovocyte au stade métaphase II jusqu'à la pénétration du spermatozoïde. Ces filaments d'actine participent également à l'élaboration du pont cytoplasmique qui mène à l'expulsion des deux globules polaires (Thibault, 2001).

2. La «compétence» de l'ovule

Bien qu'approximatif et flou, le concept de compétence de l'ovule est associé à l'habileté d'un ovule à produire un zygote «normal» ainsi qu'à la capacité de celui-ci à

se développer jusqu'à la reprise de la transcription transcription, grâce à une maturation nucléaire et cytoplasmique optimale. Cependant, la compétence de l'ovule n'est pas seulement associée à la réussite ou à l'échec de la phase de maturation, mais aussi à la grosseur du follicule d'où origine l'ovule et les conditions de ponction des COCs.

a. Grosseur du follicule

La grosseur des follicules lors de la ponction des COCs pour la mise en maturation in vitro semble avoir un impact sur la compétence au développement future de l'embryon. En production in vitro, les COCs qui sont mis en maturation sont ponctionnés de follicules entre 2 et 6mm. C'est donc dire que les ovules provenant de follicules dominants ne sont pas ponctionnés, pour des raisons précédemment mentionnées.

Malgré cette pratique, plusieurs études ont démontré que les ovules provenant de follicules plus gros que 6mm ont une compétence développementale significativement plus élevée que ceux provenant de follicules plus petits que 6mm (Lonergan, 1994) et que les ovules qui proviennent de follicules plus gros que 6mm ont plus de chance d'atteindre le stade blastocyste que les autres (Rizos, 2002). Il faut dire qu'un follicule dominant de diamètre moyen de 4mm prend environ 5 jours pour atteindre un diamètre de 15mm, alors que la maturation in vitro ne dure qu'une journée (Driancourt, 1991). De plus, Assey et al. (1994) affirment que la décharge préovulatoire de LH apporte certaines modifications dans la morphologie du cytoplasme et du noyau qui sont essentielles pour l'acquisition de la compétence développementale. Puisque la majorité des ovules utilisés pour les recherches sont ponctionnés d'ovaires de vaches de réforme, ces ovules n'ont pas eu de décharge de LH.

Cependant, contrairement à Rizos et al. (2002), d'autres études en sont arrivées à la conclusion que les ovules provenant de follicules de diamètre entre 2 et 6mm et

6mm et plus ont des chances équivalentes d'atteindre le stade blastocyste (Tan and Lu, 1990; Pavlok, 1992), suggérant que des variations inter-laboratoires existent. Ces variations peuvent être expliquées par l'origine des ovules (race des femelles, temps entre la récolte et la mise en maturation, etc.), les milieux de développement (présence et/ou constitution du sérum / BSA, additifs, etc.) et l'environnement de culture (température, conditions gazeuses, etc.). Par contre, il semble être accepté que les ovules provenant de follicules plus petits que 1mm ont une compétence développementale plus faible que les autres (Driancourt, 1991; Pavlok, 1992). Pavlok et al. (1992) et Tan and Lu (1990) vont même jusqu'à affirmer que les follicules de moins de 2mm engendrent des ovules dont le développement est bloqué à 8 cellules. De plus, les ovules provenant de follicules plus petits que 2mm semblent démontrer des anomalies lors de la fécondation. Ces anomalies sont le retard de développement du pronoyau mâle (Fulka, 1982) et la distribution irrégulière des granules corticaux ainsi qu'une mauvaise activité d'exocytose de ceux-ci, résultant en un niveau plus élevé de polyspermie (Hyttel, 1989). Pavlok et al. (1988) avancent que ces anomalies sont associées à une maturation cytoplasmique incomplète, relative à un certain niveau d'atrésie du follicule surtout remarqué chez les petits follicules.

b. Morphologie de l'ovule

Blondin et Sirard (1995) ont ciblé certaines caractéristiques propres à des COCs dont les ovules ont une compétence au développement plus élevée. Ainsi, ils ont remarqué que les COCs avec une expansion partielle ont davantage de compétence pour se développer que ceux qui possèdent un cumulus compact, ceux qui possèdent peu ou pas de cellules du cumulus ainsi que ceux qui démontrent une expansion du cumulus partielle mais avec présence d'agglomérations cellulaires foncées. Les ovules les plus beaux en apparence (ovules avec cumulus compact) sont non seulement moins compétents que ceux avec une expansion partielle, mais il semblerait aussi que les ovules qui possèdent quelques cellules du cumulus en atrésie seraient davantage compétents. Cette observation laisse donc présager que

L'ovocyte pourrait acquérir sa compétence au développement seulement vers la fin de la folliculogénèse avec une différenciation induite par les pulsions de LH (maturation cytoplasmique) et que celui-ci conserverait cette compétence même si des signes plus ou moins précoces d'atrésie sont apparents. Ainsi, certains ovules démontrant des signes d'atrésie modérément avancée pourraient avoir une compétence au développement aussi intéressante qu'un ovule avec un cumulus compact. Finalement, toujours selon Blondin et Sirard (1995), la présence de cellules atrétiques n'est pas fonction de la grosseur du follicule, alors que tous les diamètres folliculaires semblent pouvoir en contenir, ce qui est logique puisque seul un ovocyte sera ovulé et que les autres seront condamnés à l'apoptose.

c. Phénomène de maturation post-mortem

Considérant le prix très élevé de la ponction transvaginale échoguidée (PTV) sur des sujets vivants, des COCs ponctionnés d'ovaires prélevés des vaches abattues sont généralement utilisés. Tout dépendant de la distance entre l'abattoir et le centre de recherche, les COCs peuvent être mis en maturation plus ou moins rapidement. Malgré ce qu'on pourrait croire a priori, une étude a démontré que la compétence au développement n'est pas plus élevée pour les ovules qui sont rapidement transférés dans un milieu de maturation. En fait, en conservant les ovaires dans une solution saline à 30°C, il a été démontré que les ovules qui se sont les mieux développés au stade morula sont ceux dont la ponction a été réalisée 4h après abattage, par rapport à ceux ponctionnés tôt (2h) ou tard (6h) après abattage. Ce phénomène appelé *maturation post-mortem* suggère qu'un changement dans l'environnement folliculaire survient après abattage. Ainsi, si les COCs sont ponctionnés très tôt ou trop tard, ceux-ci vont posséder une compétence moins élevée à se développer dans un environnement in vitro (Blondin, 1997).

d. Température de ponction des COCs

Pollard et al. (1996) ont démontré que l'exposition des COCs à des températures en-dessous de 35°C entraînait une baisse significative du taux de blastocyste après fécondation et culture *in vitro*, par rapport aux COCs ponctionnés et maintenus à des températures de 35°C et plus. L'hypothèse avancée par l'étude est que la baisse de température en-deçà de 35°C pourrait affecter le cytoplasme, celui-ci contenant par ailleurs les transcrits maternels. Cette situation pourrait alors entraîner la dégradation de transcrits et un endommagement des organites responsables de l'activité transcriptionnelle, limitant du même coup la capacité des ovocytes à atteindre le stade de blastocyste. De plus, des études ont démontré que le maintien des COCs à des températures sous-physiologiques peut entraîner des anomalies chromosomiques, même si celles-ci ne durent que de brèves périodes. Ces anomalies pourraient provoquer une diminution de la capacité développementale de l'ovule (Barnes, 1988). Parallèlement, les ovules maintenus dans un environnement plus frais ne pourrait pas allonger En effet, l'allongement de la queue poly(A) des ARNm pourrait être compromis par une température trop basse (Tremblay, 2005).

Malgré ces études, il est difficile en pratique de maintenir les COCs à une température de 35°C en raison de la distance à parcourir entre l'abattoir et le laboratoire de recherche, le temps que nécessite la ponction ainsi que la sélection des COCs. À chacune de ces étapes, la température baisse de façon progressive. Ainsi, il peut être logique de supposer que l'exposition des COCs à des températures avoisinant la température pièce n'est pas aussi dommageable que le choc thermique subit par les COCs lorsqu'ils sont transférés dans le milieu de maturation à 38,5°C.

Dans un même ordre d'idées, Loskutoff et al. (1993) ont observé que le refroidissement des ovules et des embryons en culture lors du transfert des COCs / zygotes / embryons dans les différents milieux de culture (réalisé à température pièce) peut avoir des effets négatifs sur le développement futur des embryons. De façon générale, la température d'incubation des ovules en maturation et en

fécondation ainsi que des embryons en développement est d'environ 38,5°C, ce qui correspond à la température corporelle bovine.

e. Ovocytes issus d'une superovulation

Bien souvent, la production in vitro appliquée à des fins commerciales est effectuée suite à un processus de suroovulation dans le but de générer le plus d'ovocytes possible pour le développement in vitro. Il a été observé que les ovules provenant d'une suroovulation présentaient une compétence au développement moindre que les ovules produits in vivo sans stimulation. Cette situation peut être expliquée par le fait qu'avec un nombre de follicules «dominants» plus élevé, la maturation finale de l'ovule sous l'action du LH risque d'être réduite en durée, diminuant du même coup la compétence au développement. Plus précisément, la maturation cytoplasmique ne serait pas complètement achevée, alors que la migration des granules corticaux et le réarrangement des mitochondries ne sont pas correctement réalisés chez les ovocytes issus d'un processus de suroovulation. Lerner et al. (1986) avancent aussi que plus le nombre de gros follicules augmente, moins l'ovaire est capable de suffire aux besoins de ceux-ci, l'ovaire bovin n'étant pas vascularisé pour supporter ce nombre de follicules.

3. Fécondation in vitro

Au stade métaphase II, c'est-à-dire environ 22h à 24h après l'initiation de la maturation de l'ovule in vitro, la fécondation in vitro peu prendre place. Comme les spermatozoïdes fraîchement éjaculés ou prélevés directement de l'épididyme n'ont pas la compétence de pénétrer les cellules du cumulus ni de se lier à la protéine ZP3 de la zone pellucide sans avoir transité dans le tractus génital femelle, les spermatozoïdes utilisés pour la fécondation in vitro doivent subir une capacitation in vitro. Cette capacitation est réalisée in vitro grâce en particulier à la présence d'héparine. Le milieu de fécondation est également constitué de sels, d'albumine, contenu dans le BSA (bovine serum albumin), et de pyruvate. Le BSA est également

utile pour augmenter l'osmolarité (riche en macromolécules) et ainsi diminuer l'adhésion des COCs entre eux. Les spermatozoïdes et les ovules demeureront pendant 15 à 18h dans ce milieu (Thibault, 2001).

Plus précisément, la capacitation du spermatozoïde peut être définie comme l'habilité de celui-ci à atteindre une motilité hyperactivée, d'interagir avec la zone pellucide de l'ovule, d'exécuter la réaction acrosomale et d'initier la fusion entre sa membrane plasmique et l'ovule (Yanagimachi, 1994). La capacitation est un processus complexe où plusieurs modifications surviennent dans le spermatozoïde, dont l'augmentation de la fluidité membranaire suite à une diminution de la concentration de cholestérol, un flux ionique qui vient modifier le potentiel membranaire, ainsi que la phosphorylation de certaines protéines (Rajesh, 2004). La phosphorylation est une modification post-traductionnelle caractérisée par l'ajout d'un groupement phosphate qui induit une modification allostérique et change la conformation tertiaire d'une protéine, menant à l'activation ou à l'inactivation de celle-ci.

Encore aujourd'hui, le rôle spécifique de la phosphorylation des tyrosines dans le processus de capacitation du spermatozoïde est peu compris. Concernant l'interaction entre la zone pellucide et la tête du spermatozoïde, Asquith et al. (2004) ont identifié deux protéines chaperonnes phosphorylées (erp99 et hsp60) qui s'expriment près de la membrane plasmique de la tête du spermatozoïde chez la souris. L'activation de ces protéines par la phosphorylation des tyrosines pourrait entraîner des changements de conformation de la membrane plasmique de la tête du spermatozoïde menant à la formation d'un récepteur fonctionnel des protéines de la zone pellucide (Asquith, 2004). Pour enclencher l'hyperactivation du flagelle, la perte de cholestérol, un influx de Ca^{++} , l'augmentation de l'AMPc et la phosphorylation de protéines flagellaires seraient requis. Ces bouleversements dans la constitution de la membrane plasmique rendent celle-ci plus perméable, mettent plus apparent les récepteurs spermatiques, accélèrent le mouvement flagellaire et permettront plus tard la réaction acrosomique. De façon générale, la capacitation du spermatozoïde dure 4h (Parrish, 1988).

Lors de la traversée du spermatozoïde au travers des cellules du cumulus, la réaction acrosomale est initiée. Celle-ci est caractérisée par la fusion de la membrane extérieure de l'acrosome (membrane nucléaire du spermatozoïde) et de la membrane plasmique, puis par leur disparition totale, menant à la libération d'enzymes, dont l'hyaluronidase qui viendra hydrolyser l'acide hyaluronique qui est présente autour de la zone pellucide de l'ovule. Cette enzyme facilitera l'arrivée du spermatozoïde jusqu'à la zone pellucide, où les récepteurs spermatiques de l'acrosome, maintenant dénudés, iront se fixer à la protéine ZP3, suite à la dépolymérisation de la protéine ZP1 par une autre enzyme provenant de l'acrosome, l'acrosine. Une fois la membrane acrosomique externe et la membrane plasmique fusionnées, une deuxième fixation, à la protéine ZP2 cette fois-ci, survient. Le spermatozoïde, grâce à sa force motrice, sera incorporé dans la zone pellucide. Une troisième enzyme acrosomique, la β -N-acétylglucosaminidase, permettra de couper les liens entre le spermatozoïde et la ZP2 et la ZP3. La réaction corticale suivra par la suite (Thibault, 2001).

L'entrée du spermatozoïde dans le cytoplasme déclenche une entrée importante de Ca^{++} , augmentant du même coup le métabolisme et provoquant une synthèse protéique massive. Dans un laps de temps de 18 h, la méiose reprend, l'expulsion du 2^e globule polaire survient et le pronoyau maternel (membrane nucléaire comprenant les chromosomes haploïdes maternels) apparaît. Parallèlement à ces développements maternels, le spermatozoïde perd sa membrane nucléaire, sa chromatine se décondense par le remplacement des protamines par des histones et le pronoyau se forme. Finalement, le pronoyau mâle produit des filaments (centriole spermatique) vers le pronoyau féminin qui résulte en la migration et la fusion des deux pronoyaux pour former un noyau 4n chromosomes (phénomène d'amphimixie) qui se divisera par la suite en deux cellules à 2n chromosomes. Il est également à noter que les mitochondries d'origine paternelle sont dénaturées peu après la pénétration du spermatozoïde (Thibault, 2001).

4. Développement embryonnaire

a. In vitro

Entre 15 et 18h suivant la fécondation in vitro, les zygotes seront transférés, après dénudation des cellules du cumulus, dans un milieu de développement, variable selon les laboratoires, mais contenant généralement du glucose, du lactate, du pyruvate, des sels, du sérum, du BSA, des acides aminés essentiels et non-essentiels, etc. Les cellules de cumulus sont indésirables pour le développement embryonnaire in vitro puisqu'elles épuisent le milieu, peuvent enclencher une réaction de nécrose menant à la dégénérescence de l'embryon ou encore provoquer l'agglutination des embryons dans le milieu. Encore une fois dépendant des protocoles, les embryons seront transférés quelques fois dans des milieux de développement semblables jusqu'au stade blastocyste, normalement atteint entre le 6^e et 8^e jour de culture chez le bovin (Thibault, 2001).

Le zygote ainsi formé suite au phénomène d'amphimixie entre dans un processus de divisions cellulaires, la segmentation, qui scindera le zygote en plusieurs parties appelées blastomères, et ce, de façon synchrone ou asynchrone. Le stade 2 blastomères est atteint environ 33 à 44h suivant la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule (Sirard, 1985).

Le stade morula est atteint après 4 à 5 divisions cellulaires, soit entre 16 à 32 cellules (blastomères), environ entre le 3^e et 4^e jour après la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule. C'est à ce stade qu'il y a les premières différenciations cellulaires et l'acquisition de la polarité. Le stade jeune blastocyste est caractérisé par l'apparition d'une cavité intercellulaire, nommée blastocœle; la couche de cellules périphériques plutôt plates et entassées est désignée trophoctoderme et l'amas de cellules plus sphériques agglutinées sur le trophoctoderme est désigné embryoblaste. Le trophoctoderme permettra plus tard l'attachement de l'embryon à la muqueuse utérine, alors que des cellules de l'embryoblaste découlera le fœtus. Selon les milieux de culture in vitro utilisés, le stade blastocyste sera atteint

normalement vers le 5^e ou 6^e jour du développement embryonnaire. Les cellules du trophoctoderme vont également pomper du sodium à l'intérieur de la cavité blastocelique, déclenchant du même coup l'entrée d'H₂O par réaction osmotique. Maintenant en expansion, le blastocyste va également voir ses cellules du trophoctoderme sécréter la trypsine, une enzyme qui va s'activer à digérer la zone pellucide. La pression à l'intérieur de la zone pellucide deviendra trop élevée et celle-ci éclatera. Il s'agit de l'éclosion du blastocyste. Il est à noter que les embryons récoltés pour faire l'objet de transferts embryonnaires sont au stade morula ou jeune blastocyste, en raison du fait que la zone pellucide est encore en bon état (embryon moins fragile) (Thibault, 2001).

b. Abondance d'ARN

Jusqu'au stade 8 cellules environ, le développement embryonnaire est assuré par la traduction d'ARNm et par les protéines synthétisées durant le développement et la maturation de l'ovule. Jusqu'au stade 8 à 16 cellules, l'activité transcriptionnelle embryonnaire est quasi inexistante, celle-ci étant freinée par des inhibiteurs. Il est généralement admis que les embryons qui ne possèdent pas la compétence de développement arrêtent leur développement autour du stade de transition zygotique maternel (MZT), suggérant du même coup une incapacité du génome à activer sa propre machinerie transcriptionnelle (Sirard, 2005). Chez certaines espèces comme chez la souris, l'absence d'acétylation des histones dans la phase pré-MZT est également un inhibiteur important du transcriptome embryonnaire (Vigneault, 2004).

Ainsi, l'ARN, synthétisé lors de la croissance de l'ovule, est présent en dans un volume important dans le cytoplasme au moment de la fécondation (Vigneault, 2004). Au fur et à mesure que l'embryon se développe, celui-ci a besoin de protéines et la réserve en transcrits maternels diminue jusqu'au stade 8 cellules, où l'activité transcriptionnelle connaît un nouvel essor, jusqu'à atteindre un niveau normal au stade blastocyste (Robert, 2002).

À partir du stade 8 cellules, la reprise de la transcription peut être assurée par différents facteurs impliqués dans le changement de la conformation de la chromatine. Ainsi, les histones acétyltransférases (HAT) mènent à l'acétylation de la queue des nucléosomes et par la suite à la décondensation des chromatines, rendant du même coup l'ADN davantage accessible à la machinerie transcriptionnelle. Les protéines HMG (high mobility group), des protéines chromosomales qui sont un élément structurel de la chromatine, peuvent également modifier la conformation des histones dans le but de permettre la transcription. Grâce à ce changement de conformation, la chromatine décondensée permet le codage de facteurs transcriptionnels, essentiels pour aider l'ARN polymérase II à initier la transcription (Vigneault, 2004).

La qualité de l'embryon

Tout comme le concept de «compétence de l'ovule», le concept de «qualité de l'embryon» est plutôt mal défini. Dans la littérature scientifique, la qualité de l'embryon est généralement associée à l'habilité d'un blastocyste à s'attacher à la paroi utérine et d'engendrer non seulement une gestation normale, mais aussi et surtout un descendant viable, sain et dépourvu d'anomalies. Certains chercheurs vont également parler de qualité de l'embryon pour la capacité d'un embryon à résister à la congélation (cryotolérance). Au fil de la publication des résultats de recherche concernant la production in vitro, certains facteurs ont été appréciés et font maintenant office de «normes de la qualité embryonnaire». En fait, les caractéristiques des embryons produits in vivo sont souvent la référence pour juger de la qualité des embryons produits in vitro. Même si la définition et même la pertinence de ces facteurs sont souvent remises en question, certains semblent rallier plusieurs chercheurs.

1. Normes de la qualité d'un embryon

a. Clivage

La première segmentation du zygote survient à des moments différents selon le mode de production in vivo ou vitro. En effet, les embryons produits in vivo ont tendance à être plus précoces pour la première division cellulaire qui survient environ entre 24 et 28h après l'ovulation (Thibault, 2001). Chez les embryons produits in vitro, la première division cellulaire a plutôt lieu entre 33 et 44h après la mise en contact du COC avec des spermatozoïdes capotés (Sirard, 1985). De plus, il a été remarqué que les embryons qui démontraient une division cellulaire tôt après la fécondation avaient davantage d'aptitude pour atteindre le stade blastocyste (Lonergan, 1999).

Également, il a été démontré dans plusieurs études que le développement embryonnaire, incluant le moment de la première division cellulaire, est fonction du

sexe. De façon générale, les embryons mâles se développent plus rapidement que les embryons femelles, et ce, durant les 7 à 8 premiers jours suivant la fécondation (Avery, 1989).

Durant la production *in vitro*, il est estimé qu'environ 90% des ovules immatures ont la compétence de passer du stade prophase I jusqu'au stade métaphase II (stade où la fécondation peut être possible), alors que 80% des ovules atteignent l'étape de la première division cellulaire (Lonergan, 2006). Par conséquent, le taux de clivage n'est pas un indicateur très puissant de la compétence future au développement d'un embryon.

b. Taux de blastocyste

De façon générale, il est admis que la production *in vitro* ne donne pas des taux de blastocystes équivalents à ceux de la production *in vivo*. Plusieurs études ont publié des résultats au cours des années, et ceux-ci sont de l'ordre d'environ de 30 à 40% versus 40 à 80%, respectivement pour le taux de blastocyste de la production *in vitro* et de la production *in vivo* (Lonergan, 2006).

Outre le milieu de culture qui sera traité plus tard, parmi les facteurs qui peuvent avoir un impact sur le taux de blastocyste des embryons produits *in vitro*, l'immaturation des ovules ponctionnés de follicules de 1 à 3mm peut certainement avoir un effet négatif (Pavlok, 1992; Lonergan, 1994). La ponction de follicules immatures empêcherait une partie de la maturation moléculaire, alors que la synthèse de protéines à l'intérieur de l'ovocyte survient à la dernière phase de maturation, ces protéines étant essentielles pour le développement ultérieur de l'embryon (Dieleman, 2002). La maturation cytoplasmique pourrait elle aussi être affectée, en considérant le fait que la décharge de LH a lieu *in vivo* mais pas *in vitro*, et que cette décharge entraîne un meilleur alignement des granules corticaux et une meilleure réaction corticale (Thibault, 2001). La plus grande fréquence de blastomères polyploïdes, le développement plus lent, la fragilité accrue de la zone pellucide et la plus faible

communication intercellulaire chez les blastocystes produits in vitro peuvent venir expliquer, en partie du moins, le taux de blastocyste plus faible dans la production in vitro. Finalement, la quantité plus limitée d'ARN chez les embryons produits in vitro versus ceux produits in vivo peut également être évoquée (Wrenzycki, 1999). Un plus faible volume de transcrits entrainerait logiquement une synthèse moins élevée de protéines et un développement embryonnaire plus lent.

c. Taux de gestation

L'amélioration du succès du transfert embryonnaire est encore l'objet de recherche et de développement. Cependant, l'implantation d'embryons issus de production in vitro et in vivo présentent un taux de gestation équivalent selon plusieurs études (Hasler, 1994 Looney, 1994; Bousquet, 1999), malgré que le taux de blastocyste pour la production in vitro soit plus faible. Ce taux de gestation varie passablement selon les études, passant d'environ 40% à plus de 60% dans d'autres. Cependant, certaines études démontrent des taux de gestation plus faibles pour les embryons produits in vitro, dont Farin et al. (2001) qui a observé une baisse de 42% du taux de gestation pour ces derniers. De son côté, Hasler et al. (1994) a pour sa part observé une baisse de 24% du taux de gestation des embryons produits in vitro versus ceux produits in vivo lorsque les embryons ont été congelés avant le transfert embryonnaire. Cette variabilité de résultats peut être causée par des variations inter-laboratoires (origine des ovules, milieux de développement, environnement de culture, etc.)

Si le taux de gestation obtenu à 35 jours est sensiblement identique pour ces deux techniques de procréation assistée chez certains chercheurs, Bousquet et al. (1999) ont remarqué que la mortalité embryonnaire du jour 30 au jour 60 est plus élevée pour les embryons issus de la production in vitro. Plusieurs théories peuvent expliquer cette situation dont les différences morphologiques, mais aussi l'«effet maternel», alors que les vaches donneuses exploitées pour cette étude présentaient des problèmes de fertilité (Bousquet, 1999).

Finaleme nt, Edwards et al. (1984) ont rapporté que les embryons humains qui ont atteint le stade 8 cellules 55 heures et moins après la mise en fécondation ont un taux de gestation près du double de ceux qui atteignent ce stade 56 heures et plus après la mise en fécondation.

2. Phénotypes de l'embryon

a. Cryotolérance de l'embryon

Il est généralement admis que les embryons issus de la production in vitro sont moins tolérants à la congélation que ceux produits in vivo (Pollard, 1994). Cette différence peut être expliquée par la présence d'une quantité supérieure de gouttelettes lipidiques à l'intérieur du cytoplasme des embryons cultivés in vitro. La congélation de celles-ci peut entraîner la formation de cristaux qui peuvent créer des dommages important à l'intérieur de l'embryon et parfois même occasionner sa mort.

La présence de ces gouttelettes peut être provoquée par plusieurs facteurs, dont une insuffisance métabolique des mitochondries. En effet, la densité des mitochondries à l'intérieur des embryons produits in vitro est moindre que pour ceux produits in vivo (Crosier, 2001). Le plus faible nombre de mitochondries entraîne une baisse de la production d'énergie mais aussi une plus grande quantité de lipides à l'intérieur du cytoplasme, l'énergie excédentaire puisée à même le milieu de culture étant stockée sous forme de lipides (Rizos, 2003). Également, le milieu de développement des embryons peut avoir un impact. L'utilisation de sérum, riche en lipides, est traduite par la présence d'une plus grande quantité de gouttelettes lipidiques à l'intérieur des cellules, entraînant du même coup une cryotolérance moindre (Ferguson, 1999).

La grosseur du follicule dont l'ovocyte est ponctionné peut également avoir un effet sur sa cryotolérance. Il n'y aurait pas seulement la compétence au développement qui serait réduite pour un ovocyte provenant d'un petit follicule; la cryotolérance serait réduite du même coup (Lonergan, 1994). Ce constat pourrait être expliqué par le fait qu'un ovocyte provenant d'un petit follicule est moins viable, se développe plus

lentement et devient plus sensible aux stress de l'environnement, dont la cryoconservation.

Il est généralement observé que plus le stade de développement est avancé, plus l'embryon semble démontrer de capacité à tolérer la congélation, autant pour les embryons produits *in vitro* que *in vivo* (Wilmot, 1975). Malgré tout, à stade équivalent, les embryons produits *in vivo* semblent plus aptes à survivre à la congélation. Il n'est donc pas surprenant de constater que la vaste majorité des embryons produits *in vitro* ne sont pas congelés mais transférés frais.

Dans une autre optique, le meilleur mode de congélation et celui qui est le plus utilisé est la vitrification, celle-ci étant caractérisée par une congélation ultra rapide à -196°C dans l'azote liquide après le passage successif des embryons dans des solutions en concentration croissante en cryoprotecteurs. Cette méthode arrête de façon très rapide le métabolisme, inhibe les réactions biochimiques qui mèneraient à la mort de l'embryon et empêche la formation de cristaux de glace intra et extracellulaire, réduisant du même coup les dommages de la congélation sur l'embryon. Moins efficace, la congélation classique, qui consiste à déshydrater les embryons suite à leur passage dans une solution comprenant un cryoprotecteur suivi d'une phase de congélation lente (-7°C , -35°C , -196°C), peut entraîner des dommages irréparables, causés par la formation de cristaux de taille plus ou moins importante (Thibault, 2001).

b. Ratio mâle / femelle

Chez les mammifères, c'est le spermatozoïde qui détermine le sexe de l'embryon. En effet, le spermatozoïde portant un chromosome X entrainera un génotype XX (femelle) lors de la fusion des deux pronucléus alors que celui portant un chromosome Y entrainera un génotype XY (mâle) (Sekido, 2008).

En fait, le chromosome Y comporte un gène crucial qui provoque le développement des caractéristiques mâles chez les mammifères : Sry. La protéine produite par ce gène (SRY) pourrait modifier l'expression d'un gène : Sox9. Ce dernier serait très favorablement influencé par SRY et enclencherait le processus de formation des cellules de Sertoli et par le fait même de la différenciation testiculaire. Ainsi, en l'absence de l'expression de Sry (génotype XX) ou par son expression inappropriée dans le temps, la protéine β -catenin sera activée et mènera au développement du tissu ovarien et des follicules (Sekido, 2008).

Dans l'ensemble de la littérature scientifique, il est généralement admis que le ratio mâle / femelle résultant des embryons produits in vitro est d'environ 60:40 (Alomar, 2008). Chez le bovin, les embryons mâles ont tendance à se développer à un rythme plus rapide que les embryons femelles (Avery, 1989). Cette situation pourrait être expliquée par le fait qu'un des deux chromosomes X n'est pas encore inactivé chez la femelle. Contrairement au chromosome Y qui ne contient que peu de gènes, il est estimé que le chromosome X comprend environ 1000 gènes et que certains de ceux-ci pourraient être létales si doublement exprimés. C'est ainsi pourquoi l'inactivation du chromosome X survient tôt dans le développement embryonnaire, grâce au gène Xist qui encode pour un ARN non codant (ARN Xist). Le chromosome X paternel autant que celui maternel expriment ce gène, mais un des deux aurait une expression génique plus élevée que l'autre, entraînant l'inactivation de ce dernier. L'inactivation d'un chromosome X est donc réalisée grâce à la méthylation de l'ADN sur les résidus cystine, mais aussi par méthylation des histones. Le chromosome ainsi inactivé se rétracte, devient transcriptionnellement inactif et forme le corpuscule de Barr, suite à la modification de conformation des histones (Griffiths, 2006).

Bien que l'inactivation du chromosome X semble plutôt aléatoire entre l'exemplaire paternel versus l'exemplaire maternel dans la plupart des cellules, il existe cependant une inactivation à empreinte parentale dans les cellules du trophoctoderme chez les souris. Ainsi, dans les cellules qui formeront le placenta, l'inactivation sera automatiquement dirigée sur le chromosome X paternel. Les cellules de

l'embryoblaste suivraient tant qu'à elles un patron d'inactivation aléatoire et celui-ci surviendrait plus tard (Wrenzycki, 2002).

L'inactivation du chromosome X survient au stade jeune blastocyste chez les embryons bovins femelles produit in vitro, alors qu'il serait déjà inactivé au stade morula chez les embryons femelles produits in vivo. Au stade morula, il a été observé que les embryons femelles produits in vitro démontraient un niveau d'expression génique deux fois plus élevé pour la déshydrogénase glucose-6-phosphate (G6PD) ainsi que pour la phosphoglycérate kinase (PGK) que chez les morulas mâles. In vivo, un même niveau d'expression génique de G6PD et PGK était remarqué chez les embryons des deux sexes, suggérant l'inactivation plus précoce d'un chromosome X chez les femelles. Impliqué dans la désintoxication de radicaux libres dans les cellules, G6PD doit maintenir un certain équilibre oxydatif. Cependant, chez les embryons femelles produits in vitro, la concentration cellulaire de radicaux libres est très faible en comparant à avec celle des mâles, ce qui expliquerait leur retard de croissance in vitro. La double expression de PGK, une enzyme impliquée dans la glycolyse, pourrait quant à elle expliquer la plus grande sensibilité à la toxicité du glucose des cellules des embryons bovins femelles produits in vitro (Wrenzycki, 2002).

En effet, les milieux de culture peuvent également favoriser un sexe plutôt que l'autre. Par exemple, le glucose améliorerait le développement des embryons mâles et aurait l'effet inverse chez les embryons femelles, qui auraient un seuil de toxicité au glucose plus faible (Bredbacka, 1996). Dans une même optique, les embryons femelles seraient davantage affectés par des conditions de culture stressantes (changement de température, manipulations, congélation, etc.) que les embryons mâles (King, 1991). Déjà au stade morula, la proportion d'embryons mâles serait déjà plus élevée (Gutierrez, 2001).

Une autre avenue qui a été étudiée est l'impact du mâle utilisé pour la fécondation. Selon Alomar et al. (2008), un des taureaux qu'ils ont utilisé pour la fécondation in vitro a résulté en significativement plus d'embryons mâles que les autres. Cependant,

Madrid-Bury et al. (2003) n'ont observé aucune différence dans le ratio mâle/femelle avec l'utilisation de semence provenant de cinq mâles différents. De plus, cette étude a été réalisée avec six éjaculats de ces mêmes taureaux, sans qu'une différence significative entre les différents éjaculats ne soit observée concernant le ratio mâle / femelle. La théorie de l'effet mâle sur le ratio du sexe est relativement contestée dans la littérature scientifique.

De plus, Kochhar et al. (2003) ont observé une différence de ratio mâle / femelle, seulement en changeant la durée de fécondation in vitro. En effet, une fécondation in vitro d'une durée réduite de six heures entraînerait une prépondérance d'embryons mâles, alors qu'une durée de fécondation allongée ramènerait le ratio mâle / femelle à 1:1. Cette situation pourrait être expliquée par le fait que le spermatozoïde Y aurait un avantage sélectif lors des interactions avec l'ovule de courte durée, avantage qui serait perdu pour les plus longues durées de fécondations (Kochhar, 2003). Le spermatozoïde Y aurait également une hyperactivation et une capacitation plus précoce que les spermatozoïdes X. Le spermatozoïde Y aurait un mouvement davantage en ligne droite, ce qui lui donnerait une chance accrue pour féconder l'ovule (Penfold, 1998).

c. Syndrome du veau anormal

Un autre phénomène observé chez les veaux provenant d'embryons bovins produits in vitro est le «Syndrome du veau anormal» (Abnormal Offspring Syndrome). Hypothétiquement provoqué par les manipulations exécutées durant le protocole de production in vitro, ce syndrome entraîne entre autres des veaux au poids plus élevé à la naissance, de l'œdème fœtal ainsi qu'une fréquence d'avortement élevée. Plus particulièrement, l'utilisation du sérum dans le milieu de culture in vitro pourrait provoquer, selon certaines études, une augmentation du poids du veau à la naissance (Thompson, 1995; Sinclair, 2000). Bien entendu, l'accroissement du poids à la naissance peut provoquer la dystocie ainsi que l'augmentation des risques de mortalité périnatale (Farin, 2001).

En fait, l'expression génique d'un régulateur de croissance embryonnaire des embryons produits *in vitro* semble différente de ceux produits *in vivo*. Il a été observé que les fœtus provenant d'embryons produits *in vitro* ont une quantité d'ARN codant pour le gène IGF-II plus élevé. IGF-II (Insuline-like Growth Factor) est un facteur de croissance durant la croissance embryonnaire et fœtale qui non seulement régule la croissance mais également le développement du placenta, tout en favorisant les échanges entre le fœtus et le placenta. De plus, le gène qui code pour cette hormone peptidique est à empreinte parentale et, normalement, l'allèle maternel n'est pas actif. Avec la production *in vitro*, il semble qu'il y ait présence d'un dérèglement épigénomique, occasionné par l'environnement *in vitro* (condition thermique, gazeuse, photonique, métabolique, etc.), qui mènerait à une hypométhylation du gène maternel (de l'ordre de 10 à 30% pour le foie, les reins et le placenta), entraînant du même coup une surexpression d'IGF-II. Cette surexpression peut provoquer un accroissement du poids du fœtus (Curchoe, 2009).

Comme IGF-II joue un rôle sur le développement des caroncules et des cotylédons, ceux-ci sont davantage développés chez les fœtus provenant de la production *in vitro*. De plus, le volume de liquide amniotique ainsi que le poids du placenta semblent plus élevés pour les fœtus provenant d'embryons produits *in vitro*. Cependant, le nombre de caroncules et de cotylédons ainsi que le niveau de vascularisation est généralement inférieur, ce qui peut augmenter l'incidence à l'avortement (Loi, 2006).

Finalement, dans une étude se concentrant sur l'expression génique d'IGF-II dans les tissus fœtaux bovins au jour 70 de la gestation, Blondin et al. (2000) ont observé des niveaux anormaux d'ARNm de ce gène dans le foie et dans les muscles squelettiques chez les fœtus mâles provenant d'embryons produits *in vitro*. De façon générale, une variation plus importante de l'expression génique d'IGF-II a également été observée chez les fœtus provenant d'embryons produits *in vitro*. Bien que l'étude n'a pas mesuré ces paramètres, les auteurs posent l'hypothèse que les conditions *in vitro* puissent également altérer l'expression des gènes codant pour les récepteurs d'IGF-II,

soit Igf2r (IGF Type-II receptor) et H19, ce qui entrainerait une variation de l'activité d'IGF-II. En effet, Igf2r réduit cette activité en liant, internalisant et dégradant IGF-II, alors que H19, un long ARN non-codant, module l'expression génique d'IGF-II.

d. Fréquence des avortements

La majorité des études démontrent une plus grande fréquence des avortements pour les embryons provenant de la production *in vitro* versus ceux *in vivo* (Farin, 2001). La fréquence d'avortement au jour 40 de gestation et plus varie selon les études de 7 à 13% (Hasler, 2000; Hasler, 1995), allant même pour certaines jusqu'à franchir le cap des 20% (Agca, 1998; Thompson, 1998). Selon une large étude réalisée sur 1776 embryons produits *in vivo*, le taux d'avortement était d'un peu plus de 5% à partir du 2^e mois de gestation, démontrant du même coup la plus grande viabilité des embryons *in vivo* lors de l'attachement utérin (King, 1991).

Des anomalies placentaires associées à IGF-II remarquées chez les embryons produits *in vitro* peuvent expliquer cette fréquence d'avortement plus élevée. Les avortements qui surviennent entre le jour 30 et 90 peuvent être logiquement associés, du moins en partie, à des problèmes de développements des membranes placentaires et le manque de vascularité du placenta (Farin, 2006).

Plusieurs autres facteurs peuvent expliquer cette situation, dont le milieu de culture *in vitro*, la qualité de l'embryon, le nombre d'embryons implantés, la qualité du transfert embryonnaire par le technicien, la qualité de la cryoconservation des embryons, le stade physiologique de la mère porteuse, etc. (Farin, 2006)

3. Différences des embryons produits in vitro et in vivo

a. Paramètres morphologiques

Même si les milieux de culture utilisés in vitro cherchent à reproduire le plus fidèlement possible les conditions in vivo, plusieurs différences sont observées chez les blastocystes produits in vitro versus ceux produits in vivo. D'un point de vue général, l'hétérogénéité de morphologie des embryons produits in vitro versus l'homogénéité de ceux produits in vivo est à souligner (Loos, 1992).

Parmi les différences recensées, la couleur du cytoplasme est certainement l'une des plus marquantes. Lorsque comparés à ceux produits in vivo, les embryons produits in vitro présentent un cytoplasme plus foncé mais moins dense (Pollard and Leibo, 1994). Il a été démontré que la couleur plus foncée du cytoplasme est causée par un plus grand nombre de gouttelettes lipidiques et que la plus faible densité est quant à elle causée par un espacement intercellulaire plus grand au stade blastocyste pour les embryons produits in vitro, particulièrement en présence de sérum foetal bovin dans le milieu de développement (Rizos, 2002).

Un autre facteur qui semble départager les embryons produits in vitro est leur nombre de cellules par embryon qui est inférieur à celui des embryons produits in vivo. En effet, le développement des embryons produits in vitro provenant de COCs de follicules entre 2 et 8mm de diamètre peut être plus lent selon certains milieux de culture, ce qui peut-être observable dès le 3^e jour (Viuff, 1999). Les embryons in vitro ne rattrapent jamais leur retard et celui-ci est également observé au stade morula et blastocyste. À ce dernier stage, la différence est davantage marquée dans le nombre de cellules qui constituent le trophoblaste, qui est plus élevé chez les embryons produits in vivo. Le rapport entre le nombre de cellules formant la masse cellulaire interne (embryoblaste) et le trophoctoderme (ICM/TE) est ainsi plus élevé chez les blastocystes produits in vitro. Bien que les cellules de l'embryoblaste contribuent également à former les membranes extraembryonnaires, ce sont les cellules du trophoblaste qui sont majoritairement responsable de la placentation. Par conséquent,

un ratio ICM/TE trop élevé pourrait entraîner des problèmes de développement fœtal, pouvant même engendrer des avortements précoces (Koo, 2002).

Plusieurs différences morphologiques sont également présentes au stade fœtal au niveau du placenta. Les conditions *in vitro* seraient entre autres à l'origine d'un gonflement anormal de l'allantoïde (hydrallantois) et d'une diminution du nombre de cotylédons et de caroncules, provoquant du même coup des variations anormales du développement vasculaire placentaire et, par conséquent, de la surface de contact entre le fœtus et la mère. En effet, les placentas bovins issus d'embryons produits *in vitro* présentent une surface totale de cotylédons et de caroncules ainsi qu'une densité volumique de villosités placentaires réduites par rapport à celles des embryons produits *in vivo*. Pour pallier à ce contact fœtal-maternel réduit, une plus grande densité vasculaire maternelle et un ratio de vaisseaux sanguins par cotylédon/caroncule plus élevé sont observés en fin de gestation chez les placentas issus d'embryons produits *in vitro*. Ces modifications morphologiques associées aux embryons produits *in vitro* seraient nécessaires pour augmenter l'efficacité d'acheminement des nutriments au fœtus, pour réguler les échanges gazeux ainsi que pour éliminer les déchets métaboliques (Miles, 2005).

Parmi les facteurs pouvant expliquer ces anomalies placentaires, notons que certains facteurs angiogéniques sont sous exprimés, ce qui serait possiblement provoqué par les conditions de culture embryonnaire *in vitro*. En effet, Miles et al. (2005) ont observé une baisse d'ARNm pour le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) dans les tissus des cotylédons chez les gestations dont les embryons avaient été produits *in vitro*. Le niveau d'expression génique de VEGF est crucial pour l'angiogénèse puisque ce gène code pour un peptide signal qui stimule le développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux préexistants. Il est par conséquent logique de penser qu'une sous-expression de VEGF pourrait provoquer un sous-développement du système vasculaire des cotylédons et des caroncules.

b. Communication intercellulaire

Il est généralement accepté que la communication intercellulaire joue un rôle important dans les premiers stades de développement embryonnaire. Cette communication est assurée entre autres par les jonctions intercellulaires, qui sont des conduits qui connectent les cytoplasmes de deux cellules voisines, permettant le passage d'ions et de petites molécules (Wrenzycki, 2005). La polarité cellulaire observée lors du passage du stade morula au stade blastocyste semble être provoquée grâce à ce mode de communication, amenant une différenciation des cellules du trophoctoderme et de l'embryoblaste (Gualtieri, 1992).

Bien qu'essentielles au développement embryonnaire, les jonctions intercellulaires ne sont pas présentes en même proportion chez toutes les espèces animales et il existe même une différence de quantité entre les embryons produits *in vitro* versus ceux produits *in vivo* (Prather, 1993). Chez les bovins, Wrenzycki et al. (2005) ont démontré qu'il n'y avait pas présence d'ARN codant pour des jonctions intercellulaires chez les morulas et blastocystes produits *in vitro*, alors qu'ils sont présents pour les morulas et blastocystes produits *in vivo*, suggérant ainsi une activité transcriptionnelle défectueuse.

D'autres analyses ultra structurales ont par la suite démontré que les jonctions intercellulaires étaient présentes dans un certain nombre chez les cellules de l'embryoblaste des blastocystes produits *in vivo* et rares chez les blastocystes produits *in vitro*. Chez les cellules du trophoctoderme, les jonctions intercellulaires sont présentes en petit nombre chez les blastocystes produits *in vivo* et inexistantes chez les blastocystes pour *in vitro* (Boni, 1999).

Le plus grand nombre de jonctions chez les cellules de l'embryoblaste semble être causé par un plus grand besoin de différenciation chez ces cellules par rapport aux cellules du trophoctoderme. Finalement, le nombre de jonctions intercellulaires diminue du stade 2 cellules jusqu'au stade blastocyste, probablement causé par un changement du type de communication intercellulaire (Boni, 1999).

c. Métabolisme énergétique

De façon générale, les premières segmentations embryonnaires ne demandent pas une activité métabolique importante, alors que la production d'ATP est supportée par l'oxydation de substrats tels que le pyruvate, les acides aminés et le lactate. De l'ovocyte mature jusqu'au stade embryonnaire 12 cellules, le pyruvate est le substrat le plus utilisé, au détriment du glucose et du lactate. Du stade 12 à 16 cellules, l'activité métabolique augmente substantiellement, alors que ces trois substrats sont utilisés de façon significativement plus élevée, particulièrement le glucose qui voit son utilisation multipliée par plus de 6 fois. Cette utilisation élevée d'énergie est facilement explicable par la compaction des cellules du trophectoderme, la formation de la cavité blastocelique et la remise en marche de l'activité transcriptionnelle (Narinder, 2000).

Dans un autre ordre d'idées, l'activité métabolique embryonnaire plus limitée constituerait un marqueur de la qualité embryonnaire. En effet, selon le «Quiet Embryo Hypothesis», les embryons de bonne qualité présentent une activité métabolique plus basse que ceux qui arrêtent leur développement. Ainsi, un embryon qui n'a pas subi trop de stress lors de son développement présentera, selon toute logique, un génome, un transcriptome et une expression protéique normaux qui devraient lui permettre de poursuivre son développement sans avoir à consommer de façon massive des nutriments et de l'oxygène. À l'opposé, un embryon qui aura été affecté significativement par des stress environnementaux présentera des dommages moléculaires et cellulaires qui devront être réparés ou qui déclencheront, dans un contexte extrême, le processus d'apoptose de la cellule. Ces stratégies cellulaires mises en place pour la survie de l'embryon amèneront celui-ci à consommer davantage de nutriments et ainsi présenter une activité métabolique accrue. Il en va de même pour l'oxygène, dont l'utilisation plus substantielle pourrait provoquer un stress oxydatif plus important au sein de la cellule, conséquence directe de la présence accrue de radicaux libres (Leese, 2008).

Or, les embryons produits in vitro présentent une activité métabolique significativement plus élevée que celle des embryons produits in vivo (Narinder, 2000), suggérant du même coup la présence accrue de stress environnementaux dans le processus de culture in vitro et résultant en un embryon de moindre qualité.

d. Aberrations chromosomiques

Parmi les troubles chromosomiques les plus fréquents, il y a l'aneuploïdie qui se définit comme étant une anomalie du nombre de chromosomes présents dans le noyau d'une cellule. Chez les mammifères, les cellules somatiques sont diploïdes, c'est-à-dire qu'elles possèdent une paire de chromosomes homologues, soit 46 au total chez l'humain et 60 chez le bovin. L'aneuploïdie est par conséquent remarquée dans les cellules où il y a présence de plus ou moins 60 chromosomes chez le bovin, outre les gamètes qui sont des cellules haploïdes (30 chromosomes). De façon générale, l'aneuploïdie survient durant la méiose par la non-disjonction des chromatides (Thibault, 2001).

Il existe plusieurs types d'aneuploïdie, dont la nullisomie, la monosomie et la trisomie. Comme son nom l'indique, l'aneuploïdie nullisomique est caractérisé par une absence totale d'un type de chromosome. Ce type d'aneuploïdie est létal chez tous les organismes diploïdes. La monosomie est présente chez un organisme lorsqu'une seule copie d'un chromosome est manquante. La principale cause de monosomie est la non-disjonction des chromatides homologues qui migrent toutes deux vers le même pôle lors de l'anaphase et sont transférées dans la même cellule fille. Cette anomalie peut être observée lors des métaphases 1 et 2 de l'ovocyte mais généralement lors de la première (62% versus 18%). En contrepartie, la non-disjonction des gamètes est moins présente chez le spermatozoïde, autant lors de la métaphase 1 (12%) que la métaphase 2 (8%) (Thibault, 2001). Cette situation pourrait logiquement être expliquée par le fait que l'ovocyte ne possède pas de centriole, une structure cellulaire qui participe à la migration des chromatides lors de l'anaphase (Thibault, 2001). De plus, différents organismes expérimentaux ont démontré que la

présence de mutation en même temps qu'a lieu la recombinaison pouvait augmenter significativement la fréquence de non-disjonction lors de la méiose 1 (Griffiths, 2000). La monosomie peut être dommageable pour deux raisons principales. Premièrement, l'absence d'un chromosome amène souvent un déséquilibre dans le niveau d'expression (sous-expression) génique des gènes compris sur le chromosome manquant et de son homologue. Également, un gène récessif létal présent sur le seul chromosome présent est exprimé de façon homozygote et peut entraîner la mort de l'organisme (Griffiths, 2000).

Contrairement à la monosomie, la trisomie est caractérisée par la présence d'un chromosome surnuméraire. Cependant, tout comme la monosomie, les conséquences principales de la trisomie sont le déséquilibre d'expression génique (surexpression) qui peut mener à la mort ou encore à diverses anomalies. Il est à noter que chez le bovin, la trisomie est la grande majorité des cas létale (Thibault, 2001).

La polyplôïdie (présence de plus de deux copies d'un chromosome dans une cellule diploïdes) peut être également provoquée par l'absence d'extrusion d'un des globules polaires ou encore par la polyspermie. Le caryotypage a permis de découvrir que les embryons produits *in vitro* présentent davantage de cellules polyplôïdes. Une proportion très variable et plutôt élevée de blastocystes produits *in vitro* peut présenter des cellules polyplôïdes, passant de 44% (Slimane, 2000) à 50% (Lonergan, 2004) et jusqu'à 72% dans certaines études (Viuff, 1999). À l'opposé, une proportion minoritaire de blastocystes produits *in vivo* présentent des cellules polyplôïdes (25% selon Viuff, 1999; 21% selon Lonergan, 2004). Cependant, il faut préciser que seule une petite proportion des cellules des blastocystes qui démontrent une aberration chromosomale est polyplôïde (83% auraient moins de 10% de cellules polyplôïdes selon Viuff, 1999). Cette inclinaison plus marquée à la polyplôïdie pourrait être attribuable à une mauvaise maturation *in vitro* qui provoquerait une mauvaise réaction corticale menant à la polyspermie ou encore à une absence d'extrusion des globules polaires.

Afin de réduire l'incidence à la polyplœdie, il est suggéré qu'il existe un mécanisme à l'intérieur de l'embryon qui exclurait les cellules polyplœides du disque embryonnaire pour les reléguer au trophoctoderme. Ainsi, Viuff et al. (2002) ont démontré que les cellules du trophoctoderme (96%) avaient une incidence significativement accrue à la polyplœdie par rapport aux cellules de l'embryoblaste 58% au jour 7. Comme les cellules du trophoctoderme formeront le placenta, il s'agit d'un mécanisme qui améliore la qualité des cellules de l'embryoblaste qui formeront le fœtus (Viuff, 2002).

Quant à la compétence au développement des blastocystes polyplœides, les avis divergent. Pour Viuff et al. (1999), le taux de gestation des blastocystes polyplœides produits in vitro semble tout à fait comparable à celui des blastocystes produits in vivo. Cependant, il est possible qu'après l'implantation, les blastocystes polyplœides produits in vitro soient davantage susceptibles à avorter (Viuff, 1999). Selon Hare et al. (1980), un niveau de polyplœdie inférieur à 25% n'affecterait pas le développement de l'embryon. Finalement, selon Lonergan (2004), il existerait une corrélation inversement proportionnelle entre la compétence au développement d'un embryon et sa proportion de cellules polyplœides.

e. Expression génique

L'expression génique des embryons produits in vitro versus celle de ceux produits in vivo comporte des différences, plus ou moins importantes selon les études. Le design expérimental, les conditions de laboratoire, les protocoles de culture embryonnaire, les produits utilisés, la source d'ovocytes, le stade embryonnaire, le type de biopuce utilisé et même l'expérience du personnel ne sont que quelques unes des principales sources de variation qui peuvent expliquer les différences observées d'un laboratoire à un autre. Cependant, certaines voies métaboliques ont été recensées plusieurs fois dans la littérature comme étant différenciellement exprimés dans des conditions de culture in vitro versus des conditions de culture in vivo.

En plus de certains gènes à empreinte parentale tel IGF-II mentionnés précédemment, notons en particulier les gènes liés à la synthèse, au métabolisme, à la réduction ainsi qu'à la modification des lipides et du cholestérol qui semblent être altérés dans leur expression par les systèmes de production in vitro selon plusieurs parutions des dernières années (Wrenzycki, 2000). Ces variations dans l'expression génique du métabolisme lipidique fait très certainement écho à la présence plus importante de gouttelettes lipidiques chez les embryons produits in vitro, ainsi qu'à l'apparence plus foncée de ces derniers.

Une autre voie métabolique citée de façon récurrente dans les études d'expression génique est le processus d'apoptose. Un des gènes régulateurs de l'apoptose, BAX (bcl-2-associated X protein), est connu pour être exprimé dès le stade 8 cellules chez les embryons produits in vitro, mais pas avant le stade 16 cellules pour les embryons produits in vivo. De plus, à tous les stades où le gène est exprimé dans les systèmes de production in vivo et in vitro, il est davantage exprimé chez l'embryon produit in vitro (Lonergan, 2003). Ceci va de paire avec l'étude de Gjorret et al. (2001) qui suggérait une plus grande présence d'apoptose chez les embryons produits in vitro que ceux produits in vivo. Plusieurs études ont également ciblé les gènes de la famille des «Forkhead transcription factors» pour leur activité dans le processus d'apoptose, de l'arrêt cellulaire ainsi que de la réponse de stress (Medema, 2000; Burgering & Kops, 2002; Hosaka, 2004).

Une autre classe de gènes fortement influencée par l'environnement de production in vitro est les facteurs de réplication et de transcription de la molécule d'ADN, ainsi que les gènes qui codent pour des protéines chromosomiques qui sont présentes dans la structure de la chromatine comme la famille de HMG (highmobility group protein) (Fan, 2002; Bianchi, 2000). Le gène codant pour la protéine DOT1L a également été identifié comme l'un des gènes impliqués dans les activités transcriptionnelles et traductionnelles qui est sous exprimé chez les embryons produits in vitro (Corcoran, 2006). Cette protéine est connue pour être impliquée dans le processus de méthylation des histones, lequel vient activer ou désactiver certains gènes, modulant du même

coup leur niveau d'expression génique (Kouzarides, 2002). Le gène codant pour CCR4-NOT est lui-aussi sous-exprimé chez les embryons produits *in vitro*, comparativement aux embryons produits *in vivo* (Corcoran, 2006). Cette protéine est tant qu'à elle active pour réguler le métabolisme des ARN messagers, c'est-à-dire la formation, l'inhibition ou l'activation, le contrôle de l'élongation, la déadénylation ainsi que la dégradation des ARN-m (Chen, 2003). Finalement, la GNB2L (guanine nucleotide-binding) est également sous exprimée par les embryons produits *in vitro* (Corcoran, 2006). Ce gène code pour un récepteur de la protéine C-kinase (Wang, 2003). Ce récepteur permet l'arrivée de la C-kinase vers les ribosomes, stimulant du même coup la phosphorylation des ARN-m (Nilsson, 2004). L'abondance de GNB2L chez les embryons *in vivo* rendent ces derniers plus efficaces dans leurs activités traductionnelles par rapport aux embryons produits *in vitro* (Corcoran, 2006).

f. Épigénome

Bien que l'embryon soit autonome grâce à ses réserves d'ARNm maternels ainsi qu'à l'activation de sa machinerie transcriptionnelle lors de la transition maternelle embryonnaire, celui-ci subit une série de stress environnementaux en condition de culture *in vitro*. Afin de survivre dans ces conditions environnementales plus ou moins adaptées à ses besoins vitaux, l'embryon doit procéder à des modifications épigénétiques qui l'amèneront à s'adapter à un milieu de développement hostile ou encore à présenter un développement erratique lorsque l'évolution nécessaire dépasse sa capacité d'adaptation (Duranthon, 2008).

L'épigénétique peut être définie comme l'ensemble des modifications héréditaires et réversibles qui font varier l'expression génique sans altération de la séquence nucléotidique de l'ADN (Duranthon, 2008). Non seulement ces modifications épigénétiques peuvent avoir un impact significatif sur le développement embryonnaire précoce, celles-ci peuvent également laisser des traces, voire même des maladies, chez le fœtus et même lors du développement post-natal (Barker, 2003).

Différentes modifications épigénétiques peuvent survenir durant le développement embryonnaire précoce selon les conditions de culture (composition des milieux, température, conditions gazeuses, etc.), telles que la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitination des histones ainsi que la méthylation des résidus cytosine. Ces modifications rendent plus ou moins disponible l'ADN à la machinerie transcriptionnelle, entraînant du même coup une variation de l'expression génique en fonction des conditions de culture. Les effets directs des conditions environnementales sur les modifications épigénétiques ainsi que les conséquences de la variation de l'expression génique sur le développement embryonnaire sont encore à ce jour mal caractérisés.

Milieux et conditions de culture

La composition des milieux de culture embryonnaire ainsi que les conditions auxquelles sont soumis les COCs et les embryons durant leur croissance *in vitro* sont fortement variables d'un laboratoire à un autre. Ainsi, les milieux utilisés peuvent varier dans leur source et leur concentration énergétique (glucose, pyruvate, etc.), protéique et de sels. Cependant, les principales variations recensées dans la littérature concernent l'utilisation ou l'absence d'utilisation de sérum fœtal bovin. De façon générale, les systèmes de production embryonnaire *in vitro* utilisent du sérum lors de la maturation de l'ovocyte. Dès la mise en fécondation et par la suite lors de la mise en développement, les systèmes de production *in vitro* peuvent être divisés en deux groupes, soit les systèmes qui utilisent des milieux non-définis et les systèmes qui utilisent des milieux semi-définis.

Les milieux non-définis sont caractérisés par l'utilisation de sérum fœtal bovin (FBS), un produit dont la composition est variable d'une compagnie de production à une autre et même d'un lot à l'autre, d'où l'appellation «milieu non-défini». Plus précisément, le FBS est une fraction du plasma sanguin fœtal duquel sont éliminés les globules rouges. En plus des systèmes de production SOF enrichis de FBS, les systèmes de co-culture nécessitent la présence de FBS afin de nourrir les cellules somatiques mises en culture avec les embryons dans le milieu. En effet, ce système caractérisé par la présence d'un tapis cellulaire, bien souvent des Buffalo Rat Liver cells, permettrait d'augmenter la proportion d'embryons à passer le seuil de la MZT et atteindre le stade de blastocyste (Rexroad, 1989). Ce système a été largement utilisé comme système de production *in vitro* il y a de cela quelques années mais a été beaucoup moins utilisé récemment.

Les milieux semi-définis sont pour leur part caractérisés par l'utilisation d'albumine de sérum bovin (BSA), un produit qui représente la fraction protéique du FBS. Plus précisément, le BSA, aussi appelé «Fraction V», représente l'albumine isolé du plasma sanguin fœtal. Cependant, comme le niveau de pureté n'est pas de 100%, ce milieu est appelé «semi-défini». Le système de production SOF avec présence de BSA et

l'absence de FBS est possiblement le système le plus largement utilisé pour la production embryonnaire bovine actuellement.

1. Milieu non-défini

a. Développement embryonnaire

La présence de sérum fœtal bovin a un impact majeur sur le développement embryonnaire. Selon plusieurs études, la présence de FBS dans le milieu de culture augmente de façon significative la vitesse de développements des embryons. En effet, le taux de blastocyste à 6 jours est plus élevé pour les embryons cultivés dans un milieu enrichi de FBS (Rizos, 2003; Lonergan, 1999; Gutierrez, 2001). Cependant, cette cinétique de développement plus rapide serait imperceptible dès le 7^e jour, alors que le nombre de cellules des embryons cultivés sans FBS ne serait pas différent à celui des embryons cultivés avec FBS (Rizos, 2003).

Également, il fut observé que la présence de FBS diminue significativement le taux de clivage (Pinyopummintr, 1994; Lonergan, 2000). En contrepartie, une plus grande proportion d'embryons clivés provenant d'un milieu de culture avec FBS atteindrait le stade blastocyste par rapport à ceux issus d'un milieu de culture sans FBS (Lonergan, 2000).

De plus, l'utilisation du FBS entrainerait une plus grande hétérogénéité dans les cohortes embryonnaires. En effet, Mermillod et al. (1993) ont observé que les embryons provenant d'un milieu de culture enrichi de FBS étaient plus hétéroclites en ce qui a trait à la grosseur (nombre de cellules) et au stade de développement, par rapport aux embryons provenant d'un milieu de culture non-enrichi au FBS.

b. Métabolisme lipidique

D'un point de vue métabolique, il a été prouvé que les cellules en culture peuvent utiliser des acides gras, des phospholipides ainsi que des triglycérides des milieux de culture enrichis de FBS (Spector, 1972). La présence de FBS dans le milieu de culture entraîne une plus forte concentration de lipides sous forme de triglycérides chez les blastocystes produits in vitro, alors qu'une concentration plus élevée de gouttelettes lipidiques est observée (Thompson, 1995). Cette situation peut-être expliquée de deux façons. Premièrement, les mitochondries des embryons cultivés dans un milieu de culture contenant du FBS seraient davantage immatures (Hiroyuki, 1999) et moins nombreuses (Crosier, 2001) que celles provenant d'embryons cultivés dans un milieu de culture sans FBS. Le manque de maturité et leur plus petit nombre diminueraient l'efficacité des mitochondries à métaboliser les lipides, ce qui expliquerait le plus grand nombre de gouttelettes lipidiques dans les embryons cultivés avec FBS. De plus, il a été observé que ces derniers auraient une concentration plus faible de vésicules lysosomales. Ces vésicules amènent une dégradation des gouttelettes lipidiques, suite à une activité de phagocytose (Hiroyuki, 1999).

c. Aberrations chromosomiques

Les embryons produits in vitro démontrent un taux de polyploïdie plus élevé que ceux produits in vivo (Lonergan, 2004). Selon Slimane et al. (2000), les aberrations chromosomiques surviennent aussi tôt qu'au moment du clivage et la fécondation in vitro n'aurait aucune incidence sur celles-ci. De plus, autour de 75% des embryons produits in vitro présenteraient des aberrations chromosomiques de tout genre (Viuff, 2002, Lonergan, 2004). La présence de FBS dans le milieu de culture des embryons produits in vitro n'aurait cependant pas d'impact sur le niveau de polyploïdie (Lonergan, 2004). En revanche, ceux-ci démontreraient des anomalies plus sévères, alors qu'ils posséderaient une plus grande proportion de cellules qui comportent plus d'un type d'anomalies (Lonergan, 2004).

d. Cryotolérance

Comme mentionné précédemment, il a été démontré que les embryons cultivés dans un milieu de culture comprenant du FBS ont généralement une concentration plus élevée en gouttelettes lipidiques. Or, il a également été démontré que les embryons contenant une concentration lipidique plus élevée étaient plus sensibles à la congélation (Mohr, 1981; Pollard, 1994). Yamashita et al. ont par la suite démontré en 1999 que les blastocystes issus d'un milieu de culture contenant du FBS survivaient à la congélation dans une proportion moindre que ceux issus d'un milieu de culture sans FBS. La cryotolérance des embryons produits in vitro sans FBS serait intermédiaire, soit entre celle des embryons produits in vitro avec FBS (inférieure) et celle des embryons produit in vivo (supérieure) (Rizos, 2003).

Conformément à ces résultats, Lazzari et al. (2002) ont observé un taux de gestation plus faible pour les embryons congelés provenant d'un milieu de culture enrichi de FBS. En effet, le taux de gestation de ceux-ci était de 17% environ, alors que celui des embryons congelés provenant d'un milieu de culture non-enrichi en FBS s'élevait à près de 37%.

e. Expression génique

i. Reconnaissance de la gestation

IFN-t (Interferon-tau) est sécrété par les cellules du trophoblaste lors de la formation de la cavité blastocelique et est l'agent principal de la reconnaissance de la gestation par la mère. En effet, sa sécrétion permet le maintien du corps jaune et la sécrétion de la progestérone par ce dernier, en inhibant la sécrétion de PGF2- α , une prostaglandine qui a comme fonction la lyse du corps jaune. En raison de son expression chez les blastocystes produits in vitro, l'expression d'IFN-t serait déterminée en partie génétiquement. Bien que l'environnement utérin ne soit pas essentiel pour induire son expression, cet environnement pourrait bien être nécessaire au contrôle de la sécrétion d'IFN-t, alors que les embryons produits in vitro poursuivent leur sécrétion au-delà de

la durée observée chez les embryons produits *in vivo*, suggérant que des facteurs maternels soient requis pour inactiver le gène (Kubisch, 1998). IFN-t est considéré par certains auteurs comme un marqueur de la qualité embryonnaire, alors qu'un niveau élevé de transcrits de ce gène est associé à un embryon de meilleure qualité (Rizos, 2003). Par contre, d'autres études arrivent à une corrélation négative entre la qualité embryonnaire et la production embryonnaire d'IFN-t, puisque les blastocystes au développement plus rapide, normalement associés à une meilleure qualité, produisent moins d'IFN-t. Finalement, la transcription du gène IFN-t est diminuée par la présence de FBS dans le milieu de culture (Rizos, 2003; Wrenzycki, 1999).

ii. Apoptose

Le niveau d'expression génique de BAX semble être plus élevé chez les blastocystes produits en présence de FBS (Rizos, 2003). Ce gène est associé à la régulation de l'apoptose et peut, par conséquent, être révélateur de la qualité de l'embryon. Cependant, la seule présence d'un niveau élevé d'ARNm de BAX ne peut être directement associée à l'activité de la protéine, alors que le processus d'apoptose n'est enclenché que si le ratio entre Bax et Bcl-2, sa protéine compensatrice, est élevé. En effet, Yang et Rajamahendran (2002) ont observé une expression élevée de Bcl-2 chez des embryons et des ovocytes de bonne qualité, une expression faible chez des embryons dont le noyau était fragmenté (la fragmentation de l'ADN est l'une des étapes du processus d'apoptose) et une expression presque qu'indétectable chez les ovocytes complètement dénudés. Bax a pour sa part été exprimé chez tous les types d'ovocytes et d'embryons, particulièrement chez les ovocytes dénudés.

Parallèlement aux études de Rizos et al. (2003), il a été observé par Byrne et al. (1999) que l'incidence du processus d'apoptose est également plus élevée chez les embryons produits avec FBS. Il s'agit d'un résultat préoccupant, puisque le processus d'apoptose peut entraîner une mortalité embryonnaire précoce ou encore entraîner la formation d'anomalies chez le fœtus menant à un avortement (Brill, 1999).

iii. Radicaux libres

Une des causes connues d'un développement embryonnaire perturbé est le stress oxydatif, conséquence du métabolisme de l'oxygène. Lorsque les mécanismes cellulaires ne réussissent pas à gérer efficacement les radicaux libres, des lésions au niveau des acides nucléiques, des protéines et des membranes peuvent survenir, entraînant une augmentation de la mortalité cellulaire. Le stade 8-16 cellules, où la transcription du génome est activée, pourrait être particulièrement sensible aux effets des radicaux libres (Crosby, 1988).

Il existe cependant une enzyme, le MnSOD, qui prévient le stress oxydatif en éliminant certains radicaux libres. L'activité de protection du MnSOD contre les dommages oxydatifs est totalement concentrée vers les mitochondries. L'ARNm et la protéine du MnSOD sont déjà présents chez les morulas produits *in vitro* avec présence de FBS, alors qu'ils ne sont présents qu'au stade blastocyste pour les embryons produits *in vitro* avec absence de FBS (Lequarre, 2001). Rizos et al. ont également observé une expression génique plus élevée de ce gène chez les blastocystes provenant d'un milieu de culture *in vitro* contenant du FBS versus ceux provenant d'un milieu en l'absence de FBS. En fait, la présence dans le FBS d'un facteur, le TNF α , qui induit la transcription de MnSOD, pourrait expliquer, du moins en partie, que les blastocystes produits *in vitro* avec FBS démontrent une expression génique plus élevée plus élevée pour ce gène (Wong, 1988). Il fut également démontré par Rizos et al. (2002) que les blastocystes produits *in vivo* avaient une expression génique plus élevée pour le MnSOD que les blastocystes produits *in vitro* dans un milieu de culture contenant du FBS.

En plus d'être avantageusement exprimée chez les blastocystes produits dans les systèmes de production *in vitro* versus *in vivo*, l'enzyme SOX (sulfur oxidising enzyme) est davantage exprimée chez les blastocystes produits *in vitro* en présence de FBS versus ceux produits en son absence. L'enzyme SOX catalyse les réactions d'oxydation grâce à ses liens covalents, ce qui mène à la détoxification de radicaux libres dans le cytoplasme (Rizos, 2003). La surexpression de SOX dans les embryons

produits *in vitro* en présence de FBS peut être associée à la plus grande concentration de peroxyde d'hydrogène et au métabolisme lipidique (Levy, 2001). Selon Lonergan et al. (2003), le niveau d'expression génique du SOX est inversement proportionnel à la qualité de l'embryon, suggérant que les meilleurs embryons ont moins de radicaux libres, donc moins de transcrits de SOX, que les embryons de qualité moindre.

Impliqué dans le processus de catalisation de la voie des pentoses phosphates, la G6PD (Glucose-6-phosphate-dehydrogenase) est davantage présent chez les embryons produits *in vitro* que ceux produits *in vivo* (Lonergan, 2003). Le G6PD joue également un rôle de sentinelle pour le stress oxydatif, alors que sa détection de radicaux libres va rapidement entraîner la production de NADPH, qui démontre un puissant pouvoir réducteur (Lonergan, 2003). De cette façon, plus la présence de G6PD est élevée, plus le stress oxydatif serait important, élevant potentiellement ce gène comme un marqueur de la qualité embryonnaire. Cependant, il se pourrait que les embryons femelles expriment deux fois plus de G6PD que les embryons mâles jusqu'à l'inactivation d'un des deux chromosomes X, comme semblent le suggérer les études chez les embryons produits *in vitro* (Gutierrez-Adan, 2000). Malgré tout, chez les embryons produits *in vivo*, aucune différence d'expression génique concernant le G6PD n'a été observé (Larson, 2001).

iv. Jonctions intercellulaires

Le niveau d'expression génique des jonctions intercellulaires, bien que moins étudié, semble également différer selon le milieu de culture *in vitro*. Les jonctions intercellulaires sont essentielles pour le transport des fluides mais aussi des cryoprotecteurs. Deux de ces jonctions ont été étudiées par Rizos et al. en 2003, soit Cx43 et Cx31. Chez les blastocystes produits *in vitro* avec FBS, le Cx43 a été sous-exprimé alors que le Cx31 a été surexprimé par rapport à l'expression génique des blastocystes produits *in vitro* sans FBS. Les jonctions intercellulaires sont particulièrement importantes dans la formation de la morula et du blastocyste parce qu'elles sont impliquées dans le gradient qui se forme entre les cellules de l'embryoblaste et du trophoblaste.

v. **Attachement embryonnaire**

Principal agent de reconnaissance de la gestation chez les bovins, IFN-t est exprimé seulement au stade blastocyste et à des niveaux disparates d'un embryon à l'autre, selon la source de l'embryon (Stojkovic, 1999), la précocité de la formation du blastocyste (Kubisch, 2001), le nombre d'embryons cultivés par goutte de culture (Larson, 1999), la présence de FBS (Rizos, 2003) et le sexe de l'embryon (Larson, 2001). Le niveau d'expression génique du IFN-t est plus élevé chez les embryons produits *in vitro* que chez les embryons produits *in vivo* (Lonergan, 2003). Cependant, l'expression du gène survient de façon plus précoce chez l'embryon produit *in vitro*, soit vers le 3^e jour, versus le 5^e pour les embryons *in vivo* (Lonergan, 2003). Selon Kubish et al. (1998), il existerait une relation négative entre la précocité d'expression du IFN-t et la compétence développementale de l'embryon.

Le niveau d'expression de LIF et de son récepteur LR-B est altéré par la présence de FBS. Le LIF joue un rôle essentiel dans la différenciation embryonnaire et l'attachement de l'embryon bovin. De façon générale, LIF et LR-B sont davantage exprimés chez les blastocystes produits *in vitro* que ceux produits *in vivo*. Selon Rizos et al. (2003), le niveau d'expression de LIF et de son récepteur LR-B est plus élevé chez les embryons produits *in vitro* avec présence de FBS. Toujours selon Rizos et al. (2003), cette situation pourrait mener à un développement anormal du trophoblaste ainsi que de l'embryoblaste.

2. **Milieu semi-défini**

Comparativement à la présence de FBS dans le milieu de culture, l'utilisation du BSA (Bovin Serum Albumin) n'a aucun effet avant le premier clivage. Selon Wang et al. (1997), il n'y aurait pas de différences significatives pour le taux de clivage pour les embryons cultivés dans un milieu avec FBS versus ceux cultivés avec du BSA, malgré que quelques autres études suggèrent le contraire (Bavister, 1994; Lonergan,

2000). Après le premier clivage, il est généralement observé que les embryons produits dans un milieu avec BSA atteindraient le stade blastocyste plus tard et dans une proportion moindre que ceux ayant été cultivés dans un milieu enrichi de sérum (Wang, 1997).

Bien que moins prononcé que le sérum, le BSA a également un effet de stimulation sur le développement embryonnaire. Cependant, les recherches tendent à démontrer une variation importante dans les résultats. En effet, les différents lots de BSA peuvent être stimulants ou inhibiteurs de la croissance embryonnaire, tout dépendant du niveau et du type de contaminants présents dans le lot, mais également selon la concentration en BSA des milieux de culture (Rizos, 2003).

3. Milieu défini

Un milieu défini est caractérisé par l'absence de composants non-définis ou semi-définis dans sa composition, tels le FBS et le BSA. L'intérêt principal de l'utilisation d'un tel milieu est le potentiel plus élevé de répétabilité des expérimentations d'un laboratoire à un autre. En effet, les milieux semi et non-définis sont contaminés aléatoirement et de façon plus ou moins importante par de courts peptides, des substrats énergétiques ainsi que par des facteurs de croissance qui peuvent avoir des effets stimulateurs ou encore inhibiteurs de la croissance embryonnaire, tout dépendant de leur concentration. Cette situation rend difficile la répétabilité des expériences dans un contexte où les produits utilisés ne proviennent pas de la même compagnie et du même lot de production.

Cependant, l'absence des macromolécules présentes dans le BSA et le FBS peut entraîner l'adhérence des embryons entre eux lors de la culture embryonnaire. Ainsi, des macromolécules synthétiques sont ajoutées aux milieux définis, tels que le polyvinyl-alcool (PVA) et le polyvinyl-pyrrolidone (PVP). Bien qu'aucun effet dommageable n'ait été observé, plusieurs études démontrent des retards de croissance

embryonnaire et un nombre de cellules réduit chez les embryons produits dans ce type de milieu de culture. Ce manque global de développement peut-être expliqué par le fait que les protéines présentes dans les milieux semi et non-définis jouent un rôle capital dans le développement embryonnaire. En effet, celles-ci réduisent la toxicité embryonnaire relativement aux déchets métaboliques et sont une source de facteurs de croissance ainsi que de nutriments chez l'embryon précoce. En raison des problèmes développementaux reliés au manque de nutriments dans sa composition, le milieu défini est peu utilisé pour le développement embryonnaire (Wrenzycki, 1999).

4. Concentrations gazeuses

Généralement, les conditions dites idéales pour la production in vitro suggèrent un niveau de gaz carbonique et d'oxygène respectivement de 5 et 20% pour la maturation et la fécondation, alors qu'un niveau identique de 5% est utilisé pour le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste (Thibault, 2001).

Dans la littérature scientifique, il est généralement admis qu'un système in vitro à oxygène réduit (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) fonctionne mieux qu'un système enrichi de gaz carbonique (5% CO₂, 95% N₂). Selon Lim et al. (1999), le système à oxygène réduit donne un meilleur taux de blastocyste que le système enrichi seulement en gaz carbonique. L'étude démontre également un plus grand développement chez les cellules de l'embryoblaste et un diamètre plus élevé chez les blastocystes produits dans un environnement à oxygène réduit.

En effet, le passage du niveau d'oxygène de 20% pour la maturation et la fécondation à 5% pour le développement embryonnaire est justifié par le fait que le développement des cellules de l'embryoblaste est privilégié en situation d'hypoxie (5% O₂). De plus, ce niveau d'oxygène pourrait également limiter la perte de la capacité pluripotente, c'est-à-dire la capacité d'une cellule à se différencier, ce qui est essentiel lors du développement embryonnaire précoce. La pluripotence serait favorisée par des conditions d'hypoxie sous lesquelles le métabolisme énergétique et,

par conséquent, l'oxydation sont réduits (Duranthon, 2008). Cette diminution de l'oxydation dans la cellule diminue la formation de radicaux libres dans le cytoplasme, ceux-ci constituant une cause majeure de dommage, de retard de croissance ou de mort de l'embryon (Joenje, 1989).

De plus, la concentration d'oxygène affecte l'utilisation des substrats énergétiques de l'embryon. En effet, Khurana & Wales (1989) ont démontré qu'un système à oxygène réduit (1-5%) était nécessaire à l'utilisation des pools de glycogènes endogènes chez les morulas de souris. Selon Harvey et al. (2004), les différentes concentrations d'oxygène entraînent différents niveaux d'expression du gène GLUT1 chez l'embryon bovin produit in vitro. Selon cette étude, le niveau d'expression de GLUT1 est plus bas dans un système de production in vitro à 7% d'oxygène versus un système de production in vitro à 2% d'oxygène. Cette même logique est également conservée pour un système de production à 20% versus un système à 7% d'oxygène. Il s'agit d'un résultat important puisque GLUT1 est impliqué dans le transport du glucose, un nutriment important lors de la formation du blastocyste. Une sous-expression de GLUT1 pourrait ainsi entraîner une diminution du nombre de cellules ainsi qu'une augmentation de l'apoptose (Pantaleon, 2001). Dans un même ordre d'idée, le gène GLUT-5 a été retrouvé dans des proportions significativement plus élevées chez des embryons produits in vivo versus ceux produits in vitro (Lonergan, 2003). Ce gène est actif à partir du stade 8 cellules et est impliqué dans le processus de transport du fructose.

5. Additifs hormonaux

a. IGF-1

Il est déjà bien connu qu'IGF-1 (insuline-like growth factor 1) est impliquée dans le métabolisme et dans le développement des embryons, alors que cette hormone peptidique est internalisée par des récepteurs embryonnaires au stade pré-attachement (Heyner, 1989). Il a même été démontré chez la souris que ces récepteurs étaient

présents aux stades 8 cellules, morula et blastocyste, suggérant un rôle d'IGF-1 à ces stades de développement précoces (Harvey, 1991). Toujours chez la souris, des études ont démontré qu'IGF-1 permettait une augmentation de la synthèse protéique de 90% (Harvey, 1988; Dunlison, 1993). Dans un même ordre d'idées, Harvey et Kaye (1990) ont observé une augmentation de la prolifération cellulaire d'environ 9% avec l'ajout d'IGF-1, avec 23% d'augmentation pour les cellules de l'embryoblaste. Quant à eux, Gardner et Kaye (1991) ont observé une augmentation du taux de clivage chez des embryons de souris de l'ordre de 16 à 20%. Ce meilleur développement embryonnaire pourrait être expliqué par une meilleure assimilation du glucose par les embryons de souris (Pantaleon, 1996). Chez le porc, Koo et al. (1997) suggèrent que l'ajout d'IGF-1 a un effet synergique avec certains acides aminés qui augmenteraient le taux de blastocyste, ce qui a déjà été observé chez la souris (Mihalik, 2000).

Si elles sont globalement positives chez la souris, les études tendent à être mitigées sur l'effet que peut avoir l'ajout d'IGF-1 sur le développement embryonnaire chez le bovin. Même si le transcrit codant pour son récepteur est présent chez le zygote bovin (Schultz, 1992), plusieurs études n'ont pas trouvé de différences significatives avec l'ajout d'IGF-1 au milieu de culture *in vitro*, comme c'est le cas pour Hernandez-Fonsec et al. (2002) qui n'ont observé aucune variation significative du taux de clivage, du taux de blastocyste et du taux de gestation. Cependant, Matsui et al. (1995) ont observé une augmentation du taux de morulas au jour 5 ainsi qu'un plus grand nombre de cellules chez les blastocystes avec l'ajout d'une haute dose d'IGF-1. Bowles and Lishman (1998) ont quant à eux observé une meilleure maturation *in vitro* avec l'ajout d'IGF-1, sans pour autant observer une augmentation du taux de clivage, ni du taux de blastocystes.

b. Hormone de croissance (GH)

Retrouvé dans le FBS, l'hormone de croissance (growth hormone) est impliquée dans le développement embryonnaire bovin. La présence de récepteurs d'hormone de croissance à des stades précoces de développement semble prouver cette affirmation.

Il a été démontré chez plusieurs espèces animales qu'un taux d'hormone de croissance faible ou encore un manque de récepteurs de cette hormone réduisaient le corps fœtal ainsi que la grosseur des animaux à la naissance (Kaye, 1995).

Quelques études ont déjà corroboré le fait que l'hormone de croissance augmente le taux de blastocyste et favorise son éclosion (Izadyar, 2000). Bien que qu'elle n'aurait pas un impact significatif sur le taux de gestation, l'ajout d'hormone de croissance pourrait augmenter jusqu'à 9% le taux de blastocyste dans un milieu comprenant du BSA, tout en entraînant une augmentation du nombre total de cellules (Iwata, 2003). Mtango et al. (2000) ont également observé que la cryotolérance des embryons cultivés dans un milieu enrichi en hormone de croissance était plus élevée. En effet, l'étude démontre que l'exposition à l'hormone de croissance après la vitrification des embryons favorise l'augmentation du nombre de cellules et le taux d'éclosion des blastocystes. Chez la souris, l'ajout d'hormone de croissance peut entraîner une augmentation du nombre de blastomères et favoriser l'implantation des embryons lors du transfert embryonnaire (Fukaya, 1998).

Ces observations peuvent être expliquées par le fait que l'hormone de croissance module le métabolisme du glucose et entraîne l'expulsion des lipides, augmentant du même coup la cryotolérance (Kölle, 2004). Selon Kölle et al. (2004), l'hormone de croissance irait jusqu'à éliminer les accumulations de glycogène présentes dans l'embryoblaste et le trophoblaste, soit par l'augmentation du transport du glucose (déjà observé chez la souris par Pantaleon et al. en 1997), l'inhibition de la synthèse de glycogène ou par l'augmentation de la glycogénèse. L'augmentation de la capacité de développement (Mtango, 2003), l'augmentation du taux de blastocyste (Fukaya, 1998) et les plus haut taux de gestation (Fukaya, 1998) pourraient être en partie attribuables à la disponibilité accrue du glucose, mais aussi par une augmentation de l'assimilation par l'embryon (Kölle, 2004). En effet, tout semble indiquer que les effets positifs de l'hormone de croissance sont attribuables à l'interaction avec le glucose, puisque Iwata et al. (2003) ont observé que l'hormone de croissance n'avait aucun impact en l'absence de glucose.

De plus, la présence d'hormone de croissance dans le milieu de culture augmente le nombre de mitochondries présentes (Kölle, 2004). Celles-ci étant essentielles pour fournir l'énergie à l'embryon en développement, la présence plus élevée de mitochondries présentes pourrait augmenter la quantité d'énergie disponible pour l'embryon. Dans un même ordre d'idées, l'ajout d'hormone de croissance au milieu de culture entraînerait des modifications à la zone pellucide qui favoriseraient le transport des nutriments (Kölle, 2004). En effet, les embryons mis en présence d'hormone de croissance ont une zone pellucide ponctuée d'un nombre accru de pores, entraînant du même coup une augmentation du transport des nutriments de l'utérus vers l'embryon, après l'attachement embryonnaire.

c. EGF

Le facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor) a un large rayon d'actions, à commencer par la prolifération et la différenciation cellulaire (Adamson, 1990). Chez la souris, l'ajout d'EGF a été associé à une augmentation de la synthèse protéique (Wood, 1989), une augmentation du taux de développement du stade 2 cellules jusqu'au stade blastocyste et une augmentation du nombre de cellules par blastocyste (Dardik, 1991).

L'EGF pourrait également avoir une activité dite paracrine, c'est-à-dire une activité de régulation initiée par des signaux de cellules voisines. En effet, l'EGF pourrait bien intervenir dans le processus d'attachement embryonnaire en stimulant les cellules du trophoblaste. L'hormone pourrait également aider à la prolifération des cellules du trophoblaste et de la protéinase qui est essentielle à l'invasion de la paroi utérine (Kaye, 1995).

d. TGF- β

Le TGF (Transforming growth factor- β) est reconnu pour inhiber ou favoriser la prolifération cellulaire, favoriser le remodelage tissulaire, la formation d'une matrice

extracellulaire, contrôler les molécules des cellules de surface et la modification des cellules immunologiques (Kane, 1997).

Plus précisément concernant la production *in vitro*, la présence de TGF avec celle de FGF (Fibroblast Growth Factor) améliore la formation de blastocystes (Larson, 1992). Cependant, quelques études suggèrent que le TGF n'a aucun effet sur le développement embryonnaire des bovins (Lee, 1995; Keefer, 1994) mais pourrait jouer un rôle dans l'augmentation du nombre de récepteurs d'EGF (Assoian, 1984). Chez la souris, il a déjà été prouvé que l'ajout de TGF améliorerait le développement embryonnaire (Paria, 1990).

Hypothèses de recherche

À prime abord, il est difficilement concevable que des embryons produits in vivo et in vitro puissent être identiques sur le plan morphologique autant que pour l'expression génique. En plus des lieux de culture dramatiquement opposés (oviducte versus pétri de culture), l'embryon produit in vivo baigne dans l'histotrophe (sécrétions de l'oviducte), un milieu nourricier composé de sécrétions des cellules de l'oviducte et de l'utérus qui permettent de combler les besoins nutritifs de l'embryon lors du développement précoce, alors qu'un embryon produit in vitro est produit dans des gouttes de Synthetic Oviductal Fluid (SOF), un milieu de culture dont la concentration en sels et en nutriments fut à la base estimé à partir d'un échantillon de l'histotrophe d'une brebis. Or, l'histotrophe des mammifères est également composé de sang extravasculaire, dont le rôle dans le développement embryonnaire précoce n'est pas encore bien défini, mais qui est plus ou moins remplacé par le sérum dans les milieux de culture in vitro. De plus, les conditions gazeuses et de pH variables entraînées par les changements de milieux de culture et les manipulations fréquentes (dénudation, changement de gouttes, etc.) lors de la production in vitro peuvent entraîner un stress (stress oxydatifs entre autres) qui ne sont pas présents in vivo.

La raison d'être de ce mémoire est tout d'abord de déterminer les fluctuations d'expression génique et de qualité embryonnaire liées aux conditions de laboratoire pour des blastocystes bovins produits in vitro. Il est capital d'évaluer si les résultats issus d'un même protocole de production in vitro sont répétables d'un laboratoire à un autre pour s'assurer que les protocoles publiés sont universels. Notre hypothèse de recherche sous-jacente à cette partie du projet est qu'avec un système de production unique, il est possible de comparer des données d'expression génique d'un laboratoire à un autre.

Facteur relativement important et indéniable de variation entre deux laboratoires utilisant un protocole unique, l'expérience du manipulateur peut amplifier le stress de ces manipulations supplémentaires nécessitées par la production in vitro, en exécutant plus ou moins rapidement et habilement les manipulations des embryons hors de l'incubateur, c'est-à-dire dans un environnement où la température, la concentration gazeuse et la

luminosité (photosensibilité des embryons) sont non optimales au développement embryonnaire. Autre facteur pouvant nuire à la répétabilité des résultats d'un laboratoire à un autre, l'utilisation d'additifs d'origine animale non défini (sérum) et semi-défini (BSA) pour mimer les conditions *in vivo* peut entraîner des résultats variablement satisfaisants en fonction des lots et des compagnies dont proviennent ces produits. En effet, ceux-ci ont un niveau de pureté variable qui rend très difficile l'étude des besoins nutritifs réels de l'embryon ainsi que de l'étude de l'impact précis de ces additifs sur le développement embryonnaire (Thibault, 2001).

Bien que déjà rapporté dans la littérature scientifique, l'évaluation des fluctuations d'expression génique entre les différents modes de production embryonnaire trouve sa pertinence dans l'approche globale préconisée dans ce mémoire. Alors qu'une majorité d'articles ciblent un nombre précis et très limité de gènes à étudier, ce mémoire relate les différences d'expression génique des quelques 16 121 gènes connus à ce jour pour être impliqués dans le développement embryonnaire précoce bovin, et ce, selon 4 systèmes de production embryonnaire utilisés mondialement : *in vitro*-SOF, *in vitro* avec support cellulaire, *in vitro*-SOF avec ponction transvaginale des ovocytes et *in vivo*. Le but de cette analyse exhaustive du transcriptome est de cibler les gènes différenciellement exprimés d'une condition à l'autre afin de mieux caractériser les différences entre les différents systèmes et ainsi optimiser les milieux de culture *in vitro* pour produire des embryons de meilleure qualité. Notre hypothèse est que l'analyse du transcriptome permettra d'évaluer le niveau de perturbation global des systèmes de production *in vitro*.

Bibliographie

Adamson ED. 1990. EGF receptor activities in mammalian development. *Mol Reprod Dev.* 1990 Sep;27(1):16-22.

Agca Y, Monson RL, Northey DL, Mazni OA, Schaefer DM, Rutledge JJ. 1998. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology.* Jul 1;50(1):147-62

Alomar M, Tasiaux H, Remacle S, George F, Paul D, Donnay I. 2008. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. *Anim Reprod Sci.* 2008 Aug;107(1-2):48-61

Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ: Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J Cell Sci* 2004, 117:3645-3657

Assey RJ, Hyttel P, Roche JF, Boland M. 1994. Oocyte structure and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. *Mol Reprod Dev* 39: 8-16.

Assoian RK, Frolik CA, Roberts AB, Miller DM, Sporn MB. 1984. Transforming growth factor-beta controls receptor levels for epidermal growth factor in NRK fibroblasts. *Cell.* 1984 Jan;36(1):35-41.

Avery B, Bak A, Schmidt M. 1989. Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos. *Theriogenology.* Jul;32(1):139-47

Barker DJ. 2003. The developmental origins of adult disease. *European Journal of Epidemiology* 18733-736.

Barnes FL, Eyestone WH. 1988. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology* 33:141-152.

Bayer EC. Gap junctions. *Int Rev Cell Biol* 1993; 137:1-29.

Blondin Patrick, Peter W. Farin, Adrienne E. Crosier, Joseph E. Alexander, Charlotte E. Farin. 2000. In Vitro Production of Embryos Alters Levels of Insulin-like Growth Factor-II Messenger Ribonucleic Acid in Bovine Fetuses 63 Days After Transfer. *Biology of Reproduction.* February 1, 2000 vol. 62 no. 2 384-389.

Blondin P., K. Coenen, L.A. Guilbault and M.-A. Sirard. 1997. In Vitro Production of Bovine Embryos: Developmental Competence is Acquired Before Maturation. *Theriogenology* 47:1061-107

Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA. 1996. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology.* Nov 1;46(7):1191-203.

Blondin Patrick, Sirard Marc-André. 1995. Oocyte and Follicular Morphology as Determining Characteristics for Developmental Competence in Bovine Oocytes. *Molecular Reproduction and development* 41:54-62

Boni R, Tosti E, Roviello S, Dale B. 1999. Intracellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod* 61: 1050–1055.

Bousquet, D., Burnside, E.B., Van Doormaal B. J., 2002. Biotechnologies of reproduction applied to dairy cattle production: embryo transfer and IVF. CSAS - Symposium – SCAS: 97-103.

Bousquet D., H. Twagiramungu, N. Morin, C. Brisson, G. Carboneau and J. Durocher. 1999. In Vitro Embryo Production In The Cow: an Effective Alternative to the Conventional Embryo Production Approach. *Theriogenology* 51:59-70

Bowles, C.M.; Lishman, A.W. 1998. Attempts to improve the yield of bovine blastocysts by incorporating insulin, selenium and transferrin in the in vitro system. *South African Journal of Animal Science*;1998, Vol. 28 Issue 1, p30

Bredbacka K, Bredbacka P. 1996. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced in vitro. *J Reprod Fertil.* 106(2):169-72

Brill A, Torchinsky A, Carp H, Toder V. 1999. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J Assist Reprod Genet.* 1999 Nov;16(10):512-9

Celestino J.J.H., Matos M.H.T., Saraiva M.V.A., Figueiredo J.R. 2009. Regulation of ovarian folliculogenesis by Kit Ligand and the c-Kit system in mammals. *Anim. Reprod.*, v.6, n.3, p.431-439, Jul./Sept.

Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. 2001. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod* 64:1375–85.

Curchoe, C. L., S. Zhang, L. Yang, R. Page, X. C. Tian. 2009. Hypomethylation trends in the intergenic region of the imprinted IGF2 and H19 genes in cloned cattle. *Animal Reproduction Science*, 2009, 1–13.

Dardik A, Schultz RM. Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: Stimulatory effects of TGF α and EGF. *Development* 1991; 113: 919-930.

De Haan R. Gap junction communication and cell adhesion in development. *Zygote* 1994; 2:183–188.

Dieleman S.J., P.J.M. Hendriksen, D. Viuff, P.D.Thomsen, P. Hyttel, H.M. Knijn, C. Wrenzyck, T.A.M. Kruip, H. Niemann, B.M. Gadella, M.M. Bevers and P.L.A.M. Vos. 2002. Effects of in vitro S.J. Prematuration and in vivo Final Maturation on Developmental Capacity and Quality of Pre-implantation Embryos. *Theriogenology* 575-20

- Driancourt M. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 35:55-79.
- Dunglison GF, Kaye PL. 1993. Insulin regulates protein metabolism in mouse blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 1993 Sep;36(1):42-8.
- Duranthon V, Watson AJ, Lonergan P. 2008. Preimplantation embryo programming: Transcription, epigenetics, and culture environment. *Reproduction* 135:141–150.
- Edwards RG, Fishel SB, Cohen J. 1984. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 3:284–95.
- Eppig JJ, Pendola FL, Wigglesworth K, Pendola JK. 2005. Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. *Biol Reprod* 73(2):351–7.
- Fair T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal reproduction science* 78(3-4):203-216.
- Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology.* 7;65(1):178-91
- Farin PW, Crosier AE, Farin CE. 2001. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 55: 151–170.
- Ferguson EM, Leese HJ. 1999. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J Reprod Fertil* 116:373–378.
- Feuerstein P., V. Cadoret, R. Dalbies-Tran, F. Guérif, D. Royère. 2006. Oocyte–cumulus dialog. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 34 793–800
- Fukaya T, Yamanaka T, Terada Y, Murakami T, Yajima A. 1998. Growth hormone improves mouse embryo development in vitro, and the effect is neutralized by growth hormone receptor antibody. *Tohoku J Exp Med.* 1998 Feb; 184(2):113-22.
- Gardner, H.G. and Kaye, P.L. 1991. Insulin increases cell numbers and morphological development in mouse pre-implantation embryos in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.*, 3, 79–91.
- Griffiths, Wessler, Lewontin, Gelbart, Suzuki, Miller, 2006. *Introduction à l'analyse génétique.* Édition de Boeck University, Bruxelles, Belgique
- Griffiths, Anthony JF; Miller, Jeffrey H; Suzuki, David T; Lewontin, Richard C; Gelbart, William M (2000). "Chromosome Mutation II: Changes in Chromosome Number". *An Introduction to Genetic Analysis* (7th ed.). 2009. New York: W. H. Freeman. ISBN 978-0-7167-3520-5. Retrieved 2009-06-21
- Gualtieri R, Santella L, Dale B. 1992. Tight junctions and cavitation in the human pre-embryo. *Mol Reprod Dev.* 1992 May;32(1):81-7

Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D, Ward FA, Boland MP, Pintado B, de la Fuente J. 2001. Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 2001; 55:1117–1126.

Hare WCD, Singh EL, Betteridge KJ, Eaglesome MD, Randall GCB, Mitchell D, Bilton RJ, Trounson AO. 1980. Chromosomal analysis of 159 bovine embryos collected 12 to 18 days after estrus. *Can J Genet Cytol* 22:615–626.

Harvey, M.B. and Kaye, P.L. 1991. Mouse blastocysts respond metabolically to short-term stimulation by insulin and IGF-1 through the insulin receptor. *Mol. Reprod. Dev.*, 29, 253–258.

Harvey, M.B. and Kaye, P.L. 1990. Insulin increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts in vitro. *Development*, 110, 963–967.

Harvey, M.B. and Kaye, P.L. 1988. Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos. *Endocrinology*, 122, 1182–1184.

Hasler JF. 2000. In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Hum Reprod.* 2000 Dec;15 Suppl 5:47-58.

Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen P J, Jin ZQ, Mc Cauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43:141-152.

Hasler JF. 1994. Commercial applications of in vitro fertilization in cattle. *The Compendium*;16:1062-1073.

Hernandez-Fonseca, H.J., Sirisathien, S., Bosch, P., Cho, H.S., Lott, J.D., Hawkins, L.L., Hollett, R.B., Coley, S.L., Brackett, B.G. 2002. Offspring resulting from direct transfer of cryopreserved bovine embryos produced in vitro in chemically defined media. *Anim. Reprod. Sci.* 69 (3–4), 151–158.

Heyner, S., Smith, R.M. and Schultz, G.A. 1989. Temporally regulated expression of insulin and insulin-like growth factors and their receptors in early mammalian development. *Bioessays*, 11, 171–176.

Hiroyuki Abe, Shoko Yamashita, Takehiro Itoh, Takeshi Satoh, Hiroyoshi Hoshi. 1999. Ultrastructure of Bovine Embryos Developed From In Vitro–Matured and –Fertilized Oocytes: Comparative Morphological Evaluation of Embryos Cultured Either in Serum-Free Medium or in Serum-Supplemented Medium. *Molecular Reproduction and Development* 53:325–335

Hornsby, P.J. & Gill, G.N. 1981. Regulation of glutamine and pyruvate oxidation in cultured adrenocortical cells by cortisol, antioxidants, and oxygen: Effects on cell proliferation. *J. cell. Physiol.* 109, 111-12

Hyttel P, Greve T, Callense H (1989): Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J Reprod Fertil* 38: 35-47

Iwata H, Ohota M, Hashimoto S, Kimura K, Isaji M, Miyake M. 2003. Stage-specific effect of growth hormone on developmental competence of bovine embryos produced in-vitro. *J Reprod Dev.* 2003 Dec;49(6):493-9.

Izadyar F, Van Tol HT, Hage WG, Bevers MM. 2000. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during in vitro development. *Mol Reprod Dev.* 2000 Nov;57(3):247-55.

Joenje, H. 1989. Genetic toxicology of oxygen. *Mut. Res.* 219, 193-208.

Kane M.T., P.M. Morgan, C.Coonan. 1997. Peptide growth factors and preimplantation development. *Human Reproduction Update.* vol. 3, No. 2 pp. 137-157

Kaye, Peter L., Mark B. Harvey. 1995. The Role of Growth Factors in Preimplantation Development. *Progress in Growth Factor Research*, vol. 6. Pp. 1-24.

Keefer CL, Stice SL, Paprocki AM, Golueke P. 1994. In vitro culture of bovine IVM-IVF embryos: cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. *Theriogenology* 41:1323-1331

King WA. 1991. Embryo-mediated pregnancy failure in cattle. *Can Vet J* 32:99-103.

Kochha, H.P.S., K.P. Kochhar, P.K. 2003. Basrur and W.A. King, Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos, *Anim. Reprod. Sci.* 77 (2003), pp. 33-49

Kölle S, Stojkovic M, Reese S, Reichenbach HD, Wolf E, Sinowatz F. 2004. Effects of growth hormone on the ultrastructure of bovine preimplantation embryos. *Cell Tissue Res.* 2004 Jul;317(1):101-8. Epub 2004 May 29.

Koo Deog-Bon, Yong-Kook Kang, Young-Hee Choi, Jung Sun Park, Ha-Na Kim, Keon Bong Oh, Dong-Soo Son, Humdai Park, Kyung-Kwang Lee, Yong-Mahn Han. 2002. Aberrant Allocations of Inner Cell Mass and Trophectoderm Cells in Bovine Nuclear Transfer Blastocyst. *Biology of Reproduction* 67, 487-49.

Koo DB, Kim NH, Lee HT, Chung KS. 1997. Effects of fetal calf serum, amino acids, vitamins and insulin on blastocoel formation and hatching of in vivo and IVM/IVF-derived porcine embryos developing in vitro. *Theriogenology.* 1997 Oct 1;48(5):791-802.

Kubisch H.M., Larson M.A. and Roberts R.M. 1998. Relationship between age of blastocyst formation and interferon- τ secretion by in vitro-derived bovine embryos. *Mol Reprod Dev* vol. 49, pp. 254-260.

Larson RC, Ignatz GG, Currie WB. 1992. Transforming growth factor p and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine development during the fourth cell cycle. *Mol Reprod Dev.* 33: 431435.

Lazzari Giovanna, Christine Wrenzycki, Doris Herrmann, Roberto Duchi, Theo Kruip, Heiner Niemann, Cesare Galli. 2002. Cellular and Molecular Deviations in Bovine In Vitro-Produced Embryos Are Related to the Large Offspring Syndrome. *Biology of Reproduction* 67, 767–775

Lee, E.S. and Fukui, Y. 1995. Effect of various growth factors in a defined culture medium on in vitro development of bovine embryos matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, 44, 71–83.

Leese, H. J., Baumann, C. G., Brison, D. R., McEvoy, T. G., & Sturmey, R. G. 2008. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Molecular Human Reproduction*, 14(12), 667-672.

Leitch H. W., Smith C., Burnside E. B., Quinton M. 1995. Effects of female reproductive rate and mating design on genetic response and inbreeding in closed nucleus dairy herds. *Animal science* 60: 389-400.

Lerner S. P., W. V. Thayne, R. D. Baker, T. Henschen, S. Meredith, E. K. Inskeep, R. A. Dailey, P. E. Lewis and R. L. Butcher. 1986. Age, Dose of FSH and Other Factors Affecting Superovulation in Holstein Cows. *J Anim Sci* 63:176-183.

Levy RR, Cordonier H, Czyba JC, Guerin JF. 2001. Apoptosis in preimplantation mammalian embryo and genetics. *Ital J Anat Embryol.* ;106(2 Suppl 2):101-8.

Loi P., M. Clinton, I. Vackova, J.Fulka Jr., R. Feil, C. Palmieri, L. D. Salda, G. Ptak. 2006. Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. *Theriogenology*, Vol. 65, pp. 1110–1121.

Lonergan P., T. Fair, D. Corcoran, A.C.O. 2006. Evans Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65 137–152

Lonergan Patrick, Hanne G. Pedersen, Dimitrios Rizos, Torben Greve, Preben D. Thomsen, Trudee Fair, Alex Evans, and Maurice P. Boland. 2004. Effect of the Post-Fertilization Culture Environment on the Incidence of Chromosome Aberrations in Bovine Blastocysts. *Biology of Reproduction* 71, 1096–1100

Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland MP. 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 117: 159–167.

- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. *Mol Reprod Develop* 37:48-53
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* ;41:67-72.
- Loos F, van Maurik P, van Beneden T, Kruip TA. 1992. Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. *Mol Reprod Dev.* 31(3):208-14
- Loskutoff NM, Betteridge KJ. 1993. Prospects for improving the survival rate of transferred embryos, *Mol Reprod Dev* 36, pp. 262–265
- Madrid-Bury, N. Madrid-Bury, R. Fernandez, A. Jimenez, S. Perez-Garnelo, P.N. Moreira, B. Pintado, J. De la Funete and A. Gutierrez-Adan. 2003. Effect of ejaculate, bull, and double swim-up processing method on sperm sex ratio, *Zygote* 11 (2003), pp. 229–235
- Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. 1995. Effects of supplementation of the maturation media with insulin on in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Jpn J Vet Res.* Dec;43(3-4):145-53.
- Mermillod P, Vansteenbrugge A, Wils C, Mourmeaux JL, Massip A, Dessy F. 1993. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biol Reprod.* Sept;49(3):582-7.
- Mihalik J, Reháč P, Koppel J. 2000. The influence of insulin on the in vitro development of mouse and bovine embryos. *Physiol Res.* 2000; 49(3):347-54.
- Miles Jeremy R., Charlotte E. Farin, Karina F. Rodriguez, Joseph E. Alexander, Peter W. Farin. 2005. Effects of Embryo Culture on Angiogenesis and Morphometry of Bovine Placentas During Early Gestation. *Biology of Reproduction* 73, 663–671
- Mohr LR, Trounson AO. 1981. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol Reprod.* 1981 Dec;25(5):1009-25
- Mtango N. R., M. D. Varisanga, Y. J. Dong, R. Rajamahendran, T. Suzuki. 2003. Growth factors and growth hormone enhance in vitro embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. Volume 59, Issues 5-6, Mars, Pages 1393-1402
- Narinder K. Khurana and Heiner Niemann. 2000. Energy Metabolism in Preimplantation Bovine Embryos Derived In Vitro or In Vivo. *Biology of Reproduction* 62, 847–856
- Niemann H, Wrenzycki C. 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 53:21–34.

Pantaleon M, Ryan JP, Gil M, Kaye PL. 2001. An unusual subcellular localization of GLUT1 and link with metabolism in oocytes and preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod.* Apr;64(4):1247-54.

Pantaleon M, Whiteside EJ, Harvey MB, Barnard RT, Waters MJ, Kaye PL. 1997. Functional growth hormone (GH) receptors and GH are expressed by preimplantation mouse embryos: a role for GH in early embryogenesis? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 13;94(10):5125-30.

Pantaleon M, Kaye PL. 1996. IGF-I and insulin regulate glucose transport in mouse blastocysts via IGF-I receptor. *Mol Reprod Dev.* 1996 May;44(1):71-6.

Paria, B.C. and Dey, S.K. 1990. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4756–4760.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M.A. & First, N.L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 39, 1171-1180

Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann A. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev* 31:63-67.

Penfold LM, Holt C, Holt WV, Welch GR, Cran DG, Johnson LA. 1998. Comparative motility of X and Y chromosome-bearing bovine sperm separated on the basis of DNA content by flow sorting. *Mol Reprod Dev.* 50(3):323-7.

Pinyopummintr T, Bavister BD. 1994. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology.* 1994;41(6):1241-9.

Pollard J. W., A. Martino, N. D. Rumph, N. Songsasen, C. Plante, S. P. Leibo. 1996. Effect of Ambient Temperatures During Oocyte Recovery on in vitro Production of Bovine Embryos. *Theriogenology* 46:64-358.

Pollard JW, Leibo SP. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 41:101–106.

Prather RS, First NL. 1993. Cell-to-cell coupling in early-stage bovine embryos: A preliminary report. *Theriogenology.* 39(3):561-7

Rajesh K Naz and Preeti B Rajesh. 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2:75

Réseau laitier canadien. 2010. Sommaire des changements à la base mobile, [En ligne]. <http://www.cdn.ca/francais/document.php?id=176>. Page consultée le 2 janvier 2010.

Réseau laitier canadien. 2007. Analyse des génisses enregistrées dans le livre généalogique, [En ligne]. <http://www.cdn.ca/francais/document.php?id=133>. Page consultée le 28 mai 2009.

Réseau laitier canadien. 2003. Part de marché du secteur d'I.A. au Canada, [En ligne]. <http://www.cdn.ca/francais/document.php?id=33>. Page consultée le 30 mai 2009.

Rizos D., A. Gutierrez-Adan, S. Perez-Garnelo, J. de la Fuente, M.P. Boland, and P. Lonergan. 2003. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression. *Biology of Reproduction* 68, 236–243

Rizos Dimitrios, Fabian Ward, Pat Duffy, Maurice P. Boland and Patrick Lonergan. 2002. Consequences of Bovine Oocyte Maturation, Fertilization or Early Embryo Development In Vitro Versus In Vivo: Implications for Blastocyst Yield and Blastocyst Quality. *Molecular Reproduction and Development* 61:234-248

Rizos Dimitrios, Trudee Fair, Serafeim Papadopoulos, Maurice P. Boland, and Patrick Lonergan. 2002. Developmental, Qualitative, and Ultrastructural Differences Between Ovine and Bovine Embryos Produced In Vivo or In Vitro. *Molecular Reproduction and Development* 62:320–327

Robert Claude, Serge McGraw, Lyne Massicotte, Marco Pravetoni, Fulvio Gandolfi, and Marc-André Sirard. 2002. Quantification of Housekeeping Transcript Levels During the Development of Bovine Preimplantation Embryos. *Biology of Reproduction* 67, 1465–1472

Ryohei Sekido and Robin Lovell-Badge. 2008. Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? Elsevier vol:10.1016/j.tig. 2008.10.008

Schultz, G.A., Hogan, A., Watson, A.J. 1992. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 4, 361–371.

Sinclair KD, Young LE, Wilmut I, McEvoy TG. 2000. In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Hum Reprod* 15(Suppl. 5):68–86.

Sirard, M.-A., *Ovogenèse et folliculogenèse, Notes de cours automne 2009*

Sirard Marc-André, François Richard, Patrick Blondin, Claude Robert. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65 126–136

Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML, First NL. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol Reprod.* 1988 Oct;39(3):546-52

Sirard, M.A., Lambert, R.D., Guay, P., Ménard, D.P. & Bedoya, M. 1985 In vivo and in vitro development of in vitro fertilized bovine follicular oocytes obtained at laparoscopy. *Theriogenology* 23, 230, Abstr.

Slimane Wafa, Yvan Heyman, Yvette Lavergne, Patrice Humblot and Jean Paul Renard. 2000. Assessing Chromosomal Abnormalities in Two Cell Bovine In Vitro-Fertilized Embryos by Using Fluorescent In Situ Hybridization with Three Different Cloned Probes. *Biology of Reproduction* 62, 628–635

Statistique Canada. 2009. Centre canadien d'informations laitières, [En ligne]. http://www.dairyinfo.gc.ca/pdf/publication_2009.pdf. Page consultée le 15 novembre 2010.

Stojanov T, Alechna S, O'Neill C. 1999. In-vitro fertilization and culture of mouse embryos in vitro significantly retards the onset of insulin-like growth factor-II expression from the zygotic genome. *Mol Hum Reprod*. Feb;5(2):116-24

Tan SJ, Lu KH. 1990. Effect of different oestrus stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos in vitro. *Theriogenology* 33:335.

Thibier, Michel. 2008. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. *Embryo Transfer Newsletter*. Data Retrieval Committee Statistics of Embryo Transfer - Year 2007.

Thibault C., Levasseur M.-C. 2001. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses Éditions Marketing

Thompson JG, Allen NW, McGowan LT, Bell ACS, Lambert MG, Tervit HR. 1998. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. *Theriogenology* 1998; 49:1239–1249.

Thompson JG. 1995. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* 45:27–40.

Vaccari Sergio, James L. Weeks II, Minnie Hsieh, Frank S. Menniti, Marco Conti. 2009. Cyclic GMP Signaling Is Involved in the Luteinizing Hormone-Dependent Meiotic Maturation of Mouse Oocytes. *Biology of Reproduction*; vol. 81 no. 3 595-604

Vigneault Christian, Serge McGraw, Lyne Massicotte, and Marc-André Sirard. 2004. Transcription Factor Expression Patterns in Bovine In Vitro-Derived Embryos Prior to Maternal-Zygotic Transition. *Biology of Reproduction* 70, 1701–1709

Viuff Dorthe, Anne Palsgaard, Lee Rickords, Lartey G. Lawson, Torben Greve, Mette Schmidt, Birthe Avery, Poul Hyttel and Preben D. Thomsen. Bovine Embryos Contain a Higher Proportion of Polyploid Cells in the Trophectoderm Than in the Embryonic Disc. *Molecular Reproduction and Development* 62:483–488

Viuff D, Rickords L, Offenbergh H, Hyttel P, Avery B, Greve T, Olsaker I, Williams JL, Callesen H, Thomsen PD. 1999. A high proportion of bovine blastocysts produced *in vitro* are mixoploid. *Biol Reprod* 60:1273–1278.

Wilmot I, Polge C, Rowson LEA. 1975. The effect on cow embryos of cooling to 20, 0 and -196°C. *J Reprod Fert* 45:409-411.

Wood SA, Kaye PL. 1989. Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. *J Reprod Fert*. 85: 575-582.

Woudenberg Anna R, Beker-van, Helena T.A. van Tol, Bernard A.J. Roelen, Ben Colenbrander, and Mart M. Bevers. 2004. Estradiol and Its Membrane-Impermeable Conjugate (Estradiol-Bovine Serum Albumin) During *In Vitro* Maturation of Bovine Oocytes: Effects on Nuclear and Cytoplasmic Maturation, Cytoskeleton, and Embryo Quality. *Biology of reproduction* 70, 1465–1474

Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. 2005. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. *Reprod Fertil* 17:23–35.

Wrenzycki C., A. Lucas-Hahn, D. Herrmann, E. Lemme, K. Korsawe, and H. Niemann. 2002. *In Vitro* Production and Nuclear Transfer Affect Dosage Compensation of the X-Linked Gene Transcripts G6PD, PGK, and Xist in Preimplantation Bovine Embryos. *Biology of Reproduction* 66, 127–134

Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. 1999. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev* 53:8–18.

Yanagimachi R Mammalian Fertilization. 1994. In *Physiology of Reproduction*. Raven Press 189-317

Yang MY & Rajamahendran R. 2002. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Animal Reproduction Science* 70 159–169.

Chapitre II : Expérimentation

Identification of sources of variance in bovine in vitro embryo production: impact of laboratory setup

Identification des sources de variation chez l'embryon bovin produit in vitro : l'impact du laboratoire de recherche

Identification of sources of variance in bovine *in vitro* embryo production: impact of laboratory setup

Dany Plourde¹, Christian Vigneault², Isabelle Laflamme¹, Patrick Blondin², Claude Robert^{1,3}

¹. Centre de recherche en biologie de la reproduction, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Laboratory of Functional Genomics of Early Embryonic Development, INAF, Pavillon des services, Université Laval (Québec), Canada G1V 0A6.

². L'Alliance Boviteq Inc., 19320 Grand rang St-François, Saint-Hyacinthe, (Québec), Canada J2T 5H1.

Keywords: bovine, blastocysts, in vitro production, morphology, gene expression.

³ Corresponding author: C. Robert, Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction
Département des Sciences Animales, Université Laval, Québec, Canada
E-mail: claire.robert@fsaa.ulaval.ca
Tel: 418-656-2131 x. 12842

1. Abstract

One of the main goals when performing comparative analysis of embryonic transcriptomes is to identify divergences in gene expression and to relate them to observed phenotypes. The aim is also to identify faulty metabolic pathways that can hint to improvements in culture conditions. One of the main challenges related to this objective remains the underlying requirement to share the sought after improvements with other reproductive biologists or commercial service providers. It is known that biological extracts, namely serum and albumin, as well as the source of semen are factors that influence the performance of in vitro production systems and can impact reproducibility of results between production sites. These sources of variation can impede the potential for knowledge transfer. With the present study, we sought to assess the impact of the production site itself when sharing a common in vitro embryo production protocol. The biological extracts and semen were shared between production sites and thus removed as potential sources of variation. To remove the impact of blastocyst staging, all comparisons were done by comparing expanded blastocysts. Under this controlled setup, produced blastocysts were morphologically very similar in regards to cell number, their allocation to either the trophoblast or inner cell mass or their gender ratio. However, blastocyst yields and the number of Tunel positive cells per embryo differed between production sites. These observations were also confirmed at the gene expression level as indicated by highly similar transcript abundances. Only 36 genes out of the 16,121 that are expressed during bovine pre-hatching development were found to be statistically differentially expressed. A large proportion of them are associated with the apoptotic process. These results highlight the impact of laboratory set up, including personnel experience, when replicating an in vitro production system. Although inherent differences may arise, the high similitude of results between production sites indicates that embryo production protocols have the potential to be transferred and shared.

2. Introduction

In cattle, the natural reproductive cycle leads to the birth of one offspring per year. To enhance the dissemination rate of high genetic merit animals, assisted reproductive technologies are used to increase the number of offspring per year for these valuable animals. Standard procedures involve increasing the amount of fertilizable oocytes through ovarian stimulation, their fertilization in vivo through artificial insemination, the recovery of embryos through uterine flushing and their transfer into surrogates. The in vitro production of these embryos represents a mean to further increase the number of transferable embryos by performing oocyte maturation, fertilization and embryonic growth ex vivo, which allows rapid and more frequent gamete collections. The repeated collection of immature oocytes for in vitro embryo production is estimated to yield almost 3.5 times more transferable embryos than multi-ovulatory embryo transfer procedures (8,9,14).

The commercial implementation of this strategy is possible due to well established in vitro production systems for the bovine species. However, it is well known that current in vitro conditions are sub-optimal, as exemplified by lower blastocyst yields (5-7,23,35). In addition, there is a well documented increase in the frequency of ill phenotypes in in vitro produced embryos e.g. lower cryotolerance (32), a skew in gender ratio in favour of males (17,19,20) and altered cellular counts between the inner cell mass and the throphectoderm (1), which may culminate into the development of the abnormal offspring syndrome (28).

To better understand the nature of these induced deviations, comparative gene expression analyses have been widely performed (21,22,24,29,30,43,44). So far, little is known on the physiological significance of these RNA abundance differences. In fact, heavy discordance between reports suggests a lack of correlation between results produced by different laboratories. In this respect, we recently benchmarked every aspect of a typical sample handling procedure for microarray analysis and showed they have a very high impact on the ensuing gene lists (16). In the current study, our concern was the impact of the in vitro production systems themselves on gene expression results. It is well accepted that although the number of in vitro systems in usage is limited, many variations, ranging from minor to

major modifications, have been introduced into each system by laboratories. The interpretation of data produced by different research teams relies on our knowledge of the inherent sources of variations introduced by these discrepancies between standard in vitro embryo production systems. Furthermore, the integration of any improvement based on these studies is tightly linked to the potential for knowledge transfer. It is already known that the source of biologically extracted components that are part of in vitro production systems, such as serum, albumin and hormones, can deeply influence embryonic production (4,18,33). With the current study, we seek to determine the extent of variance that can be attributed to laboratory set up and personnel alone. We hypothesized that the impact of the production site is marginal when using a common protocol. As such, a common vitro production protocol was strictly followed at both sites and biological components i.e. BSA and semen were shared. Additionally, both sites collected ovaries from the same slaughterhouse to remove any impact the source of oocytes might have on embryo production. Embryos were compared on the basis of several different phenotypic characteristics as well as at the gene expression level. These results clearly indicate that inter-laboratory data can be compatible given that care is taken and a common production protocol is used.

3. Materials and methods

All chemicals were from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO) unless specified otherwise.

a. In vitro embryo production

i. Oocyte recovery and selection

Dairy bovine ovaries were obtained from a commercial slaughterhouse and transported to the laboratory in saline (0.9% NaCl) containing 1% antimycotic agent. Cumulus-oocyte complexes (COCs) from 2 to 6 mm follicles were collected by aspiration using an 18G 1½ needle attached to a 10 ml syringe. Healthy COCs with at least 5 layers of cumulus were selected for maturation. COCs with fragmented cytoplasm, pyknotic cumulus, pale nuclei and abnormal morphology were automatically rejected.

ii. In vitro maturation

The COCs were placed in HEPES buffered Tyrode's media (TLH) solution (supplemented with 10% bovine serum, 5 µl/ml pyruvate 40 mM and 1 µl/ml gentamicin 50 mg/ml) and washed generously twice, to ensure the absence of contamination from follicular liquid. Groups of 10 healthy COCs were placed in 50 µl droplets of media under 9 ml of filtered mineral oil. Maturation media was composed of TCM199 (Gibco 11150-059; Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 10% foetal bovine serum (Sterile Fetal Bovine Serum for Cell Culture, Medicorp, Montréal, QC, Canada), 5 µl/ml pyruvate 40 mM, 1 µl/ml gentamicin 50 mg/ml and 0.1 µg/ml follicle stimulating hormone (FSH) (Gonal-f, Serono Canada Inc., Mississauga, QC, Canada). The droplets containing COCs were incubated in an atmosphere for 24 h at 38.5°C with 5% CO₂, 20% O₂ and 100% H₂O.

iii. In vitro fertilization

Matured COCs were washed twice in HEPES buffered Tyrode's media (TLH) solution. Groups of 5 matured COCs were added to 50 µL droplets of media under filtered mineral oil. Each droplet consisted of modified Tyrode lactate media, supplemented with 0.6%

BSA (Sigma fraction V), 40 mM pyruvate and 50 mg/ml gentamicin. Two μ l of PHE (1 mM hypotaurine, 2 mM penicillamine, 250 mM epinephrine) were then added to droplets containing COCs. Spermatozoa used were a cryopreserved pool of ejaculates from five Holstein bulls (Centre d'insémination artificielle du Québec (CIAQ)). The semen was thawed in 37°C water, put on a discontinuous Percoll gradient (2 ml of 45% Percoll over a 2 ml of 90% Percoll) and centrifuged at 700 g for 30 min at room temperature. The supernatant was discarded and spermatozoa pellet were resuspended in *in vitro* fertilization media after spermatozoa concentration was counted with a hemocytometer to obtain a ratio of 10 000 spermatozoa/COCs. The fertilization took place in an incubator for 15 h-18 h at 38.5°C with 5% CO₂, 20% O₂ and 100% H₂O.

iv. In vitro culture

Zygotes and unfertilized COCs were mechanically denuded by repeated pipetting, washed twice in HEPES buffered Tyrode's media (TLH) solution to insure complete removal of cumulus cells. Washed presumptive zygotes were then transferred to culture droplets in groups of 10. For standard culture conditions, embryos were placed in 10 μ l droplets of modified synthetic oviduct fluid (SOF1) under filtered mineral oil. The embryo culture dishes were incubated 38.5°C with 6.5% CO₂, 5% O₂ and 100% humidity. Embryos were transferred in new droplets of synthetic oviduct fluid (SOF2) 72 h post-fertilization and once again 120 h post-fertilization (SOF#3) to prevent toxicity due to ammonium concentration caused by amino acid degradation.

b. Inner cell mass, trophoblast and apoptotic cells staining

Expanded blastocysts freshly collected were washed twice in PBS containing 0.3% BSA. Trophectoderm cells were permeabilized with 1% Triton X-100 and stained with propidium iodide during 25 seconds and then washed twice in PBS. Blastocysts were then fixed with ethanol 100% and nuclei stained with 0.25% Hoechst 33342 overnight. Fixed and stained embryos were then washed twice in PBS. Cells positive for DNA fragmentation were detected by TUNEL using Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), which catalyzes polymerization of labelled nucleotides to free 3'-OH DNA ends, (In Situ Cell

Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). TUNEL labelling was performed as recommended by the manufacturer including negative and positive controls. These fluorescent labels incorporated in nucleotide polymers were detected and quantify by fluorescence microscopy using a Nikon Eclipse E600W with a 40X objective.

c. Determination of sex ratio

Embryos were lysed individually in a microtube by addition of an alkaline solution of 25 mM NaOH. The equivalent of ten percent of the embryo was used for sex diagnosis by real-time PCR using a LightCycler 1.5 apparatus. The sexing assay is a proprietary method developed at L'Alliance Boviteq inc, (St-Hyacinthe, QC, Canada). Briefly, a gene fragment from the X chromosome was amplified as internal control for the presence of DNA and a Y chromosome fragment for the identification of male embryos. Different fluorescent probes specific to each PCR fragment coupled to different dyes (LC640 and LC705) were used to detect the presence of each amplified fragments.

d. Microarray description and experimental design

For high throughput RNA abundance measurements, the EmbryoGENE microarray platform was utilized. The microarray printed by Agilent using the SurePrint technology contains 44k 60-mers oligo-probes (Robert et al., 2011). This microarray was designed specifically to account for 3' representation biases arising from sample amplification and to detect unique features such as 6,175 splice variants and 9,322 novel transcribed and still uncharacterized regions. The experimental design involved two-color hybridizations with full dye-swap technical replication. For all biological contrast, simple direct comparison was performed with 4 independent biological replicates (each composed of a pool of 10 blastocysts) per treatment.

e. RNA extraction and amplification

The RNA extractions were performed using PicoPure RNA kit (Molecular Devices, Downingtown, Pennsylvania, USA) following the manufacturer's recommendations. Potential genomic DNA contamination was prevented by on column DNase 1 treatment (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Purified RNA was recovered in 11 μ L. An aliquot of every sample was used to determine RNA integrity by micro-fluidic profiling using a 2100 BioAnalyzer (Agilent, Santa Clara, California, USA). Only samples with a RNA Integrity Number rate of 7.5 and more were further processed through global amplification using RiboAmpHSPlus kit (Molecular Devices, Downingtown, Pennsylvania, USA) following the manufacturer's recommendations. Following two rounds of amplification, samples were purified with the provided columns and concentration of purified antisense-RNA (aRNA) was determined by UV absorbance using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, Delaware, USA).

f. aRNA labelling and microarrays hybridization

The aRNA samples were labelled using the Universal Linkage System (ULS) kit designed Agilent oligo-arrays (Kreatech Biotechnology, Amsterdam, The Netherlands). Samples were split and fractions were respectively labelled with Cy3 or Cy5. 825 ng of labelled aRNA were used to hybridize the 4x44k microarray. Hybridization occurred in an hybridization oven for 17 h at 65°C. Microarray slides were washed successively in two wash buffers (Agilent Gene Expression Wash Buffer Kit, Agilent, Santa Clara, California, USA) to eliminate environmental contaminants, before being washed in acetonitrile and in a stabilization/drying solution to preserve fluorescence and to help protect from any residues that may remain on slides. Microarrays were then scanned with the PowerScanner (Tecan, Männedorf, Switzerland) and analyzed with Array-Pro Analyzer software (MediaCybernetics, Bethesda, Maryland, USA).

g. Quantitative RT-PCR

Additional pools of 5 blastocysts per sample were collected. Total RNA was extracted using Picopure columns (Molecular Devices, Downingtown, Pennsylvania, USA). Reverse transcription was conducted using the qScript cDNA SuperMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD) with an oligo-dT to prime the reaction according to the manufacturer's recommendations.

Primers for each candidate were designed using the Primer3 Web interface (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Primer sequence, annealing and fluorescence acquisition temperatures, amplicon size and GeneBank accession numbers are shown in Table 1.1. The reaction mixture was composed of the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit components (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) and real-time measurements were conducted in a LightCycler 2.0 apparatus (Roche Diagnostics). Our real-time PCR amplification procedure has been described in detail previously (Gilbert *et al.* 2010). The nature of the amplified products was confirmed using the melting curve profile and DNA sequencing.

h. Data processing and statistical analyses

P-values for embryo quality parameters were calculated using an unpaired two tailed student-test with means associated with embryos production runs.

Microarray data were pre-processed as follows: 1) Background correction was performed by simple subtraction of locally measured background noise for every spot; 2) within-array normalization was performed with Loess; 3) Quantile was applied for inter-array normalization. The normalized dataset was subjected to significance testing using the LIMMA package of Bioconductor (36,37) with the TREAT algorithm for a better control of false discoveries (27). Differences in RNA abundance were considered significant both at the 95% confidence level ($p < 0.05$) and a fold change of 2 (\log_2 fold change of 1). The Between Group Analysis was performed using the Multivariate Analysis of Microarray (MADE4) package of Bioconductor (11,12). Pathway analysis was conducted using

Ingenuity Pathway Analysis Software Version 8.6 (Ingenuity Systems inc., Redwood City, CA).

For quantitative RT-PCR data, normalization was performed using the spiked-in exogenous polyadenylated transcript coding for the green fluorescent protein (GFP) as described previously (41). Testing of statistical significance of observed differences was done using Prism software Version 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). One-way ANOVA was done using Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison tests.

4. Results

a. Performance of in vitro system between production sites

The in vitro production protocol uses the tissue culture media (TCM) to support oocyte maturation and the modified synthetic oviductal fluid (SOF) media to sustain embryonic growth. A common source of serum and BSA were used to minimize the impact of biological contaminants. Straws of frozen semen were commonly shared between sites to eliminate bull effect. To avoid the impact of subjectivity from embryo staging, only expanded stage blastocysts present on day 7.0 post-fertilization were collected for downstream analyses. The typical blastocysts morphology includes a clear inner-cell mass, a size over 120 μm , a blastocelic cavity accounting for at least 50% of total embryonic volume and thinned zona pellucidae (Figure 1.1). The blastocyst rate was determined by the percentage of blastocyst on dy 7.0 post fertilization per oocyte put in maturation (Table 1.2). Overall, the protocol performed better at the commercial service provider (Site B) than at the academia embryo production facilities (Site A) (respectively $30\% \pm 8$ and $20\% \pm 3$) (Table 1.2).

b. Sex ratio

Many factors were considered and homogenized between sites, including semen source, and the sex ratio was determined as a potential indication of divergence between locations.

Production site showed no significant impact on sex ratios as each were in the close vicinity of the natural 50/50 ratio (Table 1.2).

c. Total cell count and cellular allocation

Total number of cells and cellular allocation to either the inner cell mass or to the trophoblast were determined by differential staining (Figure 1.2). Both total cell counts and trophoblast cell counts showed relatively high standard deviation in both laboratories (Table 1.3), while no statistically significant differences were observed (respectively $P = 0,5467$ and $P = 0,8104$). Inner cell mass counts, ICM/TE ratio and ICM % showed little variation and did not significantly differ either (respectively $P = 0.2740$, $P = 0.3496$, and $P = 0.3496$).

d. TUNEL positive cells

TUNEL staining was performed to account for the number of apoptotic cells (Figure 1.2). Apoptotic cells count and consequently the percentage of apoptotic cells were significantly different in that blastocysts produced at the academia site (Site A) showed more apoptosis than embryos produced at the service provider (Site B) (respectively $P = 0.0151$ and $P = 0.0023$) (Table 1.3).

e. Gene expression profiles

Overall, the correlations between microarrays were high (Figure 1.3 A). In fact, the mean correlations between biological replicates ($94.5\% \pm 1.5$) were similar to the ones observed between treatments (site of production) ($93.3\% \pm 0.8$) indicating that the impact of treatment was subtle. This can be observed in the Between Group Analysis (Figure 1.3 B) where replicates for both production sites are clustered together and the variance between replicates illustrated by the vectors is as big as the distance between clusters. The distance and variance are higher for sample collected at the academia setting (Site A) relatively to the ones from the commercial service provider (Site B) (Figure 1.3 B).

The expression profiles indicated that out of the total 16,121 protein encoding genes known to be involved in early bovine development (Robert et al., 2011), only 36 were found to be differentially abundant between the two production sites (Figure 1.4) (Supplemental Table 1.1). In addition to known reference genes, the contrast highlighted an impact on RNA splicing events. Indeed, the production environment influenced the length of the 3'UTR for 8 genes (LOC789567, PLOD2, TPM2, SLC25A21, CYP51A1, SLC1A4, TAOK3, IFIT5, SLC10A1), indicative of the use of an alternate polyadenylation signal sequence (Figure 1.4). Out of the 3,677 feature detecting potential Indel type splicing events, the production sites had no influence on such exonic rearrangements. The yellow spots shown in Figure 1.4 indicate a tandem of microarray features representing the constitutive probe detecting all known variants and one of the two associated features designed to detect the Indel isoforms. Since the fluorescence signal for the other related microarray feature detecting the alternate transcript was at background level, these results provide information on which isoform is differentially expressed but it is not involving differential splicing occurring between production sites which would require both probes designed to detect the Indel variants to be differentially expressed. In addition to splice variant detection, the microarray array also contains a large contingent of features detecting novel transcribed regions (NTR) ($n = 9,322$). In total, 9 of these NTR were differentially abundant between blastocysts produced at different sites (Figure 1.4).

f. Gene list interpretation

Through pathway analysis, we observed that most genes showing differential abundance between production sites are implicated in different apoptosis processes, supporting the TUNEL assay results. The differential expression of apoptosis related genes was further confirmed by qRT-PCR using a panel of 4 candidates (MT1A, UGCG, DNMT3A and IGFBP7) that were found to be differentially expressed by microarray (Figure 1.5). These RNA abundance measurements, performed on additional samples, validated 3 out of the 4 candidates that were tested and confirmed that the apoptosis pathway is indeed more stimulated in embryos produced at Site A (academia) while non associated candidates were unaffected (Figure 1.5).

5. Discussion

Reports of the significant influence of in vitro conditions on embryonic gene expression, either determined through the gene candidate or microarray approach, are abundant in the published literature. Most of these studies have been conducted with the underlying common objective of better understanding the impact of culture conditions or procedures applied in the context of assisted procreation. So far, this wealth of data has not provided clear insight into the mechanisms through which blastocysts react to their environment nor did they enable us to distinguish between a normal compensative response and an aberrant ill fated reaction. This apparent lack of true progress may arise from the wide discrepancies between reports. We previously hypothesized that variation in sample handling procedures are the cause of these differences to the extent of rendering most datasets incompatible. We have recently shown, by benchmarking the common sample handling procedures that lead to the generation of microarray probes, that some specific steps, such as the global amplification process, can have a profound impact on end point results (16).

In all logic, variance between reports can also arise from embryo production procedures themselves. This consideration is of prime importance for knowledge transfer between research teams and commercial service providers. It is well known that culture media components extracted from biological sources such as BSA, serum or hormones represent an important source of variance due to the contaminants that remain following purification (4,18,33). The source of gametes is also known to influence developmental competence (3,25,31,35,38). The variance introduced by the source of semen is most often referred to as the “bull-effect” (26,42). With these considerations came along concerns about the impact of the overall laboratory setup, including the brand of petri dishes (34), incubators (2), the purity level of gas, type of overlaying oil (39), etc. along with the potential impact of the personnel performing the work. In other words, how much of our observations are associated with laboratory setup rather than with the experimental treatment itself? This question is important to determine the level of reproducibility of studies performed in different laboratories and how it could influence the interpretation of dataset. It is also pertinent to determine whether knowledge transfer is possible once these studies have identified conditions to improve embryonic production. The present study was thus set up

to produce bovine blastocysts at two distinct sites using a common in vitro production protocol while sharing all other conditions such as the source of biological extracts, BSA, serum and semen. For each type of analysis, all samples were processed by a single person and all samples were processed using the same technological platform.

Another consideration that needed to be addressed pertained to the stage at which the blastocysts would be collected. By definition, a blastocyst is the embryonic stage characterized by the presence of a cavity. It is well known that blastocysts represent a very heterogeneous cohort of embryos. Practitioners routinely face this issue when selecting 3embryos to be transferred into recipients. As a tool, embryonic quality classification based on morphological characteristics has been developed (13,15,40). In the current study, the selection of a specific class of blastocysts was justified by the need to limit variance to the one introduced by the laboratory setup. As such, early expanding blastocysts were used to negate the effect of subjective classification that could have arisen between sites. It is noteworthy to mention that some experimental designs involve a treatment that will influence blastocyst morphology and thus the selection of a specific morphology may not apply to every study.

Within this very controlled context, blastocysts produced at both sites were, morphologically and at the gene expression level, very similar. Although blastocyst yield was higher at one site, the numbers of cells per embryo were not different between sites nor were cell allocation and sex ratios. Conversely, the number of TUNEL positive cells and blastocyst rates were significantly different between sites. Blastocysts produced at the commercial service provider contained less TUNEL positive cells than the ones produced in the academia setup. These concerns were confirmed at the gene expression level where apoptosis related genes were found to be differentially expressed. In addition to general laboratory setup, personnel experience could have been a factor. Personnel skill level will have an impact on the time the oocytes/embryos spend outside the incubator. Furthermore, the level of traffic in these incubators in a multi-user context will affect temperature and gas level stability.

The microarray also enabled the study of different aspects of the transcriptome by including features that detect splice variants, 3' untranslated region tiling and uncharacterized novel transcribed regions (NTRs). The observed impact of the production site on splicing was unexpected. However, the number of differential splicing events ($n = 9$) solely involved events occurring in the 3'UTR since none of the 3,677 features designed to detect InDel splicing events were not significantly influenced by the site of embryo production. So far, the physiological significance of transcript isoforms of different 3'UTR region length on blastomere activity remains unknown. The production site also had a marginal impact on the expression of NTRs where only 9 out of 9,322 were found to be differentially expressed. The physiological implication of these NTR is also unknown. A recent publication highlighted the important fluctuation in NTR expression during somatic reprogramming (10). The implication of these observations in the embryonic physiology still remains to be studied as it is still unknown whether the expression of NTRs results from a specific chromatin configuration is in response to stress or whether they are part of the normal embryonic transcriptome.

6. Conclusion

These results show that subtle differences within the embryo production workflow can significantly impact embryonic yield causing shifting in the blastocyst populations in regards to their quality grades. The comparison of mixed grades blastocysts would result in important discrepancies detected at the gene expression level that would be reflective of the different blastocyst populations rather than treatment itself. The selection of a specific class of blastocysts can mitigate these impacts. Also, the very close similarities that were found between blastocysts of similar morphologically produced using a common protocol across sites also indicate that results can be repeated across IVF laboratories suggesting the potential for technology transfer.

FUNDING

This work received support from the EmbryoGENE Network, which is supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant number NETGP340825-06). Additional support was provided by the Ministère du développement économique, innovation et exportation of the province of Québec from a grant obtained within the Programme de soutien à la recherche (grant number PSR-SIIRI-238).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Julie Nieminen (Université Laval, Canada) for critical review of the manuscript and language correction and also Dominic Gagné for his support for microarray hybridization and quantitative RT-PCR measurements.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

DP: generated the data from Site A, performed the microarray experiments and drafted the manuscript. CV: contributed to the conception and design of the study, generated the data from Site B, sexed the embryos and contributed to drafting the manuscript. IL: supported embryo production on Site A. PB: contributed to the conception and design of the study. CR: conceptualized and designed the study and supervised the trainee (DP).

DECLARATION OF INTEREST

There is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

7. References

1. Augustin R, Pocar P, Wrenzycki C, Niemann H, Fischer B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* 2003;126: 91-99.
2. Avery B, Greve T. Impact of incubator type on the yield of in vitro produced bovine blastocysts. *Acta Vet Scand* 1992;33: 341-348.
3. Barnes FL, Sirard MA. Oocyte maturation. *Semin Reprod Med* 2000;18: 123-131.
4. Batt PA, Miller BG. Development of sheep embryos in vitro in a medium supplemented with different batches of serum albumin. *Aust J Biol Sci* 1988;41: 371-376.
5. Bermejo-Alvarez P, Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A. Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. *Reprod Biomed Online*;20: 341-349.
6. Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 2002;66: 38-43.
7. Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* 1997;47: 1061-1075.
8. Bousquet D, Burnside EB, Van Doormaal BJ. Biotechnologies of reproduction applied to dairy cattle production: Embryo transfer and IVF. *Can J Anim Sci* 1998;83: 403-407.
9. Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 1999;51: 59-70.
10. Bui LC, Evsikov AV, Khan DR, Archilla C, Peynot N, Henaut A, Le Bourhis D, Vignon X, Renard JP, Duranthon V. Retrotransposon expression as a defining event of genome reprogramming in fertilized and cloned bovine embryos. *Reproduction* 2009;138: 289-299.
11. Culhane AC, Perriere G, Considine EC, Cotter TG, Higgins DG. Between-group analysis of microarray data. *Bioinformatics* 2002;18: 1600-1608.
12. Culhane AC, Perriere G, Higgins DG. Cross-platform comparison and visualisation of gene expression data using co-inertia analysis. *BMC Bioinformatics* 2003;4: 59.
13. Donaldson LE. Matching of embryo stages and grades with recipient oestrous synchrony in bovine embryo transfer. *Vet Rec* 1985;117: 489-491.
14. Durocher J, Morin N, Blondin P. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology* 2006;65: 102-115.
15. Farin PW, Britt JH, Shaw DW, Slenning BD. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology* 1995;44: 339-349.
16. Gilbert I, Scantland S, Sylvestre EL, Dufort I, Sirard MA, Robert C. Providing a stable methodological basis for comparing transcript abundance of developing embryos using microarrays. *Mol Hum Reprod*;16: 601-616.

17. Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D, Ward FA, Boland MP, Pintado B, de la Fuente J. Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 2001;55: 1117-1126.
18. Kane MT. Variability in different lots of commercial bovine serum albumin affects cell multiplication and hatching of rabbit blastocysts in culture. *J Reprod Fertil* 1983;69: 555-558.
19. Kimura K, Iwata H, Thompson JG. The effect of glucosamine concentration on the development and sex ratio of bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 2008;103: 228-238.
20. Kimura K, Spate LD, Green MP, Roberts RM. Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 2005;72: 201-207.
21. Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJ, Vos PL, Herrmann D, van der Weijden GC, Niemann H, Dieleman SJ. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. *Reproduction* 2002;124: 365-375.
22. Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJ, Vos PL, Zeinstra EC, van der Weijden GC, Niemann H, Dieleman SJ. In vitro and in vivo culture effects on mRNA expression of genes involved in metabolism and apoptosis in bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 2005;17: 775-784.
23. Lonergan P, Fair T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 2008;69: 17-22.
24. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies. *Reprod Biomed Online* 2003;7: 657-663.
25. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim* 2003;38: 259-267.
26. Machado GM, Carvalho JO, Filho ES, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MA. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 2009;71: 1289-1297.
27. McCarthy DJ, Smyth GK. Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics* 2009;25: 765-771.
28. McEvoy TG, Sinclair KD, Young LE, Wilmut I, Robinson JJ. Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture in vitro: relevance to blastocyst culture in human ART. *Hum Fertil (Camb)* 2000;3: 238-246.
29. McHughes CE, Springer GK, Spate LD, Li R, Woods R, Green MP, Korte SW, Murphy CN, Green JA, Prather RS. Identification and quantification of differentially represented transcripts in in vitro and in vivo derived preimplantation bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 2009;76: 48-60.
30. Niemann H, Wrenzycki C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 2000;53: 21-34.
31. Palma GA, Sinowatz F. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. *Anat Histol Embryol* 2004;33: 257-262.

32. Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod* 2003;68: 236-243.
33. Rorie RW, Miller GF, Nasti KB, McNew RW. In vitro development of bovine embryos as affected by different lots of bovine serum albumin and citrate. *Theriogenology* 1994;42: 397-403.
34. Schiewe MC, Schmidt PM, Bush M, Wildt DE. Toxicity potential of absorbed-retained ethylene oxide residues in culture dishes on embryo development in vitro. *J Anim Sci* 1985;60: 1610-1618.
35. Sirard MA, Coenen K. In vitro maturation and embryo production in cattle. *Methods Mol Biol* 2006;348: 35-42.
36. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004;3: Article3.
37. Smyth GK, Michaud J, Scott HS. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 2005;21: 2067-2075.
38. Tamassia M, Heyman Y, Lavergne Y, Richard C, Gelin V, Renard JP, Chastant-Maillard S. Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development in vitro. *Reproduction* 2003;126: 629-637.
39. Van Soom A, Mahmoudzadeh AR, Christophe A, Ysebaert MT, de Kruif A. Silicone oil used in microdrop culture can affect bovine embryonic development and freezability. *Reprod Domest Anim* 2001;36: 169-176.
40. van Soom A, Ysebaert MT, de Kruif A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophoctoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1997;47: 47-56.
41. Vigneault C, McGraw S, Massicotte L, Sirard MA. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biol Reprod* 2004;70: 1701-1709.
42. Ward F, Rizos D, Corridan D, Quinn K, Boland M, Lonergan P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Mol Reprod Dev* 2001;60: 47-55.
43. Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. *J Reprod Fertil* 1998;112: 387-398.
44. Wrenzycki C, Herrmann D, Keskinetepe L, Martins A, Jr., Sirisathien S, Brackett B, Niemann H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod* 2001;16: 893-901.

Table 1.1 PCR primer sequences and reaction conditions

Gene name	Gene symbol	Primer sequences 5'-3'	Amplicon size (bp)	Annealing / acquisition temp. (°C)	Accession number
DNA (cytosine-5-) -methyltransferase 3 alpha	DNMT3 A	F: AAAAGGAGACTCCCTCAGCAAG R: AAAGCGACTTAGACAGGAGAGC	195	57/82	XM_0026 91463
Insulin-like growth factor binding protein 7	IGFBP7	F: AACAGAACTCTTGCCTGGTGAC R: CTGTCCTTGGGAATTGGATG	154	55/83	NM_0011 02300
Metallothionein 1E	MT1A	F: GGACCCGAACTGCTCCTG R: CCCCTTGCAGACACAGC	155	57/88	NM_0010 40492
UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	UGCG	F: GATCAGGTGGACCAAATTGC R: GTCATGGATTACGGATGAAC	261	54/79	NM_0010 76850
tyrosine 3- monooxygenase/tr yptophan 5- monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	YWHAZ	F: GCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAA R: CTCAGCTTCGTCTCCTTGG	286	55/79	NM_1748 14
Conserved helix- loop-helix ubiquitous kinase	CHUK	F: TGATGGAATCTCTGGAACAGCG R: TGCTTACAGCCCAACAACCTTGC	180	57/81	NM_1740 21

Table 1.2 Efficiency of embryo production systems and gender proportions between the two production sites

Site	n	Efficacy			Gender proportion		
		Day 4 cleavage rate (%)	Day 4 8-cells rate (%)	Day 7 blastocyst rate (%)	n	Male (%)	Female (%)
A	2309	73 ± 7	43 ± 9	20 ± 3*	46	24 (52)	22 (48)
B	1894	N/A	N/A	30 ± 8*	477	245 (52)	222 (48)

Table 1.3 Embryo quality parameters of day 7 expanded blastocysts produced on different production sites

Site	n	Total cell count	Inner cell mass (ICM)	Trophoblast cells (TE)	ICM/TE ratio	ICM %	TUNEL positive cell count	TUNEL positive cells (%)
A	44	111 ± 23	30 ± 9	81 ± 17	1:2.8 ± 0.6	27 ± 5	17 ± 8*	16 ± 9**
B	37	115 ± 25	33 ± 10	82 ± 19	1:2.6 ± 0.8	29 ± 5	11 ± 7*	9 ± 6**

Statistically significant difference: * (p<0.05); ** (p < 0.01).

Supplementary Table 1. List of targets found to be differentially expressed between production sites

Type of feature	Gene name	Gene symbol	Gene ID	Corrected p-value	Fold Change
Reference genes	Metallothionein 1E	MT1A	404071	0.0371	2.1737
	Insulin-like growth factor binding protein 7	IGFBP7	616368	0.0002	2.0890
	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha	DNMT3A	359716	0.0007	0.4479
	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	UGCG	514357	0.0002	0.4417
	ADP-ribosylation factor 5	ARF5	511918	0.0097	0.4013
	Asparagine synthetase	ASNS	514209	0.0014	3.2512
	Activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	ATF4	509107	0.0284	2.2499
	AXL receptor tyrosine kinase	AXL	516598	0.0016	2.9526
	Biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	BLVRB	281650	0.0018	2.4549
	Choline phosphotransferase 1	CHPT1	511291	<0.0001	0.3507
	Carnosine dipeptidase 1 (metallopeptidase M20 family)	CNDP1	614200	0.0141	0.3853
	Cancer/testis antigen family 147, member B1	CT47B1	787180	<0.0001	4.044
	Dystonin	DST	535297	0.0022	2.5459
	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	GEM	538437	0.0003	3.2788
	GIPC PDZ domain containing family, member 2	GIPC2	518246	0,0009	0.2047
	Heme binding protein 2	HEBP2	509223	0.0253	0.4057
	Insulin induced gene 1	INSIG1	511899	0.0160	0.4198
	Similar to nucleosome assembly protein 1-like 1	LOC786285	786285	0.0270	2.6021
	Similar to germ cell-less	LOC786530	788930	0.0067	4.1673
	Lumican	LUM	280847	<0.0001	5.0930
	Myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	MYL6	281341	0.0280	2.2395
	Nidogen 1	NID1	534319	0.0101	0.3927
	Plasminogen activator, tissue	PLAT	281407	0.0472	2.4329
	Polymerase (RNA) I polypeptide D	POLR1D	616972	0.0013	0.3910
	Phosphoserine aminotransferase 1	PSAT1	533044	0.0113	2.5600

	Phosphoserine phosphatase	PSPH	533630	0.0285	2.7032
	Pyrroline-5-carboxylate reductase 1	PYCR1	539606	<0.0001	3.7088
	Scinderin	SCIN	281478	<0.0001	0.3717
	Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1	SLC10A1	532890	<0.0001	0.2456
	Solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	SLC40A1	527023	0.0257	2.2615
	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC	282077	0.0488	2.2615
	Stimulated by retinoic acid gene 6 homolog (mouse)	STRA6	515911	0.0012	4.2298
	Transmembrane protein 20	TMEM20	617598	0.0007	0.3843
	Transmembrane protein 52	TMEM52	617403	0.0170	0.3801
	Vimentin	VIM	280955	0.0009	3.2593
	Chemokine (C motif) ligand 2	XCL2	319096	0.0266	2.8606
3'UTR length	Similar to steroid dehydrogenase homolog	LOC789567	789567	0.0004	0.3914
	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	PLOD2	533642	0.0092	2.4269
	Tropomyosin 2 (beta)	TPM2	497015	0.0047	2.5850
	Solute carrier family 25 (mitochondrial oxodicarboxylate carrier), member 21	SLC25A21	513423	0.0063	0.3674
	Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1	SLC10A1	532890	0.0006	0.2721
	Solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	SLC1A4	326577	<0.0001	4.9894
	Cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	CYP51A1	505060	0.0353	0.4050
	TAO kinase 3	TAOK3	534620	0.0357	0.4368
	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	IFIT5	515091	0.0003	3.2040

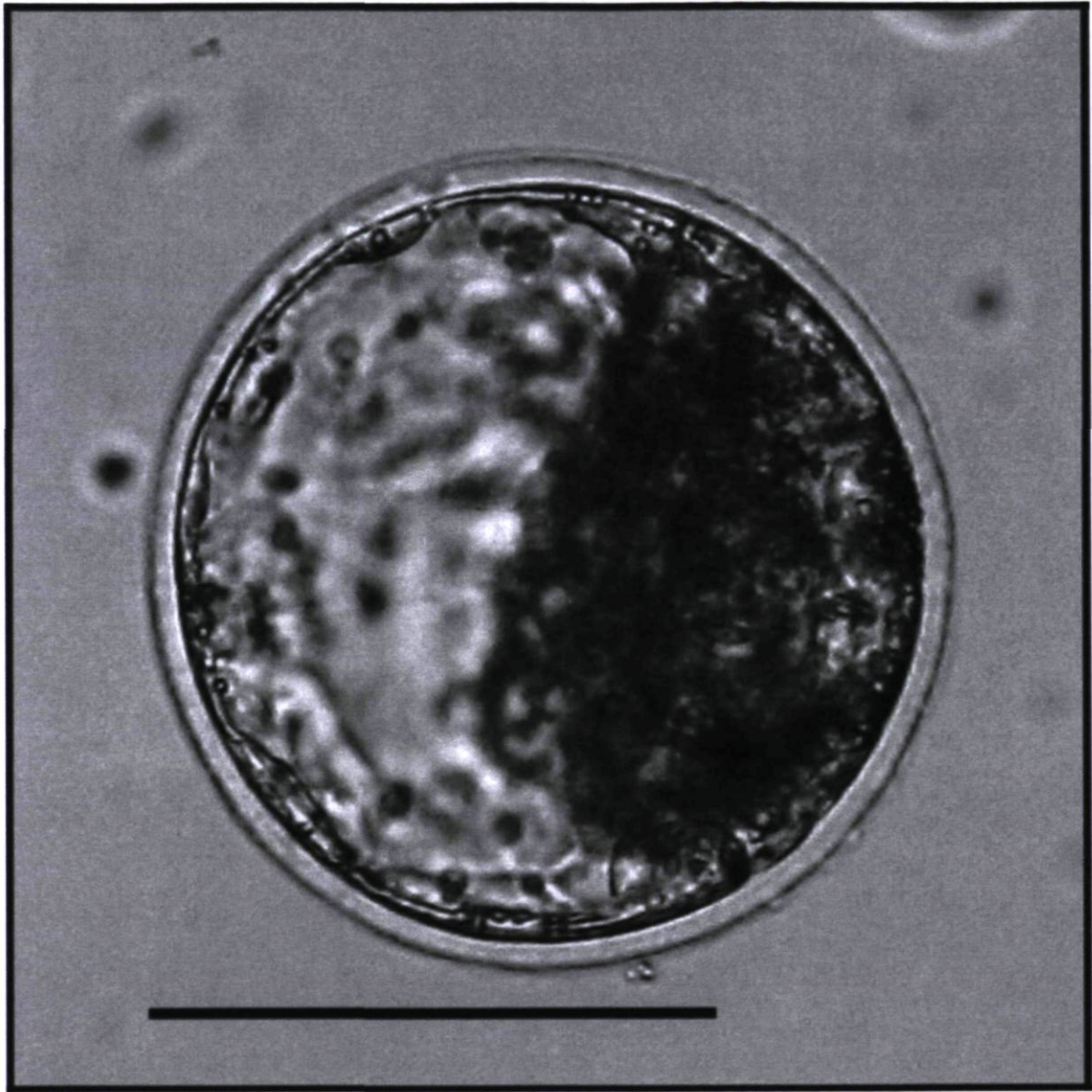


Figure 1.1 Picture of an expanded blastocyst typically collected at each production site. The expanded blastocyst was collected on day 7 post fertilization. Scale bar = 100 μm .

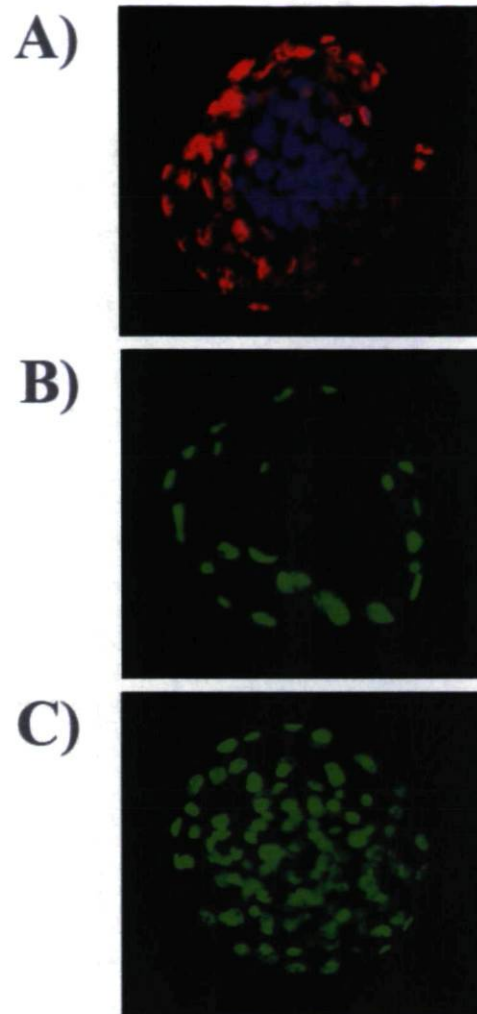
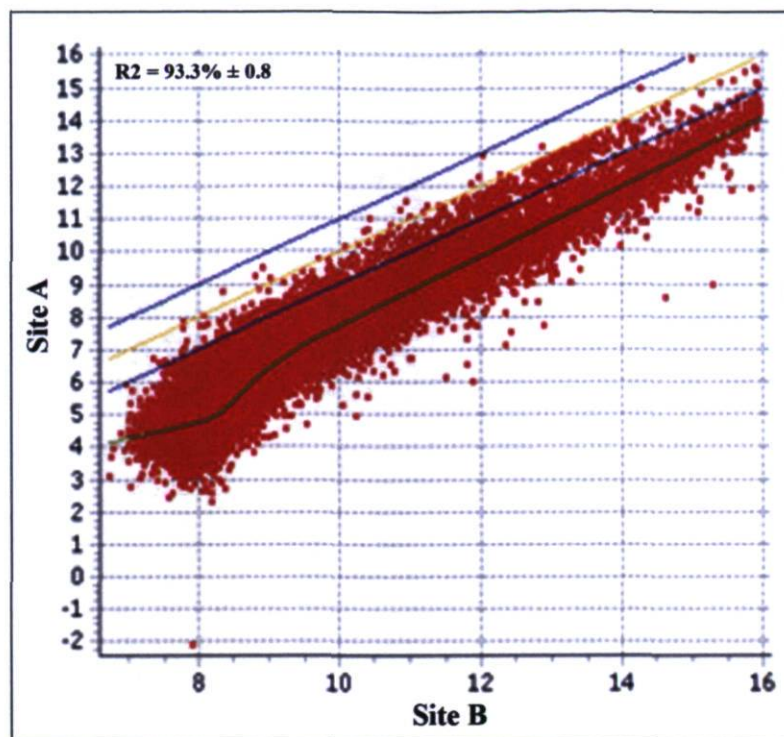


Figure 1.2 Differential cellular staining of day 7 expanded blastocysts.

A) Trophoblast cells in red (PI) and inner cell mass in blue (Hoechst 33342). B) TUNEL positive cells in green. C) Positive control for TUNEL assay.

A



B

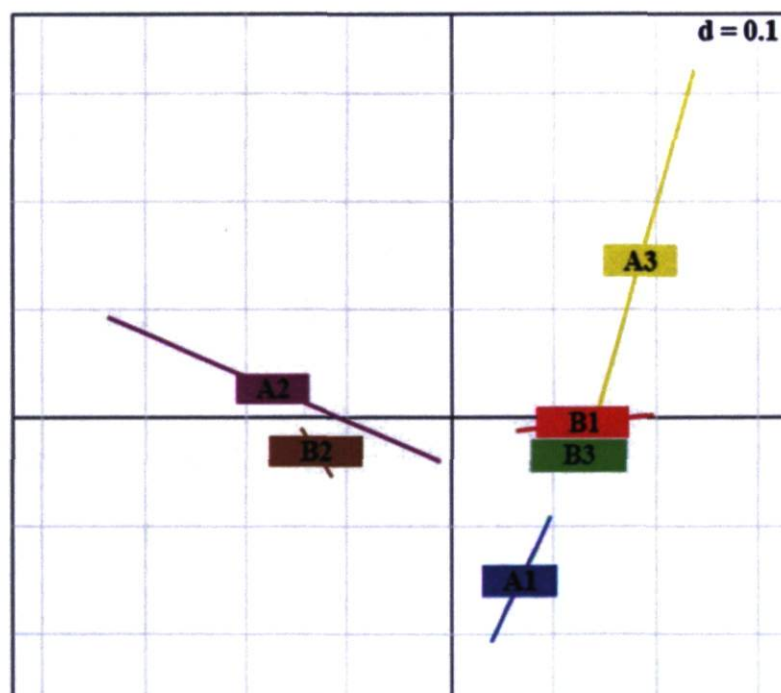


Figure 1.3 Relationship between treatments (production sites).

A) Distribution of net signal intensities between production sites. Correlation value is indicated in the upper left corner B) Between group analysis (BGA) showing the relationship of transcriptome between expanded blastocysts produced in different laboratories. The estimation of biological distance is shown by the distance between each cluster of replicates. Replication associated variance is observed by the length of the vector.

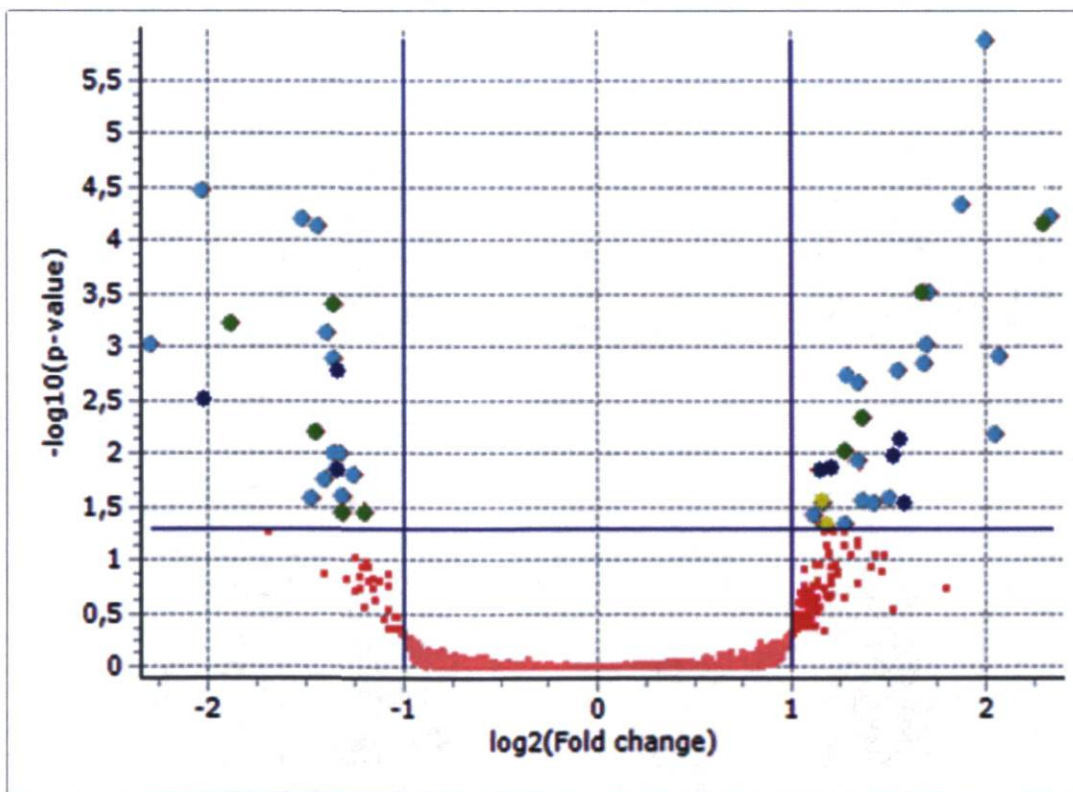


Figure 1.4 Contrasting the two embryo production sites at the gene expression level.

Volcano plot showing the distribution of differentially expressed microarray features. The microarray is composed of features designed to target different classes of transcripts or different splicing events. Protein coding and known pseudogenes (cyan); Alternate

polyadenylation sites (blue), Exon skipping type of splice variants (yellow) and Novel transcribed regions (green).

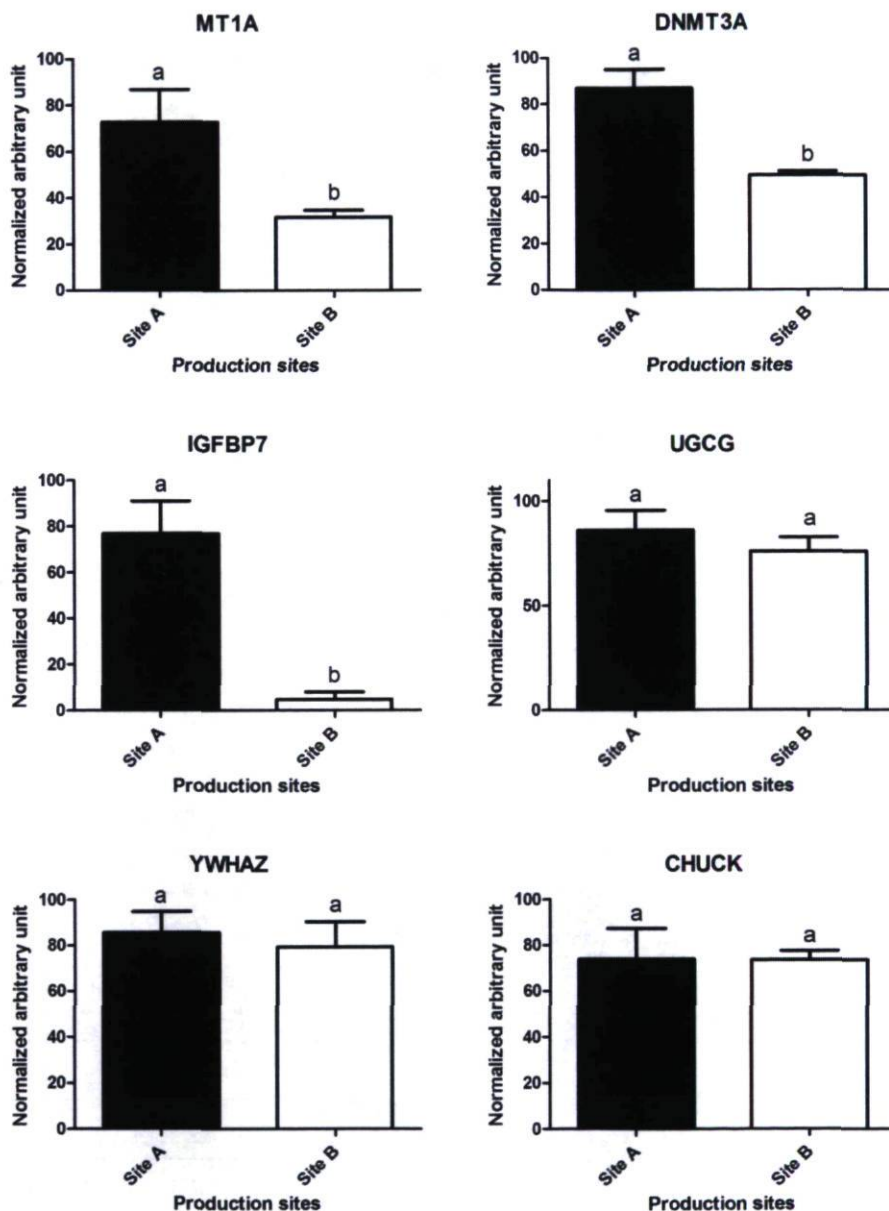


Figure 1.5 Validation of microarray data by quantitative RT-PCR.

The mRNA abundance levels of four gene candidates found to be differentially expressed between production sites by microarray analysis were measured by quantitative RT-PCR.

MT1A = Metallothionein 1E; DNMT3A = DNA (cytosine-5-) –methyltransferase 3 alpha; IGFBP7 = Insulin-like growth factor binding protein 7; UGCG = UDP-glucose ceramide glucosyltransferase. Two housekeeping candidates were also measured to confirm their stability between treatments.

YWHAZ = tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide; CHUK = Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase. Different letters over bars indicate significant difference ($p < 0.05$).

Different embryo production systems impact the embryonic transcriptome

Analyse du transcriptome de l'embryon bovin produit sous différentes conditions

Different embryo production systems impact the embryonic transcriptome

Dany Plourde¹, Christian Vigneault², Patrick Blondin², Claude Robert^{1,3}

¹ Centre de recherche en biologie de la reproduction, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Laboratory of Functional Genomics of Early Embryonic Development, INAF, Pavillon des services, Université Laval (Québec), Canada G1V 0A6.

² L'Alliance Boviteq Inc., 19320 Grand rang St-François, Saint-Hyacinthe, (Québec), Canada J2T 5H1.

Keywords: microarrays, embryo quality, bovine, *in vitro* production, gene expression

³ Corresponding author: C. Robert, Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction
Département des Sciences Animales, Université Laval, Québec, Canada
E-mail: claire.robert@fsaa.ulaval.ca

1. Abstract

Amongst domestic animals, bovine embryo production is one of the best established as it is routinely utilized worldwide for commercial purposes. One of the main considerations of any commercial service provider is to determine the potential impacts of in vitro systems and to what extent do they influence embryonic development. While a wide range of impacts have been reported for in vitro conditions on the blastocyst morphology and gene expression level, the present study focuses on the comparison of different currently employed embryo production procedures and reports embryo production yield parameters, including gestation rates. Global gene expression analyses were performed and the first contrasts were used to determine whether the source of immature oocytes, either aspirated from post-mortem or collected by in vivo ovum pickup, influences gene expression. Secondly, the contrasts evaluated aimed at assessing the impact of in vitro conditions. In complement, in vitro produced blastocysts were also compared to their in vivo counterparts. To control biological variance, all samples were solely composed of expanded blastocysts. These analyses enabled us to determine that oocyte collected in vivo have a higher developmental competence and generate blastocysts that are indistinguishable at the gene expression level from embryos derived from post-mortem aspirated oocytes. Comparison of in vitro culture conditions involved a traditional co-culture system and a semi-defined alternative. Significant gene expression deviations were detected in genes namely involved in lipid metabolism. A large contingent of uncharacterized novel transcripts was also influenced by the in vitro environment. On the practical side, these results provides evidence that the combination of ovum pick-up and a semi-defined in vitro system provides a high yield of blastocysts without the known ill effects of co-culture.

2. Introduction

In any livestock species, directional breeding programs aim to reproduce exceptional animals considered as such because of their high estimated genetic values, which were found to be associated with phenotypic performances within a set population. For all mammalian livestock, genetic improvement has been mainly driven by the sire side through the use of artificial insemination. This situation applies to dairy cows, where genetic dissemination of high merit females is extremely limited comparatively to proven bulls. Historically, the use of assisted reproductive technologies for dairy cows was developed to palliate for the infertility of valuable animals mainly attributed to oviductal obstruction (Bousquet *et al.* 1998, Bousquet *et al.* 1999, Durocher *et al.* 2006). This specific context led to the development of ex-vivo systems that allowed oocyte maturation, fertilization and embryonic culture *in vitro* (Bousquet *et al.* 1999). After 25 years of research and development, the *in vitro* embryo production procedures have become relatively efficient and well established in the bovine (Bousquet *et al.* 1998, Bousquet *et al.* 1999, van Wagtenonk-de Leeuw *et al.* 2000). Nowadays, it is beneficial to increase the number of offspring for the most valuable cows from both the genetic improvement and commercial standpoints. Maximization of the number of descents per cow is achieved through the application of two main assisted reproductive approaches, one of them being used routinely i.e. the standard superovulation procedures followed a week later by artificial insemination and uterine flush to collect the embryos (Bousquet *et al.* 1999, van Wagtenonk-de Leeuw *et al.* 2000). The second approach is the increasingly used transvaginal aspiration of immature oocytes (ovum pick up or OPU) from stimulated ovaries, followed by *in vitro* processing for the production of embryos (Bousquet *et al.* 1998, Bousquet *et al.* 1999, van Wagtenonk-de Leeuw 2006). In both cases, the produced embryos are destined to be transferred into surrogates thus increasing the number of descents per donor cow per year. The *in vitro* approach is generally used in the case of a poor response to the standard superovulation protocol but it also has the potential to be more efficient by allowing repeated collection of immature gametes at a frequency higher than what is possible in the case of embryos collection by uterine flush. The *in vitro* approach has therefore the best potential of maximizing the production of transferrable embryos (Bousquet *et al.* 1998,

Bousquet *et al.* 1999). This potential is however downsized by the known negative impacts of *in vitro* production on developmental potential and the resulting lower quality embryos. Their blastocysts and conception rates are lower, while foetal loss and neonatal abnormalities (such as the abnormal offspring syndrome) tend to be higher compared to their *in vivo* counterparts (McEvoy *et al.* 2000, van Wagtenonk-de Leeuw *et al.* 2000). Moreover, some *in vitro* conditions have been targeted as being responsible for specific phenotypes. As such, culture conditions have been shown to result in a disproportionately higher ratio of males (Pegoraro *et al.* 1998, Hasler 2000a, Hasler 2000b, Gutierrez-Adan *et al.* 2001a, Gutierrez-Adan *et al.* 2001b). The use of serum in *in vitro* protocols is believed to decrease mitochondria number and/or efficiency (Crosier *et al.* 2001), which perturbs lipid metabolism, resulting in an increase in lipid droplets in the cytoplasm (Abe *et al.* 1999a, Abe *et al.* 1999b). The presence of these droplets is associated with the poor successful cryopreservation rates observed with *in vitro* embryos (Rizos *et al.* 2003).

Although afflicted with these problems, bovine *in vitro* embryo production is currently routinely employed worldwide and provides an interesting opportunity of increasing the amount of transferable, thus commercially valuable, embryos per cow.

One of the main considerations for a service provider is to determine which one of the current *in vitro* embryo systems generates the highest number of the best quality and thus transferable embryos. To this end, we compared the gene expression of blastocysts produced under different commercial conditions to, firstly, account for the maternal legacy by contrasting the source of oocytes (transvaginal ovum pickup vs. post-mortem aspiration) and, secondly, assess the impact of *in vitro* production systems. This comparison involved the previously widely employed co-culture system (B2-BRL) that has been in use in commercial settings for more than a decade and its replacement, the semi-defined synthetic oviductal fluid (SOF) based system. *In vivo* collected embryos were used as reference to determine their relationship to *in vitro* systems. Special care was taken to compare blastocysts of similar morphology i.e. expanded blastocysts on day 7 post-insemination/post-fertilization to minimize the variance otherwise induced by

heterogeneous blastocysts cohorts. Through these analyses, we aimed at defining the characteristics that lead to high quality *in vitro* produced blastocysts.

3. Materials and methods

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO) unless specified otherwise.

a. In vitro embryo production

i. Post-mortem oocyte recovery and selection

Dairy bovine ovaries were obtained from a commercial slaughterhouse and transported to the laboratory in saline (0.9% NaCl) containing 1% antimycotic agent. Cumulus-oocyte complexes (COCs) from 2 to 6 mm follicles were collected by aspiration using an 18G 1½ needle attached to a 10 ml syringe. Healthy COCs with at least 5 layers of cumulus were selected for maturation. COCs with fragmented cytoplasm, pyknotic cumulus, pale nuclei and abnormal morphology were automatically rejected.

ii. Oocytes recovery from superovulated animals

To initiate a new follicular wave, on day 8 to 11 post-oestrus, all follicles with a diameter higher than 5 mm were punctured. Administration of FSH (Folltropin-V, Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada) started 36 h after follicular removal. Six injections of 40 mg, twice a day, were administrated for a total of 240 mg of FSH. Forty-eight hours after the last injection of FSH, oocyte pick-up procedure was undertaken under ultrasound examination with an 18G needle and COOK aspiration unit (COOK Medical, Bloomington, IN, USA). Oocytes were immediately transferred to the lab for *in vitro* maturation.

iii. In vitro maturation

The COCs were placed in HEPES buffered Tyrode's media (TLH) solution (supplemented with 10% bovine serum, 5 µl/ml pyruvate 40 mM and 1 µl/ml gentamicin 50 mg/ml) and washed generously twice to ensure the absence of contamination from follicular liquid. Groups of 10 healthy COCs were placed in 50 µl droplets of media under 9 ml of filtered

mineral oil. Maturation media was composed of TCM199 (Gibco 11150-059; Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 10% foetal bovine serum (Sterile Fetal Bovine Serum for Cell Culture, Medicorp, Montréal, QC, Canada), 5 µl/ml pyruvate 40 mM, 1 µl/ml gentamicin 50 mg/ml and 0.1 µg/ml follicle stimulating hormone (FSH) (Gonal-f, Serono Canada Inc., Mississauga, QC, Canada). Droplets containing COCs were incubated for 24 h at 38.5°C with 5% CO₂, 20% O₂ and 100% H₂O.

iv. In vitro fertilization

Matured COCs were washed twice in HEPES buffered Tyrode's media (TLH) solution. Groups of 5 matured COCs were added to 50 µL droplets of media under filtered mineral oil. Each droplet consisted of modified Tyrode lactate media supplemented with 0.6% BSA (Sigma fraction V), 40 mM pyruvate and 50 mg/ml gentamicin. Two µl of PHE (1 mM hypotaurine, 2 mM penicillamine, 250 mM epinephrine) were then added to droplets containing COCs. Spermatozoa used were a cryopreserved pool of ejaculates from five Holstein bulls (Centre d'insémination artificielle du Québec (CIAQ)). The semen was thawed in 37°C water, put on a discontinuous Percoll gradient (2 ml of 45% Percoll over a 2 ml of 90% Percoll) and centrifuged at 700 g for 30 min at room temperature. The supernatant was discarded and spermatozoa pellet were resuspended in *in vitro* fertilization media after spermatozoa concentration was determined with a hemocytometer to obtain a ratio of 10 000 spermatozoa/COCs. Fertilization took place in an incubator for 15 h-18 h at 38.5°C with 5% CO₂, 20% O₂ and 100% H₂O.

v. Standard in vitro culture

For standard culture conditions, embryos were placed in 10 µl droplets of modified synthetic oviduct fluid (mSOF) with amino acids and 0.4% Fatty acid-free BSA (ICP-Bio, Auckland, New Zealand) under filtered mineral oil (#8410, Sigma). The embryo culture dishes were incubated at 38.5°C with 6.5% CO₂, 5% O₂ and 88.5% N₂ in 100% humidity. Embryos were transferred in new 10 µl droplets of mSOF 72 h post-fertilization and once again 120 h post-fertilization in 20 µl droplets of mSOF to prevent toxicity due to ammonia

accumulation and nutrients depletion caused by amino acid degradation and embryo metabolism, respectively.

vi. Co-culture conditions

Following *in vitro* maturation and fertilization, presumptive zygotes were co-cultured in groups of 10 with Buffalo rat liver cells (BRL) in 50 μ l droplets of Menezo's B2 medium (Mediatech Canada Inc., Montreal, QC, Canada) with 0.4% fatty acid-free BSA for 36 h, and then transferred in other droplets containing B2-BRL and 10% estrous cow serum in humid atmosphere containing 5% CO₂ at 38.5°C. Embryos were transferred 96 h post-fertilization to new droplets of B2-BRL with 20% estrous cow serum until day 7.0 of culture.

b. In vivo blastocyst production

On day 8 to 12 post-oestrus, follicles with a diameter higher than 8 mm from Holstein heifers and cows were aspirated. Thirty-six hours later, administration of FSH (Folltropin-V, Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada) started. Overall, 8 injections were given, twice a day, for a total of 400 mg of FSH in decreasing doses starting from 60 mg for the first dose to 20 mg for the last dose. Two doses (500 μ g each) of Prostaglandin F2 α analogue (Estrumate, Intervet, Kirkland, QC, Canada) was administrated with the two last FSH injections to trigger luteolysis. The animals came in heat about 36 h after the last FSH/Estrumate injection and got inseminated twice, 12 and 24 h post heat with the same pooled semen used for IVF. Embryos were recovered by uterine flushing 7.5 days after the first insemination. Expanded embryos of good quality were washed in RNASE-free PBS and frozen at -80°C until RNA extraction.

c. Performance assessment of embryo production systems

For *in vitro* systems, blastocyste rates are calculated on the percentage of cumulus oocyte complexes that reached the stage of blastocyst of good quality on day 7.0 post-fertilization.

For *in vivo* and *in vitro* produced embryos, conception rates are calculated based on pregnancy rates on day 28 following transfer.

d. Microarray description and experimental design

For high throughput RNA abundance measurements, the EmbryoGENE microarray platform was utilized. The microarray printed by Agilent using the SurePrint technology contains 44k 60-mers oligo-probes (Robert et al., 2011). This microarray was specifically designed to account for 3' representation biases that arise because of sample amplification and to detect unique features such as 6,175 splice variants and 9,322 novel transcribed and still uncharacterized regions. The experimental design involved two-color hybridizations with full dye-swap technical replication. For all biological contrast, a simple direct comparison was performed with 4 independent biological replicates (each composed of a pool of 10 blastocysts) per treatment. The microarray dataset is publically available in the GEO Omnibus repository (GEO accession number: in the process of submission).

e. RNA extraction and amplification

RNA extractions were performed using the PicoPure RNA kit (Molecular Devices, Downingtown, Pennsylvania, USA) following the manufacturer's recommendations. Potential genomic DNA contamination was prevented by an on column DNase 1 treatment (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Purified RNA was recovered in 11 μ l. An aliquot of every sample was used to determine RNA integrity by micro-fluidic profiling using a 2100 BioAnalyzer (Agilent, Santa Clara, California, USA). Only samples with a RNA Integrity Number rate of 7.5 and above were further processed through global amplification using the RiboAmpHSPlus kit (Molecular Devices, Downingtown, Pennsylvania, USA) following the manufacturer's recommendations. Following two rounds of amplification, samples were purified with the provided columns and concentration of purified antisense-RNA (aRNA) was determined by UV absorbance using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, Delaware, USA).

f. aRNA labelling and microarrays hybridization

aRNA samples were labelled using the Universal Linkage System (ULS) kit designed for Agilent oligo-arrays (Kreatech Biotechnology, Amsterdam, The Netherlands). Samples were split and fractions were respectively labelled with Cy3 and Cy5. 825 ng of labelled aRNA were used to hybridize the 4x44k microarray. Hybridization occurred in a hybridization oven for 17 h at 65°C. Microarray slides were washed successively in two wash buffers (Agilent Gene Expression Wash Buffer Kit, Agilent, Santa Clara, California, USA) to eliminate environmental contaminants, before being washed in acetonitrile and in a stabilization/drying solution to preserve fluorescence and to help protect from any residues that may remain on slides. Microarrays were then scanned with the PowerScanner (Tecan, Männedorf, Switzerland) and analyzed with Array-Pro Analyzer software (MediaCybernetics, Bethesda, Maryland, USA).

g. Quantitative RT-PCR

Additional pools of 5 blastocysts per sample were collected. Total RNA was extracted using Picopure columns (Molecular Devices, Downingtown, Pennsylvania, USA). Reverse transcription was conducted using the qScript cDNA SuperMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD) with an oligo-dT to prime the reaction according to the manufacturer's recommendations.

Primers for each candidate were designed using the Primer3 Web interface (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Primer sequence, annealing and fluorescence acquisition temperatures, amplicon size and GeneBank accession numbers are shown in Table 2.1. The reaction mixture was composed of the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit components (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) and real-time measurements were conducted in a LightCycler 2.0 apparatus (Roche Diagnostics). Our real-time PCR amplification procedure has been described in detail previously (Gilbert *et al.* 2010). The nature of the amplified products was confirmed using the melting curve profile and DNA sequencing.

h. Statistical analyses

Microarray data were pre-processed as follows: Background correction was performed by simple subtraction of locally measured background noise for every spot. The dataset was preprocessed by performing an intra-array normalization using Loess (Dobbin *et al.* 2005) and an inter-array normalization using Quantile (Bengtsson & Hossjer 2006). Detection of statistical significant variations was performed using Limma (Bioconductor) (Smyth 2004, Smyth *et al.* 2005). Control of false discovery was performed by multiple testing corrections using the Benjamini-Hochberg algorithm (Hochberg & Benjamini 1990). Differences in RNA abundance was considered significant when both cut-off threshold were met: adjusted p-value <0.01 and fold change of 1.5. The inter-treatment comparisons were conducted through a Between Group Analysis based on Eigen values (Culhane *et al.* 2002, Culhane *et al.* 2003) and hierarchical clustering was done using the NIA Array Analysis software (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/>) (Sharov *et al.* 2005).

Pathway analyses and downstream exploitation of gene lists were conducted using Ingenuity Pathway Analysis Software Version 8.6 (Ingenuity Systems inc., Redwood City, CA). For biological functions and canonical pathways, significance and threshold values were calculated using Fisher's Exact Test ($P < 0.05$). For Figures 2.4 and 2.5, only biological functions that included at least eight candidates were selected.

For qRT-PCR data, normalization was performed using an exogenous spike as reported previously (Vigneault *et al.* 2004). A synthetic transcript was produced *in vitro* using a template coding for the Green Fluorescent Protein (GFP) bearing a poly(A) stretch of 18 adenosine on its 3' end. The poly(A) tail was further elongated using an *in vitro* polyadenylation kit (Ambion). For all samples, quality of the extracted RNA was assessed by micro-electrophoresis using a 2100 BioAnalyzer (Agilent). For all candidates, real-time PCR quantification data was normalized using the GFP quantification to account for any sample loss during sample handling procedures. Testing of statistical significance of observed differences was done using Prism software Version 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). One-way ANOVA was done with the Newman-Keuls multiple comparisons test.

4. Results

a. Production system efficiency

The three *in vitro* production systems tested involved two different production protocols i.e. co-culture and SOF, the first being one of the standard procedures that has been commercially employed worldwide over the past two decades, while the SOF based system represents the more recently introduced alternative. Additionally, two oocyte sources, namely oocytes aspirated from post-mortem ovaries or collected *in vivo* by transvaginal aspiration of stimulated ovaries, were considered to address the impact of oocyte origin. When embryonic production was conducted using oocyte collected from post-mortem ovaries, the blastocyst yield, calculated on the proportion of blastocysts on day 7.0 post fertilization per oocyte put in maturation, were identical no matter which production protocol was used (Table 2.2). However, the blastocyst yield increased substantially when the immature oocytes were collected *in vivo* (OPU-SOF) thus corroborating previous observations that the source of immature oocytes is directly associated with developmental competence (Table 2.2).

Following transfers, the conception rates of *in vitro* produced blastocysts were similar between all production systems and only slightly lower than the one obtained from embryos collected *in vivo* by uterine flush (Table 2.2). The gender ratio, expected to be in the vicinity of 50/50, was significantly shifted in favour of males in the case of blastocysts produced in co-culture conditions (Table 2.2). This skew was not observed when embryo production was conducted in SOF based media for which the sex ratios matched their *in vivo* counterparts (Table 2.2). These performance parameters clearly point out to OPU-SOF as being the most efficient system leading to an increase proportion of transferable embryos based their ability to induce gestation and normal sex ratios.

b. Transcriptome profiles of different production systems

Gene expression was surveyed using microarrays. For comparative purposes, a defined developmental stage was compared for all treatments. Survey of gene expression was therefore conducted on expanded blastocysts defined as embryos >120 μm in diameter

bearing a cavity accounting for half of the embryonic volume in addition to a thinned zona pellucida (Figure 2.1 (Grade 7 embryos)). These embryos were collected on day 7.5 post insemination for *in vivo* or day 7.0 post-fertilization for *in vitro* counterparts.

Clustering analyses of the gene expression dataset comparing the four types of blastocysts were done using two mathematical calculations. The analysis using Eigen vectors show that intra-group variances calculated between biological replicates are similar across all treatments as indicated by the diameters of the treatment groupings (Figure 2.2 A). The *in vitro* produced embryos clustered away from the *in vivo* and overlap between groupings is indicative of overall close similarity between treatments. The hierarchical clustering based on Euclidean distance provided similar observations as the distance before branching is similar and small for all treatments. Given these close similarities in biological distance, the embryos derived from immature oocytes collected from post-mortem ovaries and processed through the SOF system cluster apart from the other two treatments and closer to the *in vivo* collected blastocysts (Figure 2.2 B). Overall, both of these analyses indicate all *in vitro* groups are very close at the gene expression level.

c. Impact of the in vitro embryo production system on gene expression

Comparisons of gene expression at the blastocyst stage were conducted by simple contrasts to isolate individual factor.

i. Influence of the oocyte source on blastocyst gene expression

The effect of the oocyte source on the embryonic gene expression following 7.0 days of culture was determined by comparing the OPU (*in vivo* collected oocytes) and SOF (oocytes collected from post-mortem ovaries) treatments. In both cases, note that the *in vitro* production procedures were identical.

As observed from the global analyses, the gene expression of these blastocysts was extremely similar as most genes were not differentially expressed. More precisely, the origin of the oocytes impacted the expression of only 5 reference protein coding genes

(ATP6V1B2, SLC1A4, TPRG1, UBL5, ZNF79) and 2 known pseudogenes (LOC616942, LOC534495) in the resulting expanded blastocysts. The microarray also contains features to detect two types of transcript isoforms: 1) splice variants of the Insertion/Deletion (Indel) type and 2) splice variant involving differential 3'UTR length due to the presence of alternate polyadenylation signals. Only 3 Indel type splice variant microarray features have been shown to be differentially impacted by the oocyte source, all of them targeting the UBL5 transcript. Two of these features target a single region where one of the transcripts would be 33 bases shorter than the other. This suggests that the UBL5 gene produces different transcript isoforms that are all overexpressed in blastocysts derived from oocytes collected *in vivo* (OPU) (black spots in Figure 2.3 A). Only 2 microarray features designed to detect potential 3'UTR variants were found to be differentially expressed. However, they are not indicative of the use of alternate polyadenylation signals as the other associated probes are not expressed. Overall this indicates that both types of blastocyst are extremely close at the gene expression level.

In addition to reference genes and splice variant detection, the microarray also contains features to detect the expression of a large contingent of uncharacterized transcripts (novel transcribed region (NTR)). None of the 9,322 microarray features targeting NTR were impacted by the oocyte source (Figure 2.3 A).

ii. Influence of in vitro conditions

Assessment of the impact of *in vitro* production procedures was achieved by comparing blastocysts produced using the co-culture system (BRL) and those produced using the semi-defined culture conditions (SOF). In both treatments, all immature oocytes were collected from post mortem ovaries. Thirty seven protein coding and 7 known pseudogenes were found to be differentially expressed between these IVP systems. Only 3 Indel splicing features were found to be differentially expressed. two of them targeting the gene farnesyl diphosphate synthase (FDPS) which constitutive microarray feature was also detected. Eleven additional gene transcripts were detected by features designed to potentially detect alternate 3'UTRs (Figure 2.3 B). Again, none of them displayed an expression profile of

associated feature indicative of the *in vitro* conditions influencing 3'UTR transcript length. The *in vitro* microenvironment also influenced the expression of 64 NTRs (Figure 2.3 B).

Further analysis of the differentially expressed known genes indicated that four cellular aspects were particularly affected by culture conditions (Figure 2.4 A). Amongst them is lipid metabolism which gene network is presented in Figure 2.4 B with emphasis on the genes that have been affected by the *in vitro* conditions. Nearly all genes are overexpressed in the co-culture conditions (Figure 2.4 B).

iii. Comparison of *in vitro* embryos to their *in vivo* counterparts

For all *in vitro* treatments (SOF, OPU and BRL) the same microarray samples were rehybridized and contrasted to *in vivo* collected embryos used as reference. The resulting gene lists were then compared to highlight cellular processes that were commonly or specifically affected (Figure 2.5). The cell death pathway seems to be over activated in all *in vitro* conditions when compared to *in vivo*. In contrast, genes involved in cell growth and proliferation are also more expressed *in vitro*. This increased cellular activity for both anabolic and catabolic processes is also perceptible for protein metabolism as both synthesis and decay are more stimulated *in vitro* than *in vivo* (Figure 2.5). Other aspects could be indicative of stimulated cellular defense mechanisms as genes pertaining to the NRF2-mediated oxidative stress response, as well as the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) pathways, are differentially expressed (Figure 2.5). Genes related to energy metabolism are differentially expressed in all *in vitro* treatments comparatively to *in vivo*. Blastocysts produced from immature oocytes aspirated from small follicles on post-mortem ovaries seem to carry a mitochondrial dysfunction that is not observed when oocytes are collected *in vivo* from larger follicles (Figure 2.5). Overall, these observations indicate that *in vitro* produced blastocysts are metabolically overactive, which can translate into increased cellular stress.

Since the AhR pathway is involved in very different aspects of cellular and tissue functions (organogenesis, stress response and toxin metabolism), candidates were selected in the known metabolic cascade that participates in xenobiotic metabolism to investigate whether

this difference with *in vivo* could arise from the presence of plastic residues. The transcript abundance quantification of candidates showed marginal differences between *in vitro* and *in vivo* blastocysts (Figure 2.6) which does not offer a clear evidence that *in vitro* conditions indeed activate AhR as a response against compounds, such as polycyclic hydrocarbons residues.

iv. The presence of uncharacterized transcripts

When contrasting *in vitro* systems, 64 NTR were found to be differentially expressed (Figure 2.3 B). However, when contrasting *in vitro* and *in vivo* blastocysts, a much larger contingent of NTR was found to be differentially expressed (respectively 304, 461 and 871 for SOF, OPU and BRL). These differentially expressed uncharacterized transcripts were both over- and under-expressed comparatively to the *in vivo* reference (Figure 2.7). The co-culture conditions presented the highest amount of differentially expressed NTR of which 178 showed common differential expressions across treatments (Figure 2.8 A).

5. Discussion

Many publications have focussed on the description of blastocysts produced under different conditions to provide an overview of the nature of the young embryo. These studies have mainly proceeded by comparing their morphology, composition (Crosier *et al.* 2001), or gene expression levels (Knijn *et al.* 2002, Lonergan *et al.* 2003, Knijn *et al.* 2005, McHughes *et al.* 2009). These studies did not necessarily aim at providing information to identify the best suited *in vitro* production system to be used in commercial settings. In fact, measuring the success rate of an *in vitro* production system has been traditionally achieved by compiling blastocyst rates determined using the number of embryos that present a cavity (blastocoels) during a predetermined interval post-fertilization. Very few studies have further detailed these observations by accounting for the different types/grades of blastocysts. Although informative, the blastocyst rate is a limited parameter that can confound two different concepts i.e. developmental competence and embryonic quality. Both of these concepts are closely related but may involve different factors. The concept of

developmental competence is still vague (Duranthon & Renard 2001) since the underlying mechanisms have yet to be elucidated. In its most restrictive form, it is generally perceived as an intrinsic potential to undergo development that is highly dependent of still uncharacterized factors that are accumulated or effective during oocyte maturation (Blondin *et al.* 1997, Sirard 2001, Rizos *et al.* 2005). The extent and duration of this maternal contribution still remains to be elucidated. The second concept, embryonic quality, rather involves the influence of the surrounding micro-environment to properly support development and produce a healthy embryo that is able to cope with stresses and most importantly is able to lead to a gestation. To decipher both concepts, it is noteworthy to mention that developmental competence can lead to a higher number of blastocysts that may be of poor quality. Such a situation could arise if, for instance, *in vitro* conditions promote survival of weak or ill fated embryos. In such a situation, the use of a lower yield embryonic system could be favourable to weed out the developmentally compromised ones. Consequently, comparative analysis of blastocysts across production systems often involves comparing very distinct cohorts. It is difficult to determine which condition is optimal when comparing blastocysts pools of mixed populations or pools of embryos of fixed morphology. The first may portray the overall or mean impact of an embryo production system with lower precision due to increased variance between replicates while the second could be more precise but also only represent a subpopulation of embryos.

In the eyes of a commercial service provider, blastocyst morphology is of importance as it is the prime aspect used to decide which embryos will be selected for transfer, cryopreserved or simply discarded. Generally, early and expanded blastocysts are preferred to hatching or hatched embryos. Given this practical perspective and to maximize the precision of the analysis, all samples in the study were solely composed of expanded blastocysts (grade 7).

Another aspect that differs between the research and the commercial context is the source of immature oocytes. Most often, research embryo production is derived from oocytes collected from post-mortem collected ovaries. These oocytes are collected from unstimulated ovaries and aspirated from 3-5 mm follicles whereas commercial service

providers use ultrasound guided OPU, which is done on live animals that have undergone ovarian stimulation and oocytes are generally collected from larger follicles (7-10 mm). Therefore, the two oocyte sources were contrasted to determine their impact. As others have also shown, the source of immature oocytes has a profound impact and OPU leads to a significant increase in blastocyst yield (Sirard *et al.* 1999, Blondin *et al.* 2002). This increase in developmental competence could be attributed to the follicular group-size difference. It is known that developmental competence increases with follicular size as the relationship between follicular size and blastocyst rate have previously been reported to be: 0% for <2 mm; 20-35% for 3-5 mm; >55% for > 8 mm (Pavlok *et al.* 1992, Lonergan *et al.* 1994, Hendriksen *et al.* 2000). Additionally, ovarian stimulation enables the collection of oocytes from a specific follicular status whereas in the case of oocytes collected from abattoir ovaries, the timing of oestrus cycle is unknown. Morphologically and at the gene expression level, our result indicate that expanded blastocysts originating from immature oocytes either collected from abattoir ovaries or by OPU are undistinguishable. However, it is noteworthy to mention that on day 7.0, we observed that the OPU derived cohorts displayed faster developmental kinetics (about 0.5X) than abattoir derived embryos (unpublished). This increased kinetics can be attributed to better quality oocytes which translate into higher developmental potential. Interestingly, the comparison of *in vivo* and *in vitro* embryos highlighted that OPU derived embryos do not exhibit deviant gene expression in terms of mitochondrial dysfunction as opposed to embryos derived from oocytes collected from post-mortem ovaries. This could indicate that the increased oocyte preparation state may be linked to cytoplasmic events that involve mitochondria. This corroborates previous reports that linked developmental competence to mitochondrial activity (Van Blerkom , Van Blerkom 2008, Van Blerkom 2009).

The impact of the culture system was observed at the gene expression level when blastocysts produced on the well known and formerly widely used B2-BRL system (Hasler 2000a, Hasler 2000b) were compared to blastocysts cultured in the now widely employed semi-defined SOF system (Holm *et al.* 1999). The extent of gene expression deviation was not as important as previously described (Côté *et al.*, 2011). We believe the use of blastocysts of a specific morphology rather than mixed pools is responsible for the lower

variance between pools and between treatments. From the list of genes that were found to be differentially expressed, the top biological function influenced was found to be lipid metabolism. This corroborates the previous observation that co-culture conditions lead to embryos bearing a higher lipid content that translates in lower cryotolerance (Crosier *et al.* 2001, Rizos *et al.* 2003). In addition to these unfavourable phenotypes, co-culture conditions are also known to induce a bias in the sex ratio (Gutierrez-Adan *et al.* 2001a, Gutierrez-Adan *et al.* 2001b). The gender skew was not observed when blastocysts were produced in the SOF system.

The most divergent gene expressions were found when comparing these *in vitro* derived blastocysts to their *in vivo* counterparts. It is growing in acceptance that *in vivo* blastocysts are less metabolically active than *in vitro* embryos (Côté *et al.*, 2011) (Leese 2002, Leese *et al.* 2007, Leese *et al.* 2008). Amongst the biological processes that were affected by the *in vitro* conditions numerous basic cell maintenance functions (protein synthesis and degradation) were found in addition to cellular defence pathways (NRF2-mediated oxidative stress response and Aryl Hydrocarbon Receptor pathway). We further investigated the AhR pathway as it is known to be involved in very distinct biological processes from organogenesis (Yim *et al.* 2006) to steroid hormone receptor management and xenobiotic bioprocessing (Abel & Haarmann-Stemann). Its role in managing the toxic effect of environmental pollutants was of interest to determine if the pathway was activated comparatively to *in vivo* due to the presence of plastic residues. The selected candidates were HSP90A1, involved in sequestering the ARH protein, which will be liberated once a ligand is bound (Abel & Haarmann-Stemann) and DNAJB9 (alias ERdj4), another chaperone expressed in stressed cells as a mean to protect against apoptosis (Kurusu *et al.* 2003, Qiu *et al.* 2006). The proteins CYP1A1 and CYP1B1 are well known members of the cytochrome P450 family that are involved in drug and steroid metabolism (Nannelli *et al.* 2009). The RNA abundance measurements for these candidates between *in vitro* and *in vivo* embryos do not provide strong support of the activation of this pathway to cope with plastic residues. The AhR pathway is therefore most likely to be involved in other aspects of blastocyst metabolism.

Aside from protein coding transcripts, the microarray platform contains features that target a large contingent of novel uncharacterized transcripts (Robert et al., 2011). Although the function of these long non-coding transcripts is still unknown, our results show that culture conditions deeply influence their expression. The co-culture condition showed the most divergent expression of these novel transcribed elements. Further investigation is required to determine whether these major abundance differences can be attributed to an epigenomic process that could lead to the specific or unspecific transcription of heterochromatin. The presence of these novel transcribed regions has been previously reported (Côté et al., 2011) (Bui *et al.* 2009).

6. Conclusion

Commercial service providers face the difficult task of selecting the most efficient *in vitro* system that will lead to the production of a high number of high quality embryos. While many studies have reported divergent gene expression between production systems and/or *in vivo* derived embryos, the commercial context differs from research in terms of oocyte source and in the targeted class of blastocysts. We addressed these aspects and shown that the source of immature oocytes impacts developmental competence but not blastocyst gene expression and that *in vitro* derived embryos exhibit significant differences in gene expression both for coding and non-coding RNAs comparatively to their *in vivo* counterparts. Overall, the combination of OPU and the semi-defined SOF system is proving to be efficient by reducing the known ill effects from which blastocysts from co-culture conditions suffer.

FUNDING

This work received support from the EmbryoGENE Network supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant number NETGP340825-06). Additional support was provided by the Ministère du développement économique, innovation et exportation of the province of Québec from a grant obtained within the Programme de soutien à la recherche (grant number PSR-SIIRI-238).

DECLARATION OF INTEREST

There is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Julie Nieminen (Université Laval, Canada) for critical review of the manuscript and language correction and also Dominic Gagné for his support for microarray hybridization and quantitative RT-PCR measurements.

7. References

- Abe H, Otoi T, Tachikawa S, Yamashita S, Satoh T & Hoshi H** 1999a Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. *Anat Embryol (Berl)* **199** 519-527.
- Abe H, Yamashita S, Itoh T, Satoh T & Hoshi H** 1999b Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol Reprod Dev* **53** 325-335.
- Abel J & Haarmann-Stemmann T** An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol Chem* **391** 1235-1248.
- Bengtsson H & Hossjer O** 2006 Methodological study of affine transformations of gene expression data with proposed robust non-parametric multi-dimensional normalization method. *BMC Bioinformatics* **7** 100.
- Bisinotto RS, Ribeiro ES, Martins LT, Marsola RS, Greco LF, Favoreto MG, Risco CA, Thatcher WW & Santos JE** Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. *J Dairy Sci* **93** 5798-5808.
- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F & Sirard MA** 2002 Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* **66** 38-43.
- Blondin P, Coenen K, Guilbault LA & Sirard MA** 1997 In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* **47** 1061-1075.
- Bousquet D, Burnside EB & Van Doormaal BJ** 1998 Biotechnologies of reproduction applied to dairy cattle production: Embryo transfer and IVF. *Can. J. Anim. Sci.* **83** 403-407.
- Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G & Durocher J** 1999 In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* **51** 59-70.
- Bui LC, Evsikov AV, Khan DR, Archilla C, Peynot N, Henaut A, Le Bourhis D, Vignon X, Renard JP & Duranthon V** 2009 Retrotransposon expression as a defining event of genome reprogramming in fertilized and cloned bovine embryos. *Reproduction* **138** 289-299.
- Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE & Farin CE** 2001 Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod* **64** 1375-1385.
- Culhane AC, Perriere G, Considine EC, Cotter TG & Higgins DG** 2002 Between-group analysis of microarray data. *Bioinformatics* **18** 1600-1608.
- Culhane AC, Perriere G & Higgins DG** 2003 Cross-platform comparison and visualisation of gene expression data using co-inertia analysis. *BMC Bioinformatics* **4** 59.
- Dobbin KK, Kawasaki ES, Petersen DW & Simon RM** 2005 Characterizing dye bias in microarray experiments. *Bioinformatics* **21** 2430-2437.

- Duranthon V & Renard JP** 2001 The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* **55** 1277-1289.
- Durocher J, Morin N & Blondin P** 2006 Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology* **65** 102-115.
- Gilbert I, Scantland S, Sylvestre EL, Dufort I, Sirard MA & Robert C** 2010 Providing a stable methodological basis for comparing transcript abundance of developing embryos using microarrays. *Mol Hum Reprod* **16** 601-616.
- Gutierrez-Adan A, Granados J, Pintado B & De La Fuente J** 2001a Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured in vitro. *Reprod Fertil Dev* **13** 361-365.
- Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D, Ward FA, Boland MP, Pintado B & de la Fuente J** 2001b Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* **55** 1117-1126.
- Hasler JF** 2000a In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Hum Reprod* **15 Suppl 5** 47-58.
- Hasler JF** 2000b In vitro culture of bovine embryos in Menezo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Anim Reprod Sci* **60-61** 81-91.
- Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM & Dieleman SJ** 2000 Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* **53** 11-20.
- Hochberg Y & Benjamini Y** 1990 More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* **9** 811-818.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T & Callesen H** 1999 High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* **52** 683-700.
- Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJ, Vos PL, Herrmann D, van der Weijden GC, Niemann H & Dieleman SJ** 2002 Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. *Reproduction* **124** 365-375.
- Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJ, Vos PL, Zeinstra EC, van der Weijden GC, Niemann H & Dieleman SJ** 2005 In vitro and in vivo culture effects on mRNA expression of genes involved in metabolism and apoptosis in bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* **17** 775-784.
- Kurusu J, Honma A, Miyajima H, Kondo S, Okumura M & Imaizumi K** 2003 MDG1/ERdj4, an ER-resident DnaJ family member, suppresses cell death induced by ER stress. *Genes Cells* **8** 189-202.
- Leese HJ** 2002 Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays* **24** 845-849.
- Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG & Sturmey RG** 2008 Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod* **14** 667-672.
- Leese HJ, Sturmey RG, Baumann CG & McEvoy TG** 2007 Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. *Hum Reprod* **22** 3047-3050.

- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP & Gordon I** 1994 Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev* **37** 48-53.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T & Boland MP** 2003 Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies. *Reprod Biomed Online* **7** 657-663.
- McEvoy TG, Sinclair KD, Young LE, Wilmut I & Robinson JJ** 2000 Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture in vitro: relevance to blastocyst culture in human ART. *Hum Fertil (Camb)* **3** 238-246.
- McHughes CE, Springer GK, Spate LD, Li R, Woods R, Green MP, Korte SW, Murphy CN, Green JA & Prather RS** 2009 Identification and quantification of differentially represented transcripts in in vitro and in vivo derived preimplantation bovine embryos. *Mol Reprod Dev* **76** 48-60.
- Nannelli A, Rossignolo F, Tolando R, Rossato P, Longo V & Gervasi PG** 2009 Effect of beta-naphthoflavone on AhR-regulated genes (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2S1, Nrf2, and GST) and antioxidant enzymes in various brain regions of pig. *Toxicology* **265** 69-79.
- Pavlok A, Lucas-Hahn A & Niemann H** 1992 Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev* **31** 63-67.
- Pegoraro LM, Thuard JM, Delalleau N, Guerin B, Deschamps JC, Marquant Le Guienne B & Humblot P** 1998 Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or with Vero cells. *Theriogenology* **49** 1579-1590.
- Qiu XB, Shao YM, Miao S & Wang L** 2006 The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci* **63** 2560-2570.
- Rivera F, Narciso C, Oliveira R, Cerri RL, Correa-Calderon A, Chebel RC & Santos JE** Effect of bovine somatotropin (500 mg) administered at ten-day intervals on ovulatory responses, expression of estrus, and fertility in dairy cows. *J Dairy Sci* **93** 1500-1510.
- Rizos D, Burke L, Duffy P, Wade M, Mee JF, O'Farrell KJ, Macsiurtain M, Boland MP & Lonergan P** 2005 Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro. *Theriogenology* **63** 939-949.
- Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP & Lonergan P** 2003 Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod* **68** 236-243.
- Sharov AA, Dudekula DB & Ko MS** 2005 A web-based tool for principal component and significance analysis of microarray data. *Bioinformatics* **21** 2548-2549.
- Sirard MA** 2001 Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* **55** 1241-1254.
- Sirard MA, Picard L, Dery M, Coenen K & Blondin P** 1999 The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. *Theriogenology* **51** 699-708.
- Smyth GK** 2004 Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3** Article3.

- Smyth GK, Michaud J & Scott HS** 2005 Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* **21** 2067-2075.
- Stevenson JS, Pursley JR, Garverick HA, Fricke PM, Kesler DJ, Ottobre JS & Wiltbank MC** 2006 Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *J Dairy Sci* **89** 2567-2578.
- Van Blerkom J** Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*.
- Van Blerkom J** 2008 Mitochondria as regulatory forces in oocytes, preimplantation embryos and stem cells. *Reprod Biomed Online* **16** 553-569.
- Van Blerkom J** 2009 Mitochondria in early mammalian development. *Semin Cell Dev Biol* **20** 354-364.
- van Wagtenonk-de Leeuw AM** 2006 Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* **65** 914-925.
- van Wagtenonk-de Leeuw AM, Mullaart E, de Roos AP, Merton JS, den Daas JH, Kemp B & de Ruigh L** 2000 Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* **53** 575-597.
- Vigneault C, McGraw S, Massicotte L & Sirard MA** 2004 Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. *Biol Reprod* **70** 1701-1709.
- Yim SH, Shah Y, Tomita S, Morris HD, Gavrilova O, Lambert G, Ward JM & Gonzalez FJ** 2006 Disruption of the Arnt gene in endothelial cells causes hepatic vascular defects and partial embryonic lethality in mice. *Hepatology* **44** 550-560.

Table 2.1 PCR primer sequences and reaction conditions

Gene name	Gene symbol	Primer sequences 5'-3'	Amplicon size (bp)	Annealing / acquisition temp. (°C)	Accession number
histone deacetylase 8	HDAC8	F: TTTAGGCAAGTTGGGGAAGG R: ATGATCCTGAGGCCTAAACC	136	55/81	MGC142318
heat shock 90kDa protein 1, beta	HSP90AB1	F: CTGCTGTTCTGATGAGATTCC R: CATGTCAAACGTGGAGAGAGA	246	55/83	BOS_21524
Cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	CYP51A1	F: CTCCAAGTACAAAACCCAGTG R: TGTTTGCTATGGACAGTGCTTC	229	55/82	XM_581287
cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	CYP1B1	F: GTTAACCAGTGGTCCGTGAATC R: GAGCAAGGATGGAGATGAAGAG	202	55/82	BOS_11566
cytochrome P450, subfamily 1, polypeptide 1	CYP1A1	F: GTGGTCTCCCTGCTTTAACAAG R: GGAGATGCAGTAGAAGGTAACCTCG	253	55/85	BOS_20271
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	DNAJB9	F: ACCACAGAACCATGCAGAAG R: ACTAAGACCTAGAGGGCCAACAAC	209	57/76	BOS_4266
Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	CHUK	F: TGATGGAATCTCTGGAACAGCG R: TGCTTACAGCCCAACAACCTGC	180	57/81	NM_174021
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	F: CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA R: GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG	217	58/84	BOS_5957
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	YWHAZ	F: GCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAA R: CTCAGCTTCGTCTCCTTGG	286	55/79	NM_174814

Table 2.2 Efficacy of different embryo production systems

System	n COCs in IVM	Day 7 blast. rate (%)	n transferred embryos	Conception rate (%)	n sexed blast.	Sex ratio (M/F)
<i>In vivo</i>	N/A	N/A	887	60	923	51/49
BRL	826	29 ± 6	391	54	802	60/40
SOF	1894	30 ± 8	N/A	N/A	46	52/48
OPU-SOF	1177	55 ± 26	373	57	477	52/48

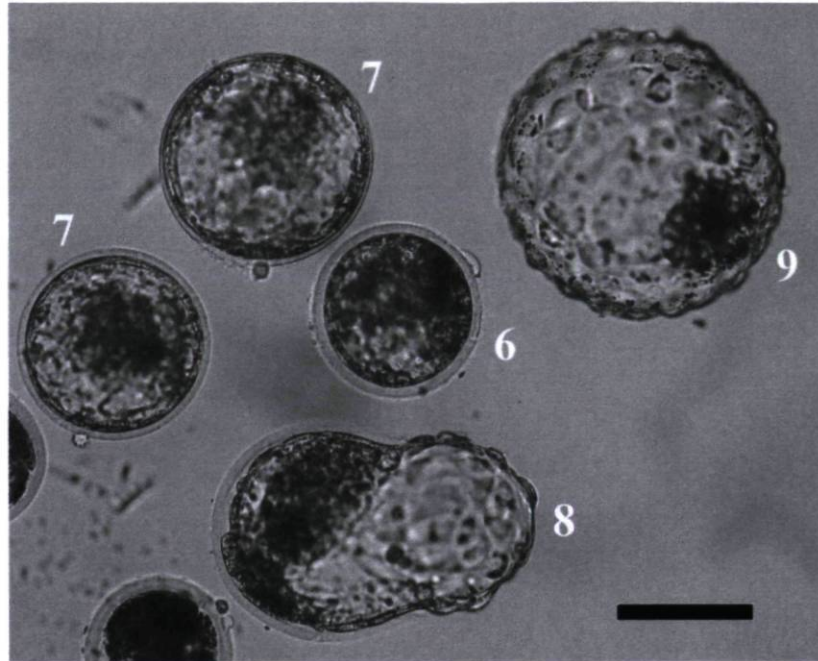
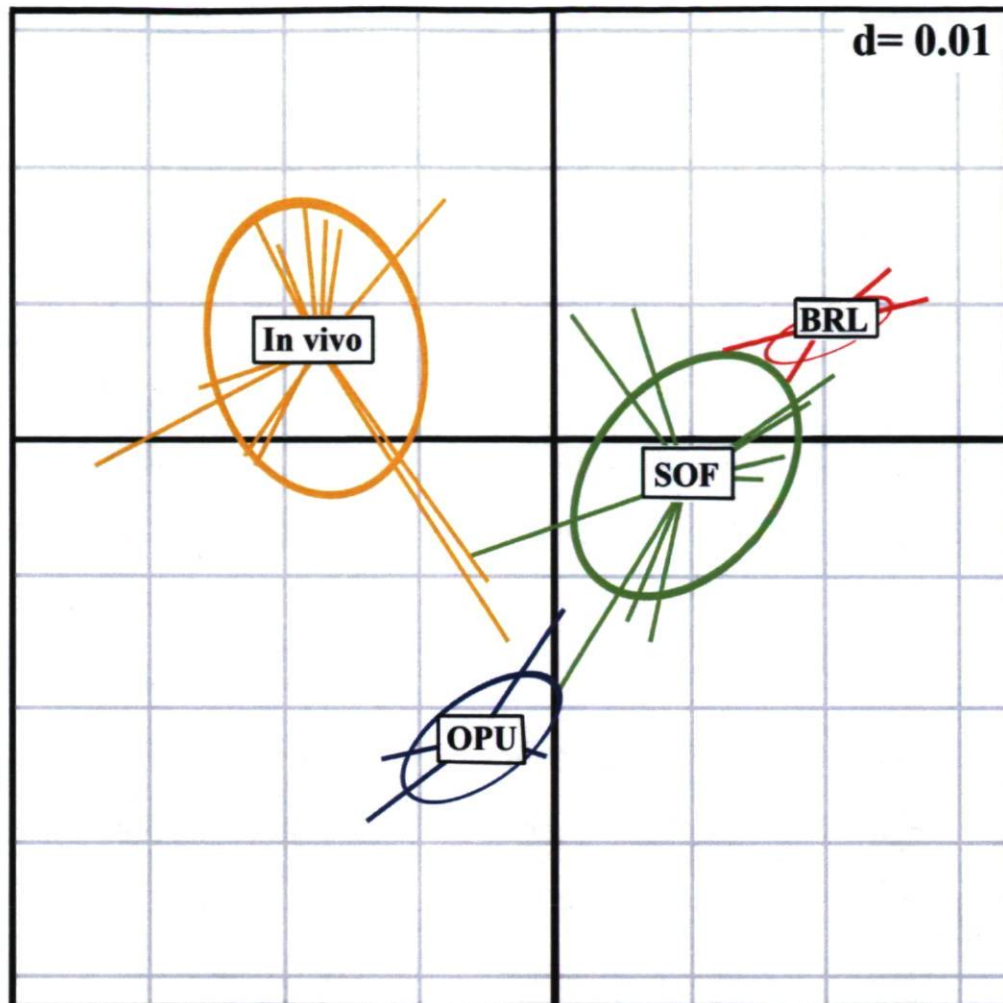


Figure 2.1 Images of blastocysts.

For microarray samples, only expanded blastocysts were harvested (marked as grade 7). Early blastocysts (grade 6), hatching (grade 8) or hatched (grade 9) embryos were not included. For all *in vitro* treatments, blastocysts were collected on day 7.0 post-fertilization. Scale bar = 100 μm .



B

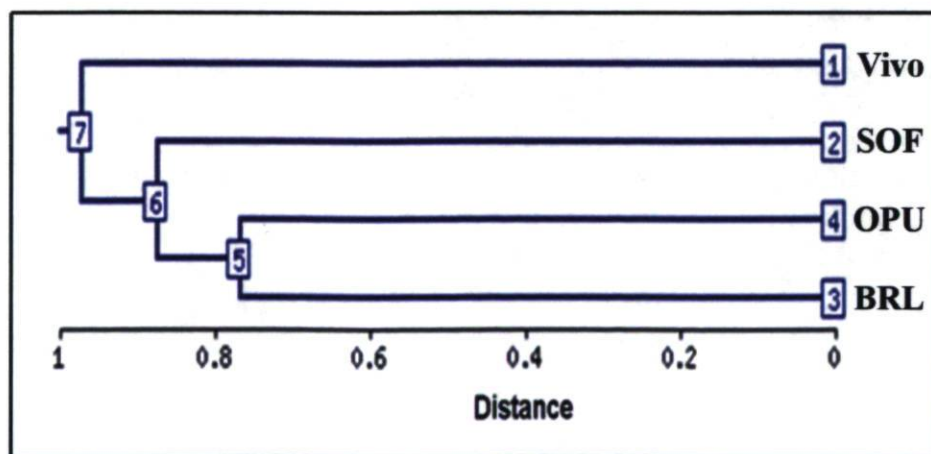


Figure 2.2 Between group analysis (BGA) showing the relationship of transcriptome between production systems.

A) Clustering based on Eigen values. The estimation of biological distance is shown by the distance between each clustered treatments. Replication associated variance is observed by the diameter of the cluster. B) Hierarchical clustering. Relationship between production systems is dependent on the distance between the nodes. Vivo = expanded blastocysts collected by uterine flush 7.5 days post-insemination. The oocytes were ovulated from stimulated ovaries. BRL = expanded blastocysts produced *in vitro* using a co-culture system involving a monolayer of Buffalo rat liver cells. SOF = expanded blastocysts produced *in vitro* in the modified synthetic oviductal fluid medium (SOF). The oocytes were aspirated from post-mortem ovaries. OPU = expanded blastocysts produced *in vitro* using the SOF based system using immature oocytes collected by transvaginal aspiration. All *in vitro* blastocysts were collected on day 7.0 post-fertilization.

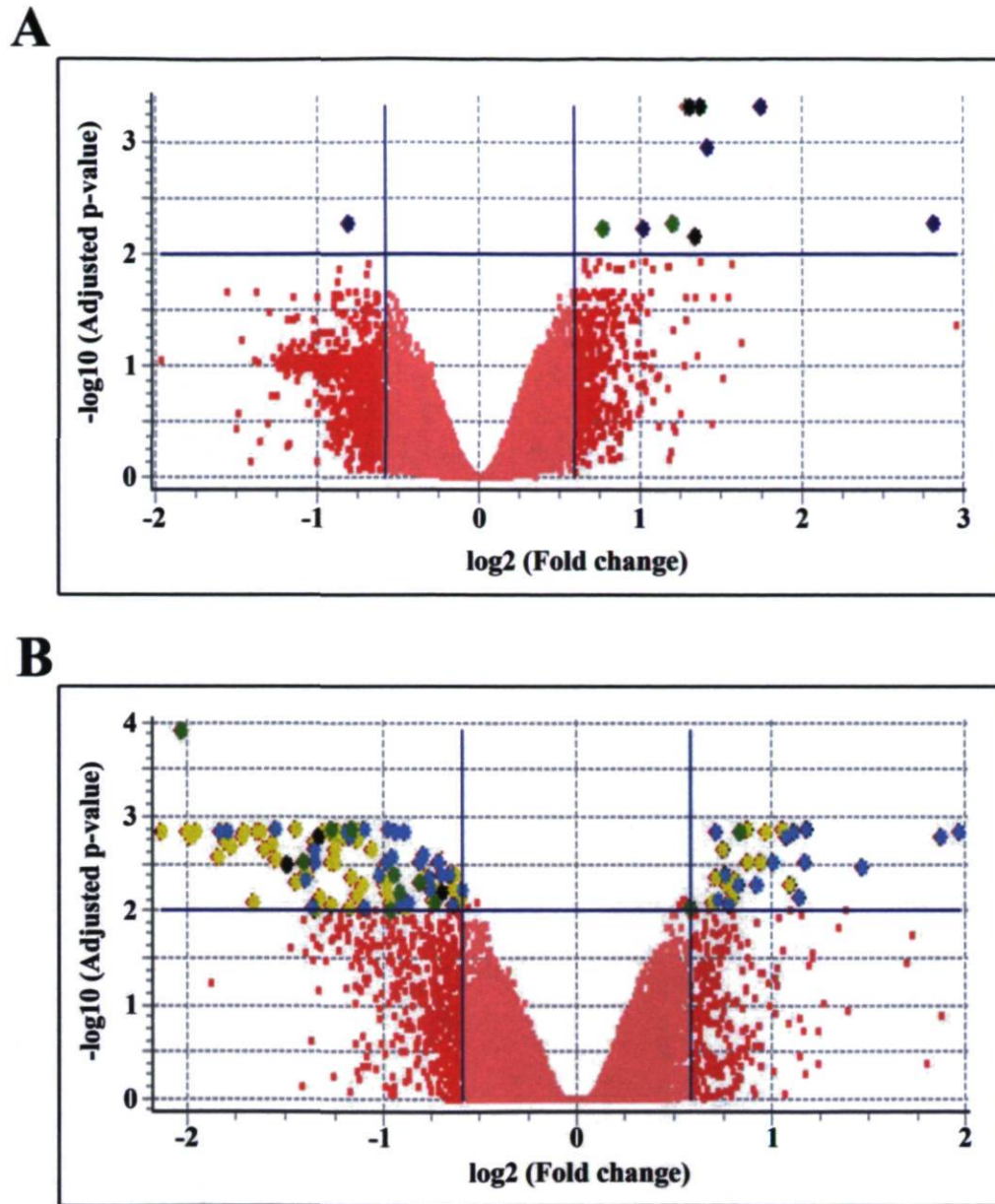


Figure 2.3 Impact of oocyte source and of *in vitro* culture conditions.

A) The *in vitro* conditions were identical, only the source of the immature oocytes differed. For SOF treatment, immature oocytes were collected by aspirating 3-6 mm follicles on post-mortem ovaries whereas the OPU treatment involved aspiration of 7-10 mm follicles on live cows by transvaginal aspiration. B) The well known co-culture system involving

Buffalo rat liver cells (BRL) was compared to the semi-defined SOF based system (SOF). In both cases, immature oocytes were collected from post-mortem ovaries. All samples (panels A and B) were composed of expanded blastocysts collected on day 7.0 post-fertilization. Differentially expressed microarray features are found in the upper left and right regions. Some microarray features target different classes of transcripts or different splicing events: Protein coding and known pseudogenes (blue); novel transcribed elements (yellow), alternate polyadenylation sites (green); exon skipping splice variants (black).

Figure 2.4 Functions and gene network impacted by *in vitro* culture conditions.

The well known co-culture system involving Buffalo rat liver cells (BRL) was compared to the semi-defined SOF based system (SOF). In both cases, immature oocytes were collected from post-mortem ovaries and all samples were composed of expanded blastocysts collected on day 7.0 post-fertilization. A) List of biological functions associated with the differentially expressed genes. B) Lipid metabolism related gene network affected at the blastocyst stage by the *in vitro* culture conditions. Green = over expressed in co-culture condition (BRL) whereas Red = over expressed in semi-defined culture condition (SOF).

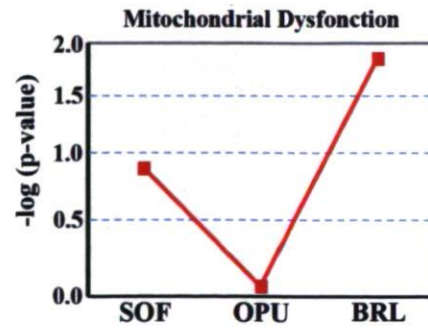
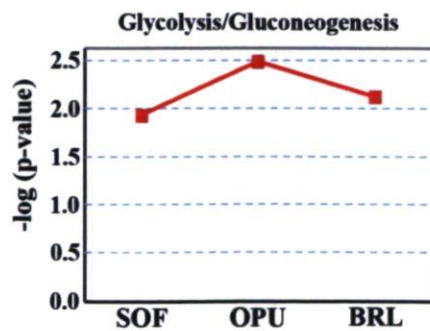
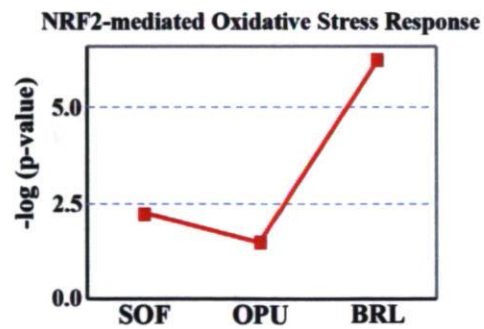
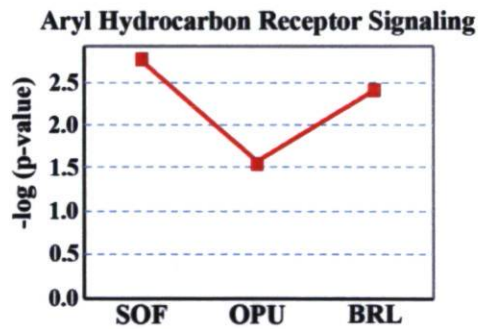
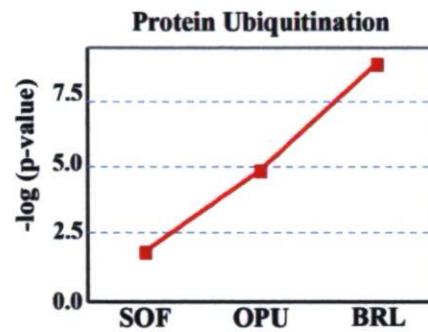
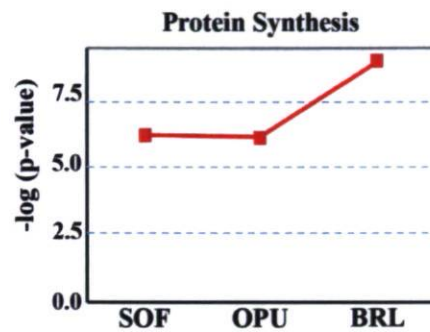
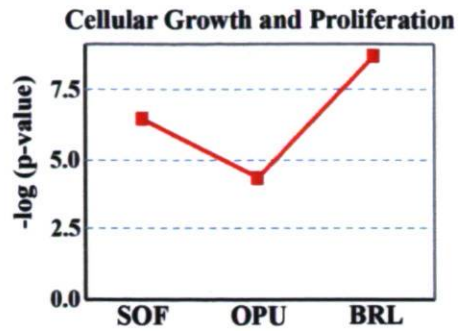
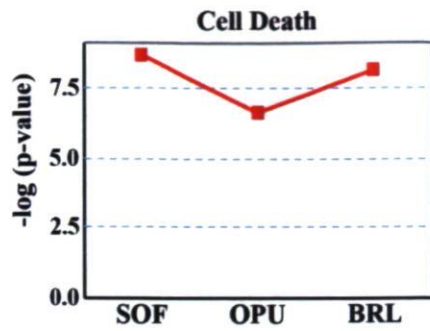


Figure 2.5 Comparative analyses of microarray data across treatments relatively to their *in vivo* collected counterparts.

All *in vitro* treatments were contrasted to their *in vivo* counterpart as reference. Comparative analysis of microarray data enabled to highlight cellular functions commonly and differentially influenced. SOF = immature oocytes collected from post-mortem ovaries and submitted to the semi-defined system; OPU = immature oocytes collected by ovum pick-up and submitted to the semi-defined system; BRL = immature oocytes collected from post-mortem ovaries and submitted to the co-culture system using Buffalo rat liver cells.

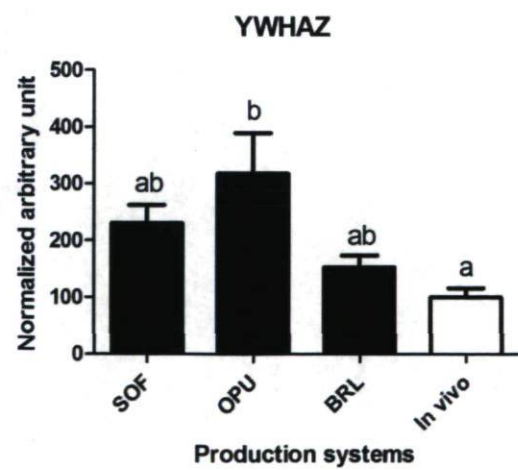
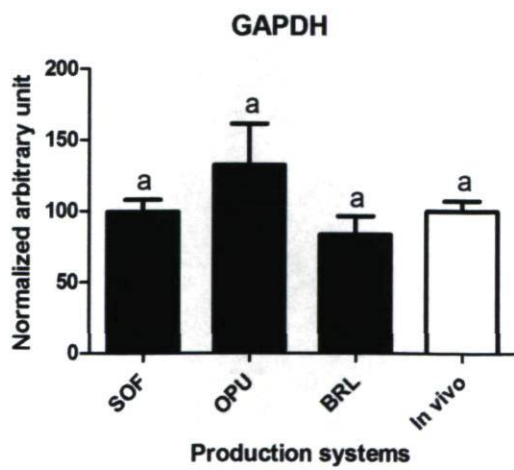
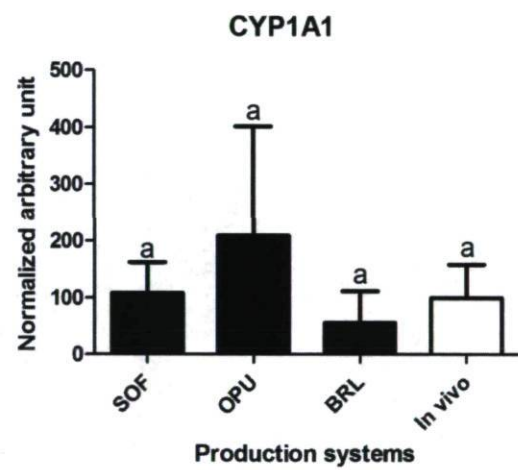
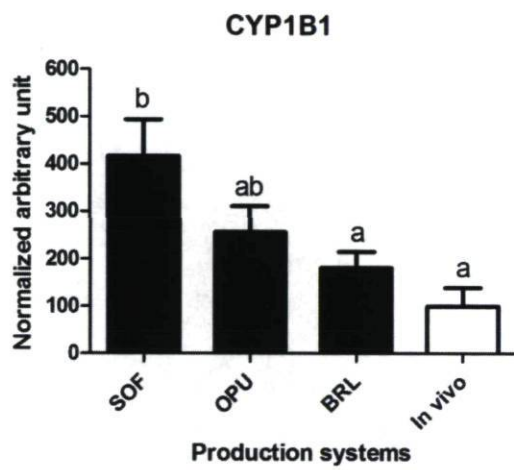
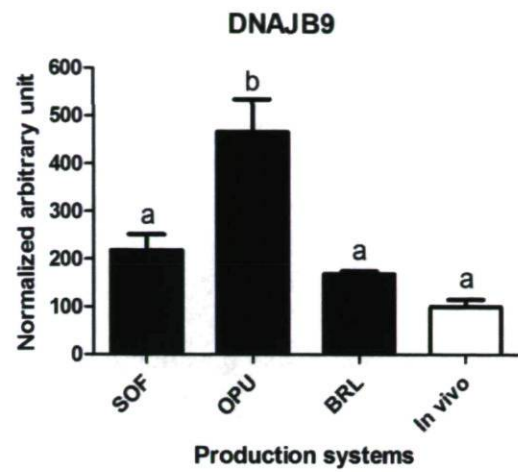
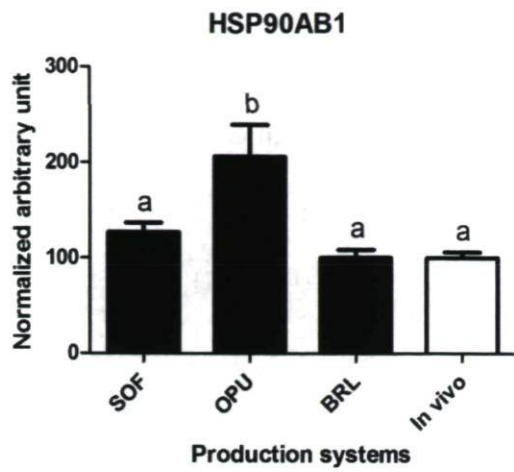


Figure 2.6 Quantification of mRNA for candidates involved in the Aryl Hydrocarbon Receptor pathway.

Four known candidates of the Aryl Hydrocarbon Receptor pathway (HSP90AB1, DNAJB9, CYP1B1, CYP1A1) were measured across the different embryo production systems. Additionally, commonly used housekeeping candidates (GAPDH, YWHAZ) were also tested. The *in vivo* blastocysts were used as the reference.

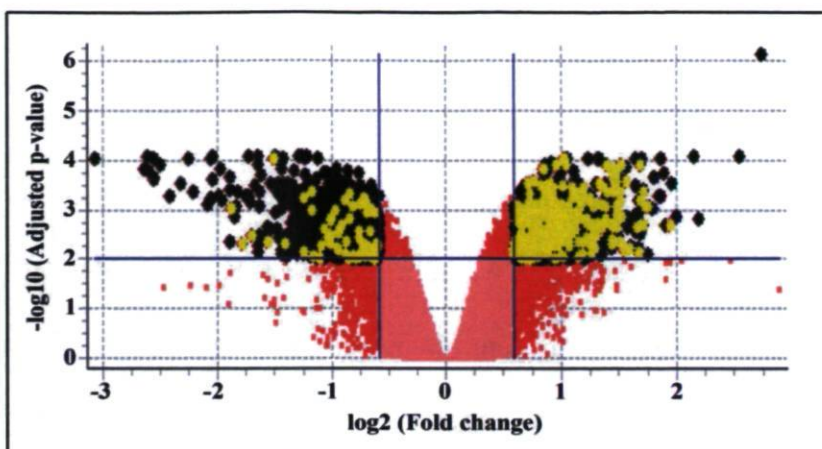
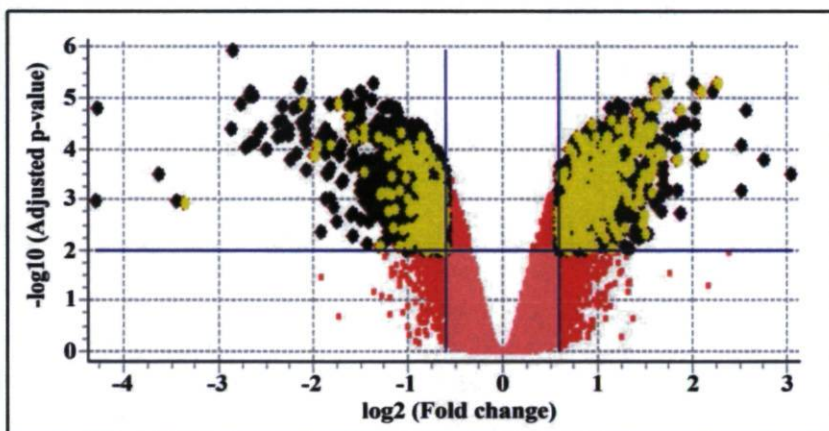
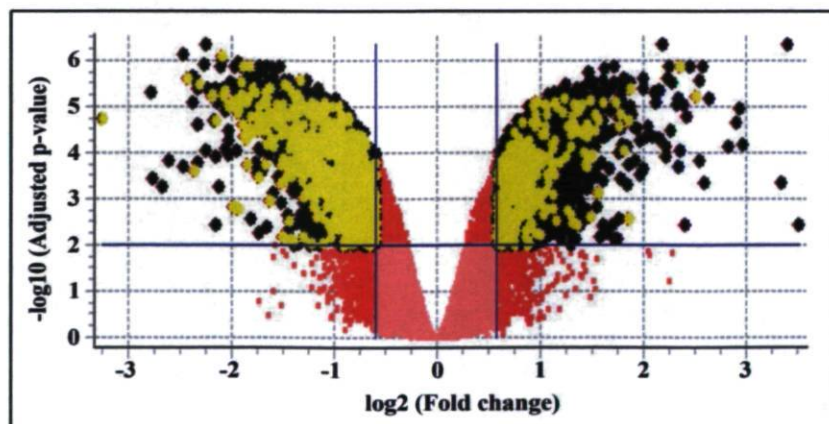
A**B****C**

Figure 2.7 Distribution of differentially expressed Novel transcribed elements.

Volcano plots of expression data. Differentially expressed elements according to an adjusted p-value <0.01 and a fold change of 1.5 are found in the upper right and left regions. Microarray features corresponding to novel transcribed elements are highlighted in yellow. All contrasts compared the *in vitro* produced blastocysts to their *in vivo* counterparts set as a reference. A) Immature oocytes were aspirated from post-mortem ovaries and submitted to the semi-defined system (SOF); B) Immature oocytes were collected by ovum-pick up and submitted to the semi-defined system (SOF); C) Immature oocytes were aspirated from post-mortem ovaries and submitted to the co-culture system (BRL).

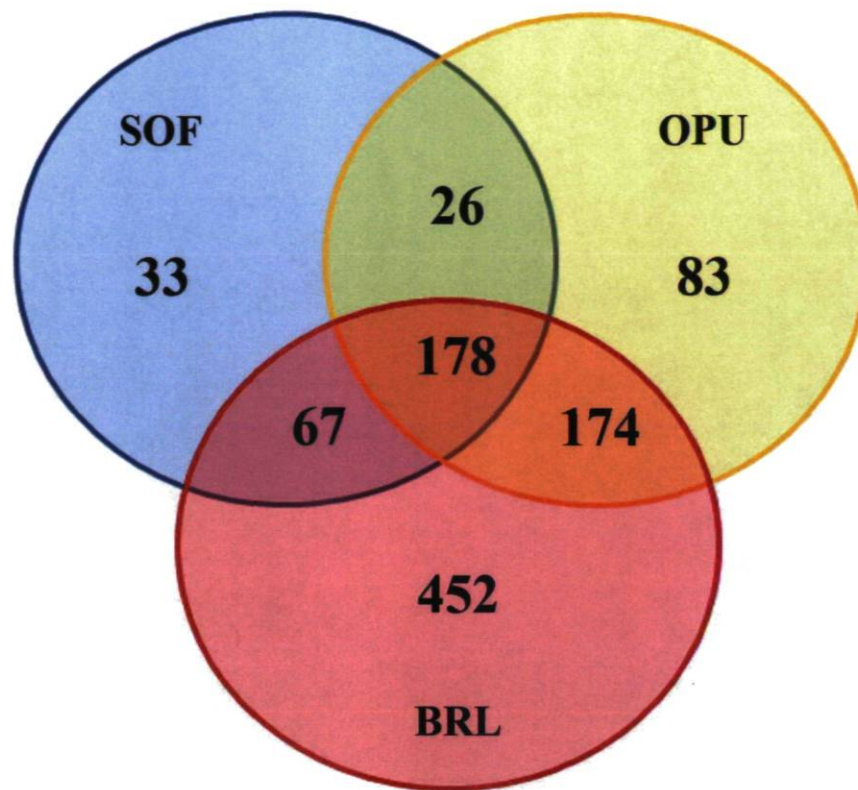


Figure 2.8 Venn diagram of Distribution of differentially expressed NTR across treatments.

Every treatment (SOF, OPU, BRL) was individually contrasted with *in vivo* samples used as reference. Lists of differentially expressed NTR were generated using cut-off values of <0.01 for adjusted p-values in combination with a >1.5 fold change.

Conclusion

La répétabilité d'une expérience est cruciale pour la crédibilité d'un article scientifique. L'une des principales sources de variation a été étudiée dans ce mémoire, soit les conditions de laboratoire. Bien que peu de différences n'aient été notées au niveau de la qualité embryonnaire, la présence d'apoptose a été observée de façon significativement différente d'un laboratoire à l'autre, suggérant que des variables intra-laboratoires auraient le potentiel de créer de légères fluctuations sur les résultats. Par conséquent, il serait également intéressant que d'autres études se penchent sur des sources de variations plus précises qui pourraient compromettre la répétabilité d'une expérience, tel que l'impact des additifs utilisés dans les milieux de culture, l'impact du manipulateur, l'impact de la semence utilisée (effet mâle) et l'impact de l'équipement utilisé (incubateur, bonbonne d'azote liquide, etc.).

Par ailleurs, des différences au niveau de l'expression génique, du taux de blastocyste ainsi que pour le ratio des sexes ont été observées entre les divers systèmes de production *in vitro* et *in vivo*. Selon les résultats présentés dans ce mémoire, la source de l'ovocyte semble avoir un impact sur la compétence au développement, alors que le taux de blastocyste pour les embryons issus d'ovocytes ponctionnés *in vivo* est largement supérieur à celui observé pour les embryons issus d'ovocytes ponctionnés sur des ovaires d'abattoir. Même si peu de différences ont été notées à ce niveau sur le plan de l'expression génique, les variations du taux de blastocyste pourraient être expliquées par la maturité des ovocytes utilisés. Lors de la ponction sur des ovaires d'abattoirs, seuls les follicules de 3 à 6 mm sont récoltés, alors que le diamètre moyen des follicules récoltés lors d'une ponction transvaginale est de 7 à 10 mm. Afin de vérifier si cette différence provient de la source d'ovocyte ou du niveau de maturité de l'ovocyte, il serait pertinent de comparer le taux de blastocyste d'ovocytes récoltés *in vivo* avec des ovocytes récoltés sur des ovaires d'abattoir avec un diamètre folliculaire moyen équivalent. Cependant, comme aucune information n'est connue sur la provenance des ovaires d'abattoir, il ne serait pas possible d'identifier de façon précise le stade du cycle ovarien (croissance folliculaire ou atresie), ni même de

connaître le stade physiologique et la présence de pathologies du système reproducteur (kystes ovariens, métrite, etc.) chez les femelles desquelles les ovaires proviennent.

Contrairement à la source ovocytaire, l'impact de la production embryonnaire in vitro s'est fait sentir au niveau de l'expression génique. Lorsque comparés à des blastocystes produits in vivo, les blastocystes produits sous les conditions in vitro-SOF et avec support cellulaire présentent un métabolisme des lipides plus élevé, alors que le profil d'expression génique des trois conditions in vitro suggère un stress possiblement lié aux matériels de culture embryonnaire. Bien qu'il soit logique de penser que l'expression génique ne puisse être identique entre des embryons produits in vitro et in vivo en raison des lieux de culture dramatiquement opposés (pétri versus histotrophe), ces résultats laissent supposer que certaines conditions de culture in vitro induisent une inefficacité à gérer le métabolisme des lipides ainsi qu'à créer des stress qui affectent à la baisse la qualité embryonnaire. Par ailleurs, il faut garder à l'esprit que le niveau d'expression génique n'est pas toujours directement proportionnel au niveau de protéines produites. En effet, plusieurs étapes de maturation et de régulation sont présentes entre la transcription de l'ADN et la traduction de l'ARN. Finalement, différents phénomènes épigénétiques, mal caractérisés à ce jour, pourraient également faire fluctuer le niveau d'expression génique de certains gènes en fonction des conditions de culture.