

CHRISTIAN VIGNEAULT

**ÉTUDE DE L'ACTIVATION DE LA
TRANSCRIPTION CHEZ LE JEUNE
EMBRYON BOVIN**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en sciences animales
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D.)

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

2008

RÉSUMÉ

Chez une multitude de métazoaires étudiés, une période de quiescence transcriptionnelle est observée chez le jeune embryon suite à la fécondation de l'ovocyte. La durée de cette période est spécifique à chaque espèce et chez le bovin, l'embryon n'active son propre génome qu'aux stades 8- à 16-cellules. Précédemment à cette activation de la transcription, l'embryon subsiste grâce à l'utilisation des ARNm et des protéines fournies par l'ovocyte. C'est également à partir de ces réserves que l'embryon doit puiser les différents facteurs impliqués dans l'activation de son génome au moment requis.

Les expériences présentées dans cette thèse étaient destinées à améliorer nos connaissances de l'activation du génome embryonnaire chez le bovin. Dans un premier temps, la caractérisation de l'expression de plusieurs facteurs de transcription chez l'embryon a été effectuée et le rôle envisageable de ces facteurs dans l'activation du génome a aussi été démontré. Par la suite, nous avons établi une liste exhaustive de plus de 300 transcrits embryonnaires exprimés très tôt dès l'activation du génome. Cette étude du transcriptome a permis l'identification d'une multitude de gènes associés à la transcription et au maintien de la pluripotence que l'on retrouve chez les cellules embryonnaires.

Afin de définir la fonction ou le rôle des différents joueurs identifiés lors de nos études, nous avons mis au point un procédé qui cible spécifiquement un transcrit donné et induit sa dégradation dans les ovocytes bovins sans toutefois induire des effets collatéraux dommageables sur la compétence au développement de ces ovocytes. Cette méthode utilise l'interférence ARN qui réduit à des niveaux très faibles la présence d'un transcrit ciblé, ce qui permet d'étudier les effets de sa perte de fonction. Cette méthode a permis d'établir le rôle crucial dans l'embryon d'un gène issu de nos premières études : *MATRIN 3*. La dégradation de l'ARN de *MATRIN 3*, une composante architecturale de la matrice nucléaire qui agit aussi au niveau de la transcription, s'est avérée avoir des effets néfastes sur la survie embryonnaire. Les informations fournies par la combinaison des études présentées dans cette thèse contribuent à dresser un portrait mieux défini de l'activation du génome chez le bovin.

ABSTRACT

A global state of transcriptional quiescence is observed in early embryos following the fertilization of the oocyte. The duration of this quiescent period is species-specific, and in bovine the embryonic genome is only activated at the 8- to 16-cell stages. Before the activation of its genome, the early embryo subsists on accumulated reserves of maternal mRNA and proteins supplied by the oocyte. Consequently, the embryo must find in these maternal supplies the factors involved in the initiation of transcription from its own genome.

Experiments presented in this thesis were designed to improve our knowledge of the mechanisms behind embryonic genome activation. In our first studies, we characterized the expression profiles of several transcription factors in bovine embryos and their potential role in genome activation is discussed. In a subsequent study, we unveiled the transcriptome of early bovine embryos during the genome activation process. This allowed the identification of numerous genes (> 300) expressed throughout this important embryonic development period. The gene inventory obtained from this series of experiments was interesting in terms of molecular functions since a very high proportion were associated with RNA transcription and processing or with pluripotency maintenance. Furthermore, for many of these genes, their presence in early embryos was revealed for the very first time.

In order to investigate and characterize the purpose of these genes in bovine embryogenesis, we modified and adapted microinjection and knockdown techniques to eliminate specific maternal transcripts in bovine oocytes without inducing negative collateral damages. This method exploits the principles of RNA interference, which allows significant decrease in the mRNA levels of a targeted gene and subsequently of its corresponding protein. The application of this method allowed us to discover that the nuclear matrix component *MATRIN 3*, a gene identified in our previous study, was crucial during embryogenesis. The knockdown of this putative transcriptional activator resulted in a significant inhibition of development to the blastocyst stage. The combined results from our studies provide valuable information that enlightens our knowledge of bovine embryonic genome activation.

AVANT-PROPOS

Il est important de définir l'implication des différents auteurs dans le travail présenté dans les différents chapitres de cette thèse. Tout d'abord, dans l'étude présentée au chapitre II publiée dans la revue *Biology of Reproduction*, les auteurs Serge McGraw, Lyne Massicotte et Marc-André Sirard ont participé à la planification des expériences et/ou à leur exécution technique. Dans l'étude suivante décrite au chapitre III et soumise à la revue *Reproduction* (en cours de révision), Serge McGraw a participé à l'élaboration des techniques et Marc-André Sirard à l'élaboration conceptuelle des expériences. Le chapitre IV présente une étude qui sera prochainement soumise pour révision à des fins de publication dans la revue *Reproduction*. Catherine Gravel, Maud Vallée, Serge McGraw ainsi que Marc-André Sirard ont participé activement à la réalisation technique des expériences présentées dans ce chapitre et à leur planification. Finalement, dans les chapitres V et VI, dont les résultats n'ont pas encore été soumis à aucune revue scientifique, Isabelle Gilbert, Serge McGraw ainsi que François Paradis ont activement participé à la mise au point et à l'exécution technique des expériences alors que Marc-André Sirard a aidé à la conception des études.

Les nombreuses années de travail nécessaires à la production de cet ouvrage ont connu bien des hauts et des bas. Je tiens donc à profiter de ce moment pour remercier tous les gens sympathiques que j'ai côtoyé lors de ces années d'étude qui m'ont très généreusement offert leur aide à plusieurs circonstances et qui ont aussi participé à me changer les idées lors des moments moins agréables.

Tout d'abord, je me dois de remercier tout spécialement Marc-André Sirard, mon directeur de recherche. Il m'a offert la chance d'effectuer mes études doctorales dans un environnement de travail hyper stimulant et dans une équipe de recherche formidable dont je me souviendrai longtemps. Je suis très reconnaissant de la confiance et liberté absolues qu'il m'a accordées dans tous mes projets. L'indépendance incroyable à laquelle j'ai eu droit a permis de bien développer mon esprit de recherche.

Je tiens aussi à remercier Claude Robert, François Richard et François Pothier pour leur très grande disponibilité et leurs innombrables conseils procurés au cours de mes études graduées. Un merci particulier aussi à Robert Viger pour ses conseils et pour avoir accepté la co-direction de mes études.

Comme je l'ai dit plus tôt, j'ai eu la chance de travailler dans un environnement de travail sain dans lequel j'ai connu des gens extraordinaires dont je vais me souvenir toute ma vie. Bien que je sois extrêmement content de voir les aboutissants de mon travail, c'est tout de même avec une grande nostalgie que je quitte ces gens formidables. Un immense merci s'impose à Serge McGraw pour son aide généreuse et hors du commun lors de l'élaboration technique et conceptuelle de la majorité du travail présenté dans cette thèse. Sans lui, jamais cette thèse dans sa forme actuelle n'aurait été possible et sans sa compagnie, les nombreuses soirées et nuits passées au laboratoire auraient été beaucoup plus pénibles. C'est l'heure de te renvoyer ton balancier vieux et j'espère qu'il te sera aussi profitable qu'il me l'a été, merci. Je tiens aussi spécialement à remercier Maud Vallée, François Paradis, Guillaume Morin, Susan Novak, Karine Tremblay, Catherine Gravel, Isabelle Gilbert, Stéphanie Desrosiers, Jean-Philippe Grenon, Evelyne Sylvestre et David Gosselin pour les innombrables bons moments passés en votre compagnie. Vous êtes vraiment une équipe unique qui sera très difficile à oublier. Finalement, je me dois de remercier avec sincérité Isabelle Laflamme et Isabelle Dufort qui, en plus de leur très bonne compagnie, sont le type de personnes ressources dont j'aimerais pouvoir m'entourer toute ma vie en recherche et sans qui plusieurs parties de cette thèse auraient été difficiles à réaliser. Merci à TOUS!

Je tiens à prendre un dernier moment pour remercier ceux qui occupent la place la plus importante dans ma vie, ma famille. À bien des moments au cours du doctorat, lorsque les choses allaient moins bien, mes frères étaient toujours là pour me changer les idées et me faire revenir aux vraies valeurs importantes de la vie lors de nos nombreuses excursions qui se sont avérées souvent des échecs mais dans lesquelles nous avons eu un plaisir mémorable. Je remercie aussi mes parents qui, bien qu'ils avaient parfois de la difficulté à saisir ce que je faisais et pourquoi je le faisais, ont toujours été présents et m'ont fièrement encouragé. À eux ainsi qu'aux autres membres de ma famille plus élargie qui ont fait en sorte que je sois celui que je suis aujourd'hui, MERCI!

Pour terminer je ne sais quels mots utiliser pour exprimer toute ma gratitude à la personne la plus importante dans ma vie à qui je dédie cette thèse, Mylène! Sans toi, jamais mes études graduées n'auraient été aussi agréables et équilibrées. Bien souvent je n'ai pas été aussi disponible que tu l'aurais sûrement voulu et je suis reconnaissant de ta compréhension. Merci aussi à Sarah-Maude qui ne le sait pas encore, mais qui a donné un tout autre sens à notre vie et qui a su me faire relaxer et décrocher lors des derniers mois de mes études. Je vous aime énormément!

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
ABSTRACT	III
AVANT-PROPOS	IV
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIV
CHAPITRE I : MISE EN CONTEXTE	1
1.1 L'OVOCYTE ET LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE	1
1.1.1 L'importance de l'ovocyte.....	1
1.1.2 L'origine de l'ovocyte.....	1
1.1.3 La croissance de l'ovocyte au sein du follicule.....	2
1.1.3.1 Le follicule primordial et primaire.....	2
1.1.3.2 Le follicule secondaire.....	2
1.1.3.3 Le follicule tertiaire.....	3
1.1.4 La maturation de l'ovocyte.....	4
1.1.4.1 La maturation nucléaire.....	4
1.1.4.2 La maturation cytoplasmique.....	5
1.1.4.3 La maturation moléculaire.....	6
1.1.4.3.1 Synthèse protéique.....	6
1.1.4.3.2 Polyadénylation et déadénylation des ARNm.....	7
1.1.5 Le développement embryonnaire.....	8
1.1.5.1 La fécondation.....	8
1.1.5.2 Le clivage embryonnaire.....	9
1.1.6 La compétence au développement et l'incidence des techniques <i>in vitro</i>	10
1.1.6.1 La compétence à produire un blastocyste.....	11
1.1.6.2 La production embryonnaire <i>in vitro</i> et la qualité embryonnaire.....	12
1.2 LA TRANSCRIPTION DANS L'OVOCYTE ET L'EMBRYON	14
1.2.1 Le transcriptome de l'ovocyte bovin.....	14
1.2.1.1 L'activation et l'interruption de la transcription dans l'ovocyte.....	14
1.2.1.2 Masquage et entreposage d'ARNm au sein de l'ovocyte.....	15
1.2.1.2.1 Y-box protein 2 (MSY2).....	16
1.2.1.2.2 CPEB, maskin et autres protéines de liaison à l'ARNm.....	18
1.2.1.2.3 Le contrôle de la traduction par les miRNA.....	19
1.2.2 La transcription chez l'embryon bovin.....	20
1.2.2.1 La transition maternelle embryonnaire (MET).....	21
1.2.2.2 Comparaisons inter-espèces du moment où se produit la MET.....	22
1.2.2.3 La transcription hâtive chez l'embryon pré-MET.....	23
1.3 LA RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION	23
1.3.1 Les régions régulatrices de la transcription.....	24
1.3.1.1 Le promoteur central (Core Promoter).....	24

1.3.1.2	Le promoteur proximal	25
1.3.1.3	Les îlots CpG.....	26
1.3.1.4	Les promoteurs distaux (enhancers).....	27
1.3.2	La machinerie transcriptionnelle basale	28
1.3.2.1	Le complexe de pré-initiation (PIC) et l'initiation de la transcription	29
1.3.2.2	La sous unité carboxy-terminale de l'ARN polymérase II (CTD)	31
1.3.2.3	L'élongation de la transcription et l'ARN polymérase II	32
1.3.3	Régulation de la transcription par les histones et le nucléosome	32
1.3.3.4	La matrice nucléaire et son importance dans la régulation de la transcription	39
1.4	LE CONTRÔLE DE LA TRANSITION MATERNELLE EMBRYONNAIRE	40
1.4.1	Activation de la transcription par la traduction d'ARNm maternels	41
1.4.2	MET dirigée par les modifications post-traductionnelles.....	42
1.4.3	Transcription à la MET dirigée par les enhancers et les promoteurs sans boîte TATA ..	44
1.4.4	Dilution d'inhibiteurs de transcription	45
1.4.5	La méthylation de l'ADN et la MET	48
1.4.6	Les protéines HMG et la MET	51
1.4.6.1	Protéines HMGA (AT-hook High Mobility Group proteins)	51
1.4.6.2	Protéines HMGN (High Mobility Group Nucleosome Binding Proteins)	54
1.4.6.3	Protéines HMGB (High Mobility Group Box proteins).....	55
1.5	HYPOTHÈSES	57
1.6	RÉFÉRENCES.....	61
CHAPITRE II : QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DE		
FACTEURS DE TRANSCRIPTION DANS L'EMBRYON BOVIN PRÉ-		
MET..... 78		
2.1	RÉSUMÉ	79
2.2	ABSTRACT.....	80
2.3	INTRODUCTION.....	81
2.4	MATERIALS AND METHODS	83
2.4.1	Oocyte recovery and selection.....	83
2.4.2	<i>In vitro</i> maturation	83
2.4.3	<i>In vitro</i> fertilization	84
2.4.4	<i>In vitro</i> culture	84
2.4.5	RNA extraction and cDNA preparation.....	85
2.4.6	Real-time polymerase chain reaction (PCR)	86
2.4.7	Statistical analysis	87
2.5	RESULTS	87
2.6	DISCUSSION	89
2.7	CONCLUSION	94
2.8	ACKNOWLEDGMENTS	94
2.9	REFERENCES.....	95

2.10	TABLES.....	99
2.11	FIGURES.....	101

CHAPITRE III : EXPRESSION ET LOCALISATION DE RÉGULATEURS DE TRANSCRIPTION EN LIEN AVEC LA TRANSITION MATERNELLE EMBRYONNAIRE CHEZ L'EMBRYON BOVIN PRODUIT *IN VITRO* 106

3.1	RÉSUMÉ	107
3.2	ABSTRACT.....	108
3.3	INTRODUCTION.....	109
3.4	MATERIALS AND METHODS	111
3.4.1	Tissue collection and embryo production	111
3.4.2	RNA extraction and reverse transcription.....	112
3.4.3	Real-time polymerase chain reaction	112
3.4.4	Immunoblotting.....	112
3.4.5	Immunofluorescence.....	113
3.4.6	Statistical analysis	114
3.5	RESULTS	115
3.5.1	ATF2 mRNA quantification in bovine early embryo development	115
3.5.2	Protein expression levels of MSY2, TBP and ATF2 in bovine embryos	115
3.5.3	Immunolocalization of MSY2, TBP, and ATF2 in oocytes and embryos.....	115
3.6	DISCUSSION	116
3.7	CONCLUSION	120
3.8	ACKNOWLEDGEMENTS.....	121
3.9	REFERENCES.....	122
3.10	FIGURES.....	127

CHAPITRE IV : DÉVOILEMENT DU TRANSCRIPTOME À LA TRANSITION MATERNELLE EMBRYONNAIRE CHEZ L'EMBRYON BOVIN..... 133

4.1	RÉSUMÉ	134
4.2	ABSTRACT.....	135
4.3	INTRODUCTION.....	136
4.4	MATERIALS AND METHODS	138
4.4.1	Oocyte collection and embryo production	138

4.4.2	Oocyte and embryo collection.....	139
4.4.3	RNA extraction.....	140
4.4.4	cDNA preparation and suppressive subtractive hybridization (SSH).....	140
4.4.5	Libraries production and cDNA slides preparation	141
4.4.6	mRNA amplification	142
4.4.7	Labelling of aRNA	142
4.4.8	Microarray hybridization	142
4.4.9	Microarray analysis	143
4.4.10	Sequencing and clone identification	143
4.4.11	cDNA preparation and real-time RT-PCR.....	144
4.4.12	Statistical analysis of the real-time PCR results.....	144
4.5	RESULTS	145
4.5.1	Suppressive subtractive hybridization and microarray hybridizations.....	145
4.5.2	SSH Validation by quantitative RT-PCR	146
4.6	DISCUSSION	147
4.7	CONCLUSION	152
4.8	ACKNOWLEDGMENTS	152
4.9	REFERENCES.....	153
4.10	TABLES.....	158
4.11	FIGURES.....	166
CHAPITRE V : DÉGRADATION EFFICACE ET SPÉCIFIQUE		
D'ARNM MATERNELS PAR MICRO-INJECTION DE SIRNA DANS		
L'OVOCYTE BOVIN IMMATURE AVEC CELLULES DE CUMULUS		
..... 169		
5.1	RÉSUMÉ	170
5.2	ABSTRACT	171
5.3	INTRODUCTION.....	172
5.4	MATERIALS AND METHODS	174
5.4.1	Oocyte recovery and embryo production.....	174
5.4.2	Design of siRNAs.....	175
5.4.3	<i>In vitro</i> synthesis of siRNAs.....	175
5.4.4	Cumulus enclosed oocyte microinjection	175
5.4.5	RNA Extraction.....	176
5.4.6	Preparation of cDNAs and real-time RT-PCR.....	177
5.4.7	Statistical analysis of the real-time PCR results.....	178
5.4.8	Immunofluorescence	178
5.4.9	Messenger RNA amplification	179
5.4.10	Labelling of aRNA	179
5.4.11	Microarray hybridization and analysis.....	179

5.5	RESULTS	180
5.5.1	Effect of siRNA concentration on knockdown efficiency	180
5.5.2	Significant differences of efficiency amongst different siRNAs	180
5.5.3	Kinetics of the RNAi process in bovine oocytes.....	181
5.5.4	Co-injection efficiency and specificity of siRNAs	181
5.5.5	Localisation of HMG2 proteins throughout embryogenesis and consequences of its knockdown on its protein expression.	182
5.5.6	Oocyte and embryo mortality following siRNA microinjection.....	182
5.5.7	Gene expression at MET following <i>HMG2</i> and <i>HMG2</i> siRNAs microinjection	183
5.6	DISCUSSION	183
5.7	CONCLUSION	188
5.8	ACKNOWLEDGEMENTS	188
5.9	REFERENCES	189
5.10	TABLES	194
5.11	FIGURES	195
 CHAPITRE VI : <i>MATRIN 3</i>, UN CONSTITUANT DE LA MATRICE NUCLEAIRE ESSENTIEL AU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE		
.....		202
6.1	RÉSUMÉ	203
6.2	ABSTRACT	204
6.3	INTRODUCTION	205
6.4	MATERIALS AND METHODS	207
6.4.1	Oocyte recovery and embryo production.....	207
6.4.4	Cumulus enclosed oocytes microinjection.....	208
6.4.5	RNA extraction.....	209
6.4.6	Reverse transcriptase and real-time RT-PCR.....	209
6.4.7	Immunofluorescence.....	210
6.4.8	Survival and developmental rate assessment of GV oocytes microinjected with <i>MATRIN 3</i> siRNAs.....	211
6.4.9	Statistical analysis	211
6.5	RESULTS AND DISCUSSION	211
6.5.1	<i>MATRIN 3</i> mRNA expression profile in bovine early embryogenesis.....	211
6.5.2	<i>MATRIN 3</i> protein localization in bovine oocytes and early embryos.....	212
6.5.3	Knockdown efficiency and specificity of <i>MATRIN 3</i> siRNA microinjection.....	214
6.5.4	Spatio-temporal expression of <i>MATRIN 3</i> in bovine embryos following siRNA microinjection.....	214
6.5.5	Impact of siRNA-mediated maternal <i>MATRIN 3</i> knockdown on developmental capabilities of targeted oocytes	215
6.6	CONCLUSION	217

6.7	AKNOWLEDGMENTS	217
6.8	REFERENCES.....	218
6.9	TABLES.....	222
6.10	FIGURES.....	223
CHAPITRE VII : CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES		228
7.1	RÉFÉRENCES.....	237

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Diamètre des ovocytes et des follicules aux différents stades de la folliculogénèse.....	4
Figure 1.2	Masquage et démasquage des ARNm via l'interaction de CPEB avec la maskin.....	19
Figure 1.3	Schéma illustrant les niveaux d'ARNm maternels et embryonnaires en relation avec le développement embryonnaire bovin.....	21
Figure 1.4	Structure d'un promoteur central typique et disposition de ses éléments généraux.....	24
Figure 1.5	Formation de l'enhanceosome par la liaison entre un enhancer et le promoteur proximal via le médiateur.....	27
Figure 1.6	Recrutement de la RNPII et des GTF par la liaison du médiateur à des activateurs de transcription liés à un enhancer.....	28
Figure 1.7	Déroulement de l'assemblage séquentiel du PIC.....	30
Figure 1.8	Formation du PIC par le recrutement de l'ARN polymérase II holoenzyme au promoteur central par TFIID.....	31
Figure 1.9	Illustration des différents degrés de compaction de la chromatine.....	34
Figure 1.10	Modifications possibles des histones composant le nucléosome.....	35
Figure 1.11	Acétylation des queues d'histones et relaxation de la structure nucléosomale.....	35
Figure 1.12	Illustration des différentes voies utilisées par les complexes à activité histone acétyltransférase et des complexes de remodelage de la chromatine dans l'activation de la transcription.....	37
Figure 1.13	Représentation schématique des domaines transcriptionnellement actifs et de leur association à la matrice nucléaire.....	39
Figure 1.14	Titration d'inhibiteurs de transcription avec la duplication de la quantité d'ADN génomique lors des divisions cellulaires chez l'embryon <i>Xenopus</i> à la MET.....	46
Figure 1.15	Niveaux de méthylation globaux des gamètes et des embryons bovins.....	50
Figure 2.1	Quantification by Real-Time RT-PCR of YY1 and HMGA1 in bovine oocytes and embryos cultured <i>in vitro</i>	101
Figure 2.2	Quantification by Real-Time RT-PCR of RY-1, P300, CREB, YAP65 and HMGN1 in bovine oocytes and embryos cultured <i>in vitro</i>	102
Figure 2.3	Quantification by Real-Time RT-PCR of HMGB1, NFAR, OCT-4 and TEAD2 in bovine oocytes and embryos cultured <i>in vitro</i>	103
Figure 2.4	Quantification by Real-Time RT-PCR of ATF-1 in bovine oocytes and embryos cultured <i>in vitro</i>	104
Figure 2.5	Quantification by Real-Time RT-PCR of HMGN2, MSY2 and TBP in bovine oocytes and embryos cultured <i>in vitro</i>	105

Figure 3.1	Quantification of <i>ATF2</i> mRNA in bovine oocytes and early embryos using real-time RT-PCR.....	127
Figure 3.2	Immunoblotting showing antibody specificity with bovine protein samples.....	128
Figure 3.3	Immunoblotting showing MSY2, TBP and ATF2 protein expression throughout development.....	129
Figure 3.4	Immunolocalization of MSY2 in oocyte and early embryo development.....	130
Figure 3.5	Immunolocalization of TBP in oocyte and early embryo development.....	131
Figure 3.6	Immunolocalization of ATF2 in oocyte and early embryo development.....	132
Figure 4.1	Schematic representation of the 311 unique cDNA clones.....	166
Figure 4.2	Quantification by real-time RT-PCR of the mRNA profile throughout bovine early development of 15 genes selected from our cDNA library.....	167
Figure 4.3	Quantification by real-time RT-PCR of housekeeping genes transcript levels throughout bovine early development.....	168
Figure 5.1	Graphical representation of the microinjection setup.....	195
Figure 5.2	Dose-dependent action of siRNAs.....	196
Figure 5.3	Variable knockdown efficiency among different siRNAs.....	197
Figure 5.4	Kinetics of RNAi process in bovine GV oocytes.....	198
Figure 5.5	Efficiency and specificity of <i>HMGNI</i> & <i>N2</i> siRNAs co-injection.....	199
Figure 5.6	Immunocytochemistry showing localization of the HMGN2 proteins in embryos following each siRNA treatment.....	200
Figure 5.7	Blastocyst developmental potential of microinjected oocytes.....	201
Figure 6.1	Quantification of the mRNA profile of <i>MATRIN 3</i> by real-time RT-PCR throughout bovine early development.....	223
Figure 6.2	Immunolocalization of MATRIN 3 in oocyte and early embryos.....	224
Figure 6.3	Quantification of <i>MATRIN 3</i> , <i>Gapdh</i> and <i>H2a.1</i> mRNA levels in 1-cell embryos following each siRNA treatment.....	225
Figure 6.4	Immunolocalization of MATRIN 3 following microinjection of siRNA.....	226
Figure 6.5	Representative culture droplets of each siRNA treatment.....	227

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ANOVA	Analysis of variance
aRNA	Amplified RNA
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
asRNA	Antisense RNA
BFF	Bovine follicular fluid
BRE	TFIIB recognition element
BrUTP	5-bromouridine 5'-triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	Complementary DNA
COCs	Cumulus-oocytes complexes
CPE	Cytoplasmic polyadenylation element
CPEB	CPE binding protein
CPSF	Cleavage and polyadenylation specificity factor
CTD	C terminal domain
DDRT-PCR	Differential display reverse transcriptase – polymerase chain reaction
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DNMT	Enzymes 5-cytosine-méthyltransférase à ADN
DPE	Downstream promoter element
dsRNA	Double-stranded RNA
EGA	Embryonic genome activation
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
eIF4G	Eukaryotic translation initiation factor 4G
FAF-BSA	Fatty acid free – bovine serum albumin
FCS	Fetal calf serum
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GFP	Green fluorescent protein
GTFs	Facteurs de transcription généraux
GV	Germinal vesicle
GVBD	Germinal vesicle breakdown
HAT	Histones acétyltransférase
HDAC	Histones déacétylase
HMG	High mobility group
HMGA	AT-hook high mobility group protein
HMGB	High mobility group box protein
HMGN	High mobility group nucleosome binding protein
Hsp70	Heat shock protein 70
ICM	Masse cellulaire interne
ICSI	Intra-cytoplasmic sperm injection
Inr	Initiateur
LH	Hormone lutéinisante
LSD	Least significant difference

MBD	Methyl binding domain
MBT	Mid-blastula transition
MET	Transition maternelle embryonnaire
MI	Métaphase I
MII	Métaphase II
miRNA	Micro RNA / micro ARN
MPF	M-phase promoting factor
mRNA	Messenger RNA
mRNPs	Messenger ribonucleoprotein particles
MZT	Maternal to zygotic transition
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NES	Nuclear export signal
NIH	National institute of health
NLS	Nuclear localization signal
PABP	Poly (A) binding protein
PAP	Poly (A) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PI	Propidium iodide
PIC	Complexe de pré-initiation
PKA	cAMP-dependent protein kinase
RISC	RNA-induced silencing complex
RNPII	RNA polymerase II / ARN polymérase II
RNAi	RNA interference
rRNA	Ribosomal RNA
RT	Reverse transcriptase
RT-PCR	Reverse transcriptase – polymerase chain reaction
SCNT	Somatic cell nuclear transfer
siRNA	Small interfering RNA / petits ARN interférentiels
S/MARs	Scaffold / Matrix associated regions
SOF	Synthetic oviduct fluid
SSH	Suppressive subtractive hybridization
TATA-box	Boîte TATA
TBP	TATA-box binding protein
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline – tween 20
TLH	Tyrode lactate medium
ZGA	Zygotic genome activation

CHAPITRE I : MISE EN CONTEXTE

1.1 L'OVOCYTE ET LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

1.1.1 L'importance de l'ovocyte

L'ovocyte est une cellule unique aux caractéristiques extraordinaires. D'abord, elle procure la moitié du matériel génétique (1N) à l'embryon lors de la fécondation et, du même coup, une abondance de facteurs sous forme d'ARNm ou de protéines pour permettre la progression des premiers stades du développement embryonnaire. L'ovocyte est une cellule totipotente, c'est-à-dire qu'elle est à l'origine de tous les tissus composant un être vivant, mais de plus, elle a également le potentiel de remettre à zéro le programme génétique d'une cellule somatique différenciée lors de transfert nucléaire (clonage) pour assurer la constitution de tous les tissus de l'embryon et de l'adulte (Kim J. M. *et al.*, 2002).

1.1.2 L'origine de l'ovocyte

Cette cellule étonnante a comme origine les cellules germinales primordiales. À la suite de leur migration dans le fœtus vers la crête uro-génitale, les cellules germinales primordiales alors appelées ovogonies chez la femelle se multiplient par une multitude de mitoses successives. La division rapide de ces ovogonies mène à la formation de grappes et c'est à ce moment que des connections avec les cellules somatiques environnantes se forment. Suite à cette période de prolifération, les ovogonies entrent en méiose pour devenir des ovocytes. Ces derniers ne terminent pas leur première méiose immédiatement puisqu'ils s'arrêtent plutôt au stade diplotène de la prophase I pour y rester en état de latence pendant une période de temps plus ou moins longue dépendant des espèces. À ce moment de l'ovogenèse, le noyau de l'ovocyte est appelé la vésicule germinale (GV) et ce stade nucléaire est maintenu jusqu'à la reprise méiotique induite lors de l'ovulation.

1.1.3 La croissance de l'ovocyte au sein du follicule

1.1.3.1 Le follicule primordial et primaire

Suite à l'atteinte du stade diplotène, les ovocytes s'entourent d'une monocouche de cellules aplaties qui deviendront ultérieurement les cellules de granulosa, afin de former les follicules primordiaux (revu dans Pepling, 2006). Autour de cette première strate de cellules, on retrouve une autre couche cellulaire formant la lame basale. Subséquemment les cellules de la thèque viendront envelopper la lame basale, contribuant ainsi à la formation du follicule et à son isolement dans l'ovaire.

Les jeunes ovocytes présents dans ces premiers follicules n'ont pas encore acquis la compétence nécessaire pour former un embryon ou pour reprogrammer une cellule somatique par clonage. Cette compétence s'acquiert graduellement dans ce que l'on appelle l'ovogenèse et se déroule au sein du follicule en croissance. Une des premières étapes de la folliculogénèse, suivant la formation des follicules primordiaux, est une différenciation des follicules primordiaux en follicules primaires. Cette différenciation est caractérisée par la multiplication et la métamorphose des cellules aplaties entourant l'oocyte en cellules cuboïdales (Braw-Tal & Yossefi, 1997, Fair *et al.*, 1997b). Cependant, même si le follicule se modifie et croît légèrement, le diamètre de l'ovocyte ne varie pas significativement et demeure à $\pm 30 \mu\text{m}$ (Braw-Tal & Yossefi, 1997) (Figure 1.1).

1.1.3.2 Le follicule secondaire

Alors qu'une très forte proportion des follicules primordiaux et primaires demeure dans un état latent pendant des mois ou voire des années, il y a transformation d'une certaine quantité des follicules primaires en follicules secondaires. Ce stade folliculaire est principalement caractérisé par la formation d'une deuxième couche de cellules de granulosa autour de l'ovocyte et le début de la déposition des glycoprotéines qui vont former la zone pellucide au pourtour de l'ovocyte. C'est aussi à ce moment que l'ovocyte commence à prendre du volume pour atteindre près de $50 \mu\text{m}$ de diamètre (Braw-Tal & Yossefi, 1997)

(Figure 1.1) et que s'établissent les communications spécialisées entre l'ovocyte et les cellules de granulosa avoisinantes (Fair *et al.*, 1997b). Ces connexions, appelées jonctions GAP, sont indispensables à la croissance adéquate de l'ovocyte au sein du follicule puisque c'est par ces jonctions que les cellules de granulosa nourrissent l'ovocyte par le transport de diverses molécules et métabolites (Eppig, 1991).

1.1.3.3 Le follicule tertiaire

Alors que la très grande majorité des follicules ovariens est figée aux stades primordiaux, primaires et secondaires (>95%), une faible proportion des follicules est recrutée lors des vagues folliculaires pour entrer au stade tertiaire. Ces follicules sont caractérisés par l'apparition d'une petite cavité (antrum), qui est gorgée de liquide folliculaire constitué de plasma sanguin et de sécrétions produites par les cellules de granulosa. La formation de l'antrum amène la séparation des cellules de granulosa en 2 types distincts : les cellules de granulosa murales qui tapissent la paroi du follicule et les cellules de cumulus qui sont les cellules de granulosa qui demeurent en contact avec l'ovocyte (revu dans Gilchrist *et al.*, 2004). À ce stade du développement folliculaire chez le bovin, l'ovocyte a augmenté considérablement en diamètre (90 μm) (Figure 1.1) et est recouvert d'une zone pellucide complète (Braw-Tal & Yossefi, 1997).

Bien que les ovocytes bovins provenant des follicules tertiaires (antraux) sont capables de réinitialiser leur méiose, seulement une minime proportion d'ovocytes de petite taille (<110 μm) provenant des plus petits follicules démontrent des signes de reprise de méiose, en comparaison à la vaste majorité d'ovocytes de plus grand diamètre (>115-120 μm) contenus dans les follicules antraux de stades plus avancés (Fair *et al.*, 1995, Otoi *et al.*, 1997, Lodde *et al.*, 2007a). Cette faible compétence à reprendre la méiose des ovocytes provenant de follicules <3 mm se reflète aussi sur leur compétence au développement. En effet, une très faible proportion des ovocytes provenant des petits follicules se développe jusqu'au stade de blastocyste suite au processus de fécondation et développement *in vitro* contrairement aux ovocytes de plus grands diamètres provenant des follicules >3 mm (Blondin & Sirard, 1995, Otoi *et al.*, 1997, Fair, 2003, Lodde *et al.*, 2007a).

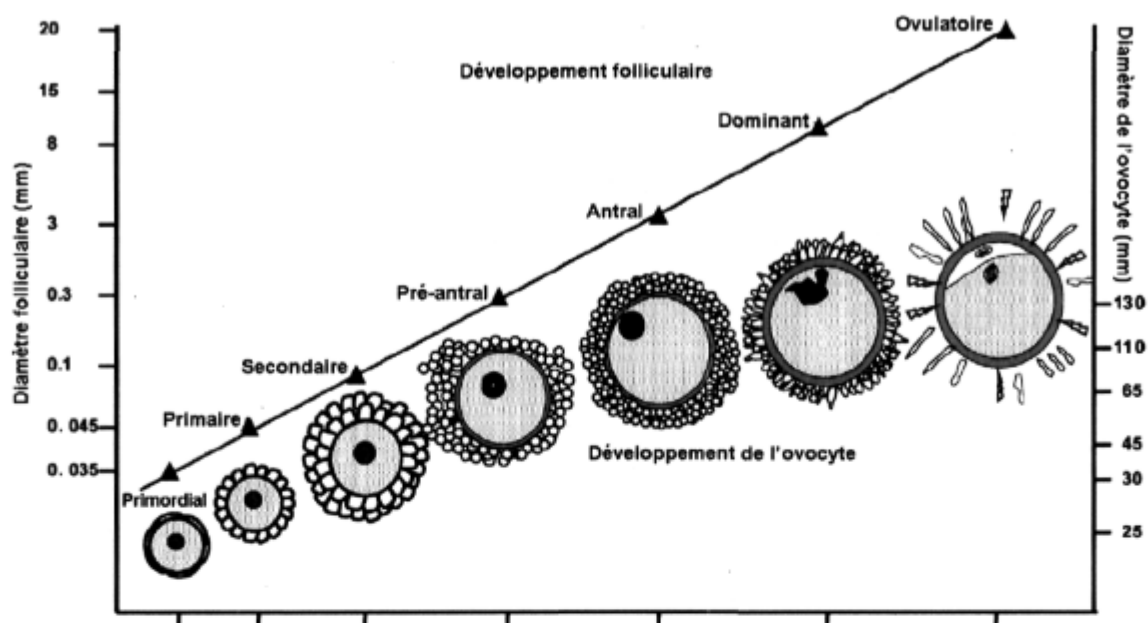


Figure 1.1. Diamètre des ovocytes et des follicules aux différents stades de la folliculogénèse (Reproduit avec permission (Fair, 2003)).

1.1.4 La maturation de l'ovocyte

Alors que l'ovocyte acquiert une certaine forme de maturité au sein du follicule pendant l'ovogénèse, une maturation terminale est indispensable afin que l'ovocyte soit fécondable et compétent à produire un embryon viable. *In vivo*, cette maturation a lieu à l'intérieur du follicule dominant et est initiée par l'hormone lutéinisante (LH) lors du cycle oestral. Cette maturation peut être divisée en trois différents volets : la maturation nucléaire, la maturation cytoplasmique ainsi que la maturation moléculaire (revu dans Sirard, 2001, Sirard *et al.*, 2006).

1.1.4.1 La maturation nucléaire

La maturation nucléaire ou plus spécifiquement la reprise méiotique est un processus nucléaire inhabituel qui ne se produit qu'au sein des cellules germinales et qui a comme objectif de favoriser l'échange de matériel génétique entre les différents brins des chromosomes (Cohen *et al.*, 2006). Ce processus assure une plus grande diversité

génétique dans les générations subséquentes, et surtout, réduit le bagage chromosomique de la cellule à 1N, c'est-à-dire à 1 copie de chaque chromosome. Dans l'ovocyte, cette maturation est initiée par le froissement et le bris de la vésicule germinale dans ce que l'on appelle le Germinal Vesicle BreakDown (GVBD) et par la disparition ultime de l'enveloppe nucléaire. On assiste par la suite à une condensation des chromosomes et à leur alignement pour une première division méiotique, qui a pour effet d'éliminer la moitié du bagage chromosomique (2N) par l'expulsion du premier globule polaire lors de la méiose I. Subséquemment la deuxième division méiotique est initialisée et la méiose est à nouveau stoppée au stade de métaphase II dans l'attente de la fécondation par le spermatozoïde (1N) (Mattson & Albertini, 1990). La fécondation a comme conséquence d'achever cette deuxième méiose par l'expulsion du deuxième globule polaire dans lequel une copie du génome est éliminée, laissant l'ovocyte mature avec une seule copie (1N) prêt pour sa fusion avec le bagage génétique du spermatozoïde lui aussi à 1N (Mattson & Albertini, 1990).

1.1.4.2 La maturation cytoplasmique

Le deuxième volet de la maturation est de type cytoplasmique et est principalement caractérisé par des modifications des organelles et du cytosquelette à l'intérieur de l'ovocyte (Hyttel *et al.*, 1989, Kim *et al.*, 2000). De manière simplifiée, on assiste à la migration des granules corticaux vers la membrane plasmique de l'ovocyte, à une rupture des jonctions GAP entre l'ovocyte et les cellules de cumulus proximales et par la migration des organelles vers la région périnucléaire de l'ovocyte. La migration des granules corticaux vers le cortex de l'ovocyte est une étape importante pour le processus de fécondation afin de contribuer à l'inhiber la polyspermie. Lorsque le spermatozoïde pénètre à l'intérieur de l'ovocyte, une vague d'exocytose relâche le contenu de ces granules, ce qui cause une modification de la zone pellucide de l'ovule et permet de bloquer l'accès aux autres spermatozoïdes (Sun, 2003). Cette aptitude de blocage semble accrue avec la croissance ovocytaire car les ovocytes de plus grand diamètre (115-120 μm) sont plus résistants à la polyspermie que leurs congénères plus petits (Otoi *et al.*, 1997).

1.1.4.3 La maturation moléculaire

Le dernier type de maturation, la maturation moléculaire, est beaucoup moins défini et plus difficile à observer. Dans les 2 types précédents, de flagrants changements physiologiques sont observables par microscopie alors que la maturation moléculaire, quoique non moins importante, ne produit que des changements subtils au niveau moléculaire, ce qui nécessite des méthodes d'observation plus sensibles et plus complexes. C'est pourquoi ce type de maturation est présentement encore mal caractérisé.

1.1.4.3.1 Synthèse protéique

Un premier chambardement bien connu au niveau moléculaire est la synthèse protéique dans les ovocytes en maturation. En effet, tout au long de la maturation, que ce soit pendant la GVBD, dans les ovocytes en MI ou même dans les ovocytes en MII, une très grande synthèse protéique est observée (Sirard *et al.*, 1989, Tomek *et al.*, 2002, Coenen *et al.*, 2004, Massicotte *et al.*, 2006). La maturation ne provoque non seulement l'apparition de nouvelles protéines mais aussi la modification post-traductionnelle de certaines protéines existantes (Kastrop *et al.*, 1990, 1991, Chian *et al.*, 2003, Vigneron *et al.*, 2004). L'importance de cette synthèse protéique pour la maturation et la progression de l'ovocyte en GV vers le stade de métaphase II a été démontrée à plusieurs reprises par l'utilisation de cycloheximide, un inhibiteur de la traduction (Simon *et al.*, 1989, Kastrop *et al.*, 1990, 1991, Levesque & Sirard, 1996, Saeki *et al.*, 1997, Lonergan *et al.*, 1998). La cycline B1, qui fait partie intégrante du MPF (M-phase promoting factor), responsable de la reprise de la méiose et qui est indispensable chez le bovin, est un bel exemple de protéine traduite lors de la maturation. La forme protéique de cette cycline est absente dans l'ovocyte en GV, cependant, elle apparaît rapidement après la mise en maturation suite à la traduction de son ARNm contenu dans l'ovocyte immature (Levesque & Sirard, 1996, Robert *et al.*, 2002a, Tremblay *et al.*, 2005).

1.1.4.3.2 Polyadénylation et déadénylation des ARNm

La synthèse de nouvelles protéines et le renouvellement de protéines déjà présentes lors de la maturation de l'ovocyte bovin sont contrôlés par la traduction des ARNm maternels présents dans l'ovocyte en GV. Mais qu'est-ce qui régule le recrutement d'un ARNm spécifique pour sa traduction au moment requis? Bien qu'il existe plusieurs types de modulation possibles, la régulation de la longueur de la queue poly (A) des ARNm semble être la tactique de choix utilisée par l'ovocyte pour initier ou inhiber la traduction d'un ARNm. En effet, une courte queue poly(A) (<50 bases) est généralement associée à un ARNm silencieux alors qu'une queue poly(A) contenant de 80 à 150 adénosines ou plus correspond habituellement à un ARNm qui sera traduit (Bachvarova, 1992, Mendez & Richter, 2001, de Moor *et al.*, 2005). Une augmentation de la polyadénylation globale des ARNm est observée au cours de la maturation ovocytaire, ce qui corrèle bien avec l'augmentation de la traduction durant cette même période (Tomek *et al.*, 2002).

Afin d'être polyadénylé, un ARNm doit posséder un signal de polyadénylation nommé CPE (cytoplasmic polyadenylation element), à moins de 100 bases du signal hexanucléotide de polyadénylation présent dans sa région 3' non codante. Le CPE est ciblé par la protéine de liaison CPEB (CPE binding protein) qui entraîne généralement le recrutement du CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor). Suite au clivage d'une portion du pré-ARNm, la protéine CPSF est responsable de l'initiation de l'ajout d'adénosine en position 3' de l'ARNm via l'action d'une poly (A) polymérase (PAP). À mesure que la queue poly (A) s'allonge, des protéines de liaisons à la queue poly (A) (PABP) s'y lient et permettent à la PAP de continuer son processus jusqu'à l'obtention d'environ 200-300 nucléotides. L'extension de la queue poly(A) est limitée par un équilibre des forces ioniques entre les PABPs et l'ARNm et cette stabilité est atteinte lorsque la queue poly (A) mesure environ 200 à 300 nucléotides (Keller *et al.*, 2000). Les PABPs initient ensuite la traduction des ARNm via leur action concertée avec divers facteurs d'initiation tels eIF4G et eIF4E (figure 1.2). Un bel exemple d'élongation de queue poly(A) en relation avec la traduction de l'ARNm en protéine au cours de la maturation ovocytaire est le cas de l'ARNm maternel de la cycline B1. Dès le début de la

maturation, on observe que sa queue poly(A) est allongée très rapidement en parallèle avec l'apparition de la protéine correspondante (Traverso *et al.*, 2005, Tremblay *et al.*, 2005).

Parallèlement, d'autres transcrits sont déadénylés durant la maturation ovocytaire pour réduire leur traduction (Brevini-Gandolfi *et al.*, 1999, Brevini *et al.*, 2002). Certains ARNm peuvent tout simplement être déadénylés par défaut suite à l'absence d'un CPE actif alors que pour d'autres ARNm, cette déadénylation pourrait provenir de l'action de certains signaux qui sont présents dans les séquences 3' non codantes de ces ARNm (revu dans de Moor *et al.*, 2005). Suite à leur déadénylation, les ARNm sont soit dégradés, soit conservés et entreposés pour une utilisation ultérieure (Lequarre *et al.*, 2004). L'entreposage des ARNm maternels sera précisé à la section 1.2.1.2.

1.1.5 Le développement embryonnaire

1.1.5.1 La fécondation

Comme précédemment décrit, l'ovule est retenu en métaphase II, suite à sa maturation, jusqu'à l'arrivée du spermatozoïde. La fécondation entraîne l'expulsion du 2^e globule polaire contenant la moitié du bagage génétique de l'ovule qui est par la suite remplacée par celui du spermatozoïde. La fusion de ces cellules germinales génère le zygote, qui est le premier stade embryonnaire d'une nouvelle entité totipotente avec le potentiel de former un nouvel individu complet.

Le spermatozoïde, qui agit entre autre comme pourvoyeur de l'ADN mâle jusqu'à l'ovule, a une structure nucléaire très différente de tout autre type cellulaire. Son ADN est extrêmement compact grâce au remplacement des histones par les protamines lors de la spermatogenèse (Braun, 2001). Cet ADN doit donc être décondensé suite à sa pénétration à l'intérieur du cytoplasme de l'ovocyte. Afin d'accomplir cette décondensation, le noyau du spermatozoïde doit passer par un processus inverse à ce qui est observé lors de la spermatogenèse; c'est-à-dire que les protamines doivent être remplacées par les histones maternelles présentes dans l'ovule afin que l'ADN vienne s'enrouler autour des octamères

d'histones pour former les structures appelées nucléosomes (McLay & Clarke, 2003). Suite à ce remaniement structurel majeur, on dénote l'apparition du pronoyau mâle. L'ADN qui le constitue devra ensuite subir une étape duplicative avant d'être mélangé à celui du pronoyau femelle lors de la première division mitotique de l'embryon afin de former l'embryon 2-cellules.

1.1.5.2 Le clivage embryonnaire

Les premières divisions mitotiques chez le bovin sont plutôt caractérisées par des clivages rapides composés de phases S et M du cycle cellulaire sans passer par de réelles phases G1 et G2, deux étapes dans lesquelles se produit la majorité de la synthèse d'ARNm. Conséquemment l'embryon ne passe que quelques heures aux stades 2- et 4-cellules, puis un ralentissement du cycle cellulaire se produit au stade 8-cellules pour englober toutes les phases normales du cycle cellulaire observées dans les cellules somatiques (Barnes & Eyestone, 1990). Ainsi, c'est au stade 8-cellules que l'embryon développe sa capacité à activer la transcription de son génome. Les ARNm provenant de cette nouvelle transcription embryonnaire prendront ainsi le relais des ARNm maternels provenant de l'ovocyte et permettront le développement subséquent de l'embryon. Ce passage désignant le remplacement des réserves d'ARNm maternelles par de nouveaux ARNm provenant de l'embryon est appelé la transition maternelle embryonnaire (MET) et sera détaillée dans la section 1.2.2 (Figure 1.3).

Les divisions cellulaires des premiers stades chez l'embryon sont désignées par le terme clivage. Durant ces premiers stades de développement, il y a une série de clivages symétriques des cellules embryonnaires qui provoquent une diminution de 50% du volume de chaque cellule lors de chaque division sans toutefois augmenter le volume total de l'embryon jusqu'à l'atteinte du stade de blastocyste où le diamètre total de l'embryon augmente pour une première fois. Les premiers changements apparents autres que le fractionnement symétrique des cellules de l'embryon se produisent au stade morula (32- à 64-cellules), où on assiste à une compaction de l'embryon. Subséquemment à cette compaction, on remarque la formation d'une petite cavité appelée blastocèle à l'intérieur de

l'embryon. Cette structure est typique d'un embryon qui fait son entrée au stade de jeune blastocyste. C'est à partir de cette période du développement embryonnaire que l'on perçoit les premières cellules qui subissent un réel début de différenciation. Deux types cellulaires sont clairement identifiables : les cellules de la masse cellulaire interne (ICM) et les cellules trophoblastiques. Les cellules de l'ICM sont des cellules pluripotentes formant le bouton embryonnaire responsable de la formation du fœtus, alors que les cellules trophoblastiques sont celles situées en périphérie de l'embryon et sont impliquées dans l'attachement de l'embryon à la paroi utérine ainsi que dans la formation du placenta. L'atteinte du stade blastocyste se fait, chez le bovin, une semaine post-fécondation. En augmentant sa dimension, le blastocyste finit par éclore et se libère de son enveloppe protectrice qu'est la zone pellucide afin de continuer son développement et sa préparation pour son attachement à l'utérus (revu dans Watson, 1992).

1.1.6 La compétence au développement et l'incidence des techniques *in vitro*

Comme il a été mis en évidence précédemment, ce ne sont pas tous les ovocytes de tous les stades folliculaires qui ont acquis la capacité, lorsque fécondés, de former un embryon viable se développant jusqu'au stade de blastocyste. Chez le bovin, même si certains critères morphologiques permettent de sélectionner les ovocytes immatures les plus aptes au développement *in vitro*, seulement une maigre proportion (~30%) de ces ovocytes verront toutefois le stade de blastocyste (Blondin & Sirard, 1995). Cette capacité qu'ont certains ovocytes à produire un blastocyste est définie comme la compétence au développement (Sirard, 2001). Cette compétence s'acquiert au cours du développement folliculaire mais aussi lors de la maturation finale qui a lieu parallèlement à la reprise méiotique chez l'ovocyte. Cette compétence comporte deux volets très importants : la compétence à produire un embryon mais aussi la compétence à produire un embryon apte à induire une gestation.

1.1.6.1 La compétence à produire un blastocyste

Chez le bovin, plusieurs évidences démontrent l'importance de l'influence qu'a l'environnement folliculaire, lors de la maturation terminale, sur la compétence au développement de l'ovocyte. Une étude a démontré que lorsque des ovocytes sont prélevés d'ovaires, d'abattoir ou de vaches ayant subi un traitement de superovulation, puis maturés, fécondés et cultivés *in vitro*, leur capacité à produire des blastocystes est plus faible comparativement aux ovocytes maturés *in vivo* provenant du même protocole de superovulation (Rizos *et al.*, 2002c). Cette divergence est conservée peu importe si les embryons sont cultivés *in vitro* ou *in vivo* dans des oviductes de brebis. De plus, les mêmes auteurs ont démontré que le potentiel de développement jusqu'au blastocyste de zygotes provenant d'ovocytes bovins maturés et fécondés *in vivo* étaient similaires peu importe si ces embryons étaient par la suite cultivés *in vitro* ou *in vivo* (Rizos *et al.*, 2002c). Ces évidences démontrent clairement que les méthodes actuelles de culture embryonnaire *in vitro* ne sont pas limitatives pour la production d'embryons en termes de quantité, mais plutôt que le manque à gagner en termes de rendement provient d'une déficience causée par une maturation *in vitro* inadéquate.

Des résultats légèrement contradictoires publiés par une autre équipe illustrent que lorsque des ovocytes immatures sont prélevés d'ovaires ayant subi un protocole de superovulation et sont maturés *in vitro*, ces derniers ont la même aptitude au développement que des ovocytes maturés *in vivo* (Blondin *et al.*, 2002). Toutefois, pour obtenir des résultats si élevés, les auteurs ont démontré que les ovocytes doivent passer une période de temps minimale dans les follicules suite à la dernière dose de FSH avant d'être récoltés afin d'induire une certaine forme de pré-maturation *in vivo* avant la mise en maturation *in vitro*. Les auteurs ont également établi dans la même étude que la récolte des ovocytes immatures 6 h post injection de LH (luteinizing hormone), qui a pour but d'induire la maturation *in vivo*, avait aussi un effet bénéfique sur la compétence des ovocytes au développement. Ceci démontre donc que lorsque les ovocytes sont bien préparés, leur compétence au développement est beaucoup moins affectée par les méthodes actuelles de maturation *in vitro*. Ainsi, pour acquérir une capacité accrue à produire des

embryons, les ovocytes maturés *in vitro* doivent être préalablement exposés à certains signaux folliculaires qui ne se retrouvent pas dans les méthodes et/ou les milieux de maturation *in vitro* actuels. Cette hypothèse a été confirmée par une série d'expériences qui a démontré que des ovocytes bovins maturés *in vitro* avec un supplément de liqueur folliculaire issue de follicules compétents affichent des niveaux supérieures de compétence au développement (Ali *et al.*, 2004). Les défis futurs seront donc d'identifier ces apports que procure le follicule lors de la maturation *in vivo* afin de raffiner les méthodes et les milieux actuels de maturation *in vitro*.

1.1.6.2 La production embryonnaire *in vitro* et la qualité embryonnaire

Bien qu'il ait été démontré que les milieux de culture ne sont pas problématiques pour la production embryonnaire en termes de nombre d'embryons produits, il ne faut cependant pas croire que tout est à point pour autant. Il faut se poser la question suivante : est-ce que ces blastocystes sont sains et sont-ils aptes à produire une descendance viable et en santé? Le syndrome du gros veau est un bel exemple pour illustrer certains effets néfastes que peut avoir la culture embryonnaire *in vitro* sur la qualité de la progéniture. Une reprogrammation épigénétique inadéquate du génome des embryons lors de la culture *in vitro* serait en partie responsable de ce désordre génétique qui touche une certaine proportion des veaux (revu dans Farin *et al.*, 2006).

Il est difficile d'établir quelle étape du processus de fécondation *in vitro* (maturation, fécondation ou culture) est la plus dommageable pour la qualité de l'embryon produit. Il y a par contre, des manifestations phénotypiques (ex : la résistance au froid) qui semblent directement dépendre de la portion culture post-fécondation. Il est bien connu que les embryons bovins issus de maturation et de culture *in vitro* survivent plus difficilement à la congélation alors que leurs analogues maturés et cultivés *in vivo* y survivent très bien (Rizos *et al.*, 2002c). Étonnamment, les zygotes produits *in vitro*, à partir d'ovules obtenus par maturation *in vitro*, lorsque réintroduits dans des oviductes de brebis pour la culture *in vivo*, acquièrent une très bonne tolérance à la congélation. Cela démontre bien que cette fragilité à la cryotolérance acquise par les embryons est supérieure

pendant la période de culture *in vitro* que lors de la maturation de l'ovocyte. Cette affirmation est renforcée par la démonstration que les zygotes obtenus d'ovocytes maturés et fécondés *in vivo* perdent totalement leur cryotolérance suite à leur mise en culture *in vitro* (Rizos *et al.*, 2002c). Une des causes de cette fragilité au froid des embryons pourrait provenir de la présence de sérum dans les milieux de culture *in vitro* et de la trop grande accumulation de lipides dans ces embryons (Rizos *et al.*, 2003).

Plusieurs autres travaux démontrent les effets néfastes de la culture *in vitro* sur la qualité des embryons, sur leur structure et celle de leurs organelles ainsi que sur l'expression génique (Fair *et al.*, 2001, Rizos *et al.*, 2002a, Knijn *et al.*, 2005, Wrenzycki *et al.*, 2005, Corcoran *et al.*, 2006, Lonergan *et al.*, 2006, Corcoran *et al.*, 2007). C'est pourquoi des méthodes de culture en milieu défini sans ajout de sérum (Ali & Sirard, 2002) peuvent s'avérer utiles pour étudier les effets engendrés par certains additifs sur le développement embryonnaire.

La période d'activation du génome embryonnaire au stade 8-cellules (MET) est cruciale lors du développement embryonnaire bovin. Toutefois, même si elle est probablement influencée par les méthodes de culture, peu d'indices sont actuellement disponibles à ce sujet. Lorsque les milieux de culture sont vraiment inadéquats, on sait par contre qu'un blocage du développement embryonnaire survient au stade 8-cellules chez le bovin (Camous *et al.*, 1984b) ce qui souligne l'importance de la MET et sa sensibilité aux méthodes de culture. Il est donc raisonnable de croire qu'une activation inadéquate du génome embryonnaire suite à une culture dans des milieux sous optimaux pourrait influencer négativement la qualité de ces embryons. C'est pourquoi une meilleure compréhension de cette période du développement pourrait amener ultimement à la synthèse de nouveaux milieux de culture améliorés.

1.2 LA TRANSCRIPTION DANS L'OVOCYTE ET L'EMBRYON

1.2.1 Le transcriptome de l'ovocyte bovin

1.2.1.1 L'activation et l'interruption de la transcription dans l'ovocyte

L'initiation de la transcription chez l'ovocyte se produit très tôt à l'intérieur de l'ovaire. C'est encore plus vrai chez la souris alors que de la transcription est détectable aussi tôt que dans les follicules primordiaux et primaires (Chouinard, 1971). Cette activation transcriptionnelle, au moins au niveau du nucléole, semble toutefois retardée chez le bovin alors que la transcription n'est perceptible dans les ovocytes qu'à partir du follicule secondaire (Fair *et al.*, 1997a). Cette activité transcriptionnelle augmente conjointement avec la croissance ovocytaire pour atteindre son apogée lorsque l'ovocyte atteint un diamètre de près de 100 μm dans le follicule antral. Par la suite, une diminution de la synthèse d'ARN est détectée parallèlement à la croissance finale de l'ovocyte jusqu'à ce que ce dernier atteigne 120 μm , où par la suite, pratiquement plus aucune transcription n'est perceptible. Cette diminution de transcription se produit graduellement à mesure que l'ovocyte croît vers son diamètre final et est corrélée avec une certaine condensation de la chromatine dans la vésicule germinale (Fair *et al.*, 1995, Fair *et al.*, 1996, Lodde *et al.*, 2007a, Lodde *et al.*, 2007b).

Cette transcription est tout autant importante pour la croissance et la différenciation de l'ovocyte au cours de l'ovogenèse que pour les premières étapes du développement du jeune embryon. En effet, puisque l'ovocyte en GV au moment de débiter sa maturation est pratiquement inactif au niveau de la transcription et que la synthèse d'ARN n'est détectée qu'à nouveau que dans les embryons 8-cellules, le jeune embryon doit avoir accès aux ressources nécessaires procurées par l'ovocyte pour subsister pendant cette longue période. Des événements cellulaires tels : la maturation de l'ovocyte, la fécondation et la décondensation de l'ADN mâle, trois divisions cellulaires et l'activation du génome embryonnaire doivent donc avoir lieu sans pratiquement aucun apport en nouveaux ARN. Cette capacité que possède l'ovule à soutenir le développement du jeune embryon

jusqu'aux stades 8- à 16-cellules grâce à ses propres réserves a été confirmée par le développement d'embryons bovins jusqu'au stade de 16 cellules en condition d'inhibition de transcription par l' α -amanitin (Barnes & First, 1991, Memili & First, 1998).

L'ovocyte bovin doit donc emmagasiner d'importantes quantités d'ARN pour subvenir aux demandes de l'embryon qui utilisera ces ressources pour assurer sa survie pendant plusieurs jours en produisant diverses protéines d'intérêt au moment opportun. Les ovocytes bovins immatures et matures contiennent environ 2 ng d'ARN total dont 53 pg et 25 pg d'ARNm polyadénylés respectivement (Lequarre *et al.*, 2004). Cette diminution de la moitié des ARNm polyadénylés durant la maturation serait en bonne partie explicable à une déadénylation globale des ARNm plutôt qu'à une dégradation de ceux-ci (Lequarre *et al.*, 2004). L'utilisation de ces ARNm emmagasinés dans l'ovocyte bovin par le jeune embryon a été démontrée par la traduction d'une multitude de nouvelles protéines tout au long du développement embryonnaire pré-MET en cultivant des embryons en présence d'inhibiteur de transcription (Massicotte *et al.*, 2006). Plusieurs gènes de provenance maternelle ont été identifiés à ce jour comme étant indispensables au développement embryonnaire chez la souris tels *Mater*, *Zar1*, *Brg1* et *Zfp3612* prouvant l'importance de l'apport maternel au développement embryonnaire (revu dans Minami *et al.*, 2007).

1.2.1.2 Masquage et entreposage d'ARNm au sein de l'ovocyte

Comme décrit précédemment dans la section portant sur la maturation ovocytaire (section 1.1.4.3.2), il existe une certaine corrélation entre la longueur de la queue poly (A) d'un ARNm et sa probabilité d'être traduit. Cependant, puisque les ARNm non traduits lors de la maturation ovocytaire sont déadénylés, l'ovocyte possède un mécanisme de protection qui empêche la dégradation de ces ARNm jusqu'à leur utilisation au moment opportun.

La méthode favorisée par l'ovocyte pour la préservation de ces ARNm est le masquage ainsi que l'entreposage de ceux-ci dans des complexes ribonucléoprotéiques (mRNPs) à l'abri des ribonucléases ou de la machinerie traductionnelle. La grenouille

(*Xenopus*) a été le modèle de prédilection pour l'étude des mRNPs et de leur impact dans la régulation de la traduction dans l'ovocyte et l'embryon. Pour une revue détaillée des diverses étapes impliquées dans la formation des mRNPs ainsi que dans les différentes protéines impliquées, veuillez vous référer à l'ouvrage de Weston et Sommerville (Weston & Sommerville, 2006).

1.2.1.2.1 Y-box protein 2 (MSY2)

Chez les ovocytes, ce sont les protéines Y-box qui représentent la majeure portion protéique des mRNPs (Darnbrough & Ford, 1981). FRGY2 est une protéine Y-box contenant un domaine « cold shock » avec deux domaines de liaison à l'ARN caractéristiques de cette famille de protéines (Bouvet *et al.*, 1995). FRGY2 est associé aux ARNm masqués dans les ovocytes de *Xenopus* et est impliqué dans le silence traductionnel de ces ARNm. FRGY2 est une composante majeure des mRNPs dans l'ovocyte de *Xenopus* démontrée par le fait qu'elle protégerait près de 80% des ARNm maternels de l'ovocyte (Bouvet & Wolffe, 1994).

MSY2 (mRNP3/4), l'orthologue de FRGY2 chez la souris, est une protéine Y-box propre aux cellules germinales (Gu *et al.*, 1998, Yu *et al.*, 2001). Chez le mâle, elle est énormément exprimée dans les spermatides ronds tandis que chez la femelle elle est perçue très tôt pendant l'ovogenèse au niveau des follicules primordiaux de souris (Gu *et al.*, 1998) et de porc (Shi *et al.*, 2007).

Chez les souris mâles, l'ARNm codant pour les protamines est emmagasiné dans un complexe ribonucléoprotéique durant 8 jours sans être traduit lors de la spermatogenèse (Davies *et al.*, 2000). MSY2 est un des constituants de ce complexe protéique impliqué dans le silence traductionnel de l'ARNm de la protamine 1 par liaison à sa région non codante (Davies *et al.*, 2000, Giorgini *et al.*, 2001). En fait, l'absence de la protéine MSY2 provoque une dégradation prématurée de plusieurs ARNm et mène à l'arrêt de la spermatogenèse (Yang J. *et al.*, 2007a). Les protéines Y-box peuvent, en plus d'inhiber la traduction, activer la transcription de gènes contenant des promoteurs avec des motifs

d'ADN Y-box (Tafuri & Wolffe, 1990, Soop *et al.*, 2003). La présence de cet élément se retrouve dans le promoteur de plusieurs protéines connues, dont la protamine 1 et 2 (Davies *et al.*, 2000). Le processus impliqué dans la liaison de MSY2 aux ARNm demeure hypothétique, mais on croit que MSY2 s'attache aux ARNm dès la transcription dans le noyau afin d'en assurer la protection et le silence traductionnel suite à son exportation dans le cytoplasme avec les ARNm ciblés (Davies *et al.*, 2000, Yang J. *et al.*, 2005a).

Si on transpose les fonctions que MSY2 possèdent dans les gamètes mâles à nos cellules d'intérêt que sont l'ovocyte et l'embryon, on peut présumer que MSY2 pourrait bien y avoir un rôle similaire. Chez la souris, MSY2 est présent en quantités importantes dans l'ovocyte, représentant 2% des protéines totales (Yu *et al.*, 2001). Cette protéine maternelle est aussi retrouvée dans l'embryon 1-cellule, tandis qu'elle devient indétectable dans les embryons 2-cellules, stade correspondant à la dégradation majeure des ARNm et à l'activation de la transcription embryonnaire chez cette espèce (Paynton *et al.*, 1988, Schultz, 1993, Yu *et al.*, 2001). La disparition de MSY2 dans les embryons 2-cellules murins consolide l'hypothèse de son implication dans la protection des ARNm maternels, puisque dès l'activation du génome embryonnaire, où MSY2 n'a plus vraiment raison d'être, on assiste à sa dégradation. La démonstration de l'importance de MSY2 dans le maintien de la stabilité des ARNm de l'ovocyte a été démontré par la réduction de MSY2 à l'aide d'ARN interférentiels (siRNA) dans l'ovocyte au cours de l'ovogenèse (Yu *et al.*, 2004). Cette réduction a eu comme conséquence d'induire une perte considérable des réserves d'ARNm dans l'ovocyte, nuisant ainsi considérablement au développement embryonnaire. La preuve que MSY2 a non seulement la capacité d'inhiber la traduction mais qu'elle peut aussi empêcher la dégradation de l'ARNm en le protégeant physiquement contre l'attaque par les RNases a été démontrée par des études *in vitro* (Matsumoto *et al.*, 2003).

MSY2 n'est pas uniformément distribué dans le cytoplasme des ovocytes murins mais semble plutôt associé au cortex de l'ovocyte, suggérant des interactions entre MSY2 et des composantes du cytosquelette (Yu *et al.*, 2001). MSY2 pourrait donc en plus de se

lier aux ARNm, assurer un lien physique entre les mRNPs et le cytosquelette comme le fait YBX1, un autre membre de cette famille (Ruzanov *et al.*, 1999).

1.2.1.2.2 CPEB, maskin et autres protéines de liaison à l'ARNm

Comme décrit précédemment, la protéine CPEB peut être impliquée dans la polyadénylation des ARNm et leur traduction tout en étant aussi responsable de leur masquage et leur inhibition de traduction. Contrairement aux protéines Y-box qui ont une forte affinité pour l'ARN sans toutefois cibler une séquence spécifique d'acides nucléiques, les CPEB interagissent avec des ARN contenant des séquences distinctives nommées les CPE. Au moins quatre CPEB ont été identifiées à ce jour chez les vertébrés et elles auraient toutes une affinité pour des séquences différentes (Mendez & Richter, 2001, Huang *et al.*, 2006). Le terme CPEB désigne la protéine originale alors que les nouvelles protéines de liaison au CPE ont été nommées CPEB2, 3 et 4. Plusieurs voies différentes de régulation impliquant les CPEB et leurs interactions avec les complexes ribonucléoprotéiques ou d'autres protéines ont été étudiées à ce jour. Une excellente revue de littérature sur le sujet a été publiée récemment (Richter, 2007).

Une voie bien connue mais toute de même controversée de l'action de CPEB passe par son interaction avec la protéine maskin (Stebbins-Boaz *et al.*, 1999). La maskin rivalise avec eIF4G pour la liaison à eIF4E, un facteur d'initiation de la liaison du ribosome à l'extrémité 5' de l'ARNm, afin d'inhiber la traduction (revu dans Mendez & Richter, 2001). Lorsque la maskin est liée à eIF4E, la sous-unité 40S du ribosome n'est pas recrutée et la traduction de l'ARNm est réduite (Figure 1.2). En plus d'empêcher la liaison du ribosome, cette conformation circulaire de l'ARNm pourrait réduire l'exposition de ses extrémités aux enzymes exoribonucléases et ainsi garantir sa protection contre la dégradation. Lorsque le temps est venu pour l'ARNm d'être traduit, la phosphorylation de CPEB réduit l'affinité de la maskin pour eIF4E et du même coup augmente son affinité pour CPSF afin d'induire l'allongement de la queue poly (A) et promouvoir l'initiation de la traduction via l'action des poly (A) binding proteins (PABPs) et d'eIF4G (Figure 1.2).

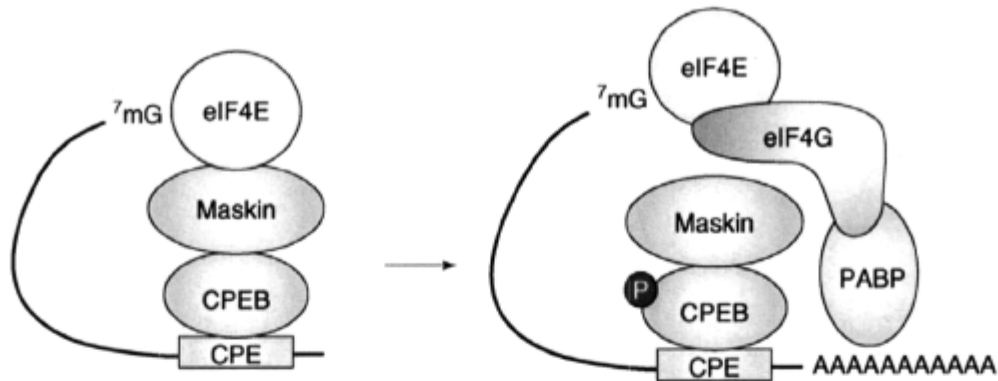


Figure 1.2. Masquage et démasquage des ARNm via l'interaction de CPEB avec la maskin (Reproduit avec permission (Richter, 2007)).

1.2.1.2.3 Le contrôle de la traduction par les miRNA

La découverte d'une toute nouvelle voie de régulation de la traduction des ARNm par l'action de microARNs (miRNA) a vu le jour récemment. Ce domaine de recherche est en pleine effervescence et une multitude de revues de littérature récentes expliquant l'action des miRNA et leur implication très importante au cours du développement sont disponibles (Lee *et al.*, 2006, Zhao & Srivastava, 2007). Ces miRNA sont synthétisés sous forme de précurseurs par l'ARN polymérase II et sont clivés en séquences de 21 à 24 nucléotides. Ces courtes séquences régulent la traduction de 2 façons : i) en dégradant l'ARNm lors d'une hybridation homologue à 100% de leur séquence à la séquence de l'ARNm ciblé ou ii) en inhibant la traduction lors de sa liaison, avec certaines erreurs d'homologie, à la séquence 3' non codante d'un ARNm. Des centaines de miRNA ont été identifiés à ce jour et un exemple flagrant de la diversité de ces séquences est la récente détection dans l'ovaire de souris de plus de 200 courts ARN différents dont 122 sont des miRNA (Ro *et al.*, 2007). En fait, les gènes encodant des miRNA représenteraient de 1 à 3 % de tous les gènes transcrits par l'ARN polymérase II (Giraldez *et al.*, 2006).

Bien que quelques centaines de miRNA différents aient été identifiés, leur action pourrait être ressentie sur des milliers d'ARNm différents. En effet, il a été démontré par analyses informatiques qu'un seul miRNA pouvait avoir comme cible de 100 à 200 ARNm distincts avec différents degrés d'homologie. Une étude récente a mis en évidence

l'importance du miRNA MiR-430, transcrit lors de l'activation du génome embryonnaire chez le poisson zébré, dans le bon développement des embryons (Giraldez *et al.*, 2006). Dans cette étude ils ont établi que MiR-430 est un miRNA très fortement exprimé dans l'embryon de poisson zébré et aurait une action sur plusieurs centaines de transcrits maternels. MiR-430 a démontré un effet inhibiteur très marqué sur la traduction des ARNm suite à leur déadénylation. MiR-430 induirait la dégradation de plusieurs de ces ARNm en concomitance avec l'activation de la transcription embryonnaire chez cette espèce, suggérant une certaine nécessité de dégrader les stocks d'ARNm maternels avant de passer à la production des nouveaux ARNm embryonnaires.

En conclusion, cette grande diversité présente chez les miRNA, leur différentes possibilités d'action et leurs interactions avec divers protéines de complexes ribonucléoprotéiques (ex.: CPEB) (revu dans Richter, 2007) illustrent bien les possibilités innombrables de modes de régulation de la traduction d'ARNm à des moments précis au cours du développement embryonnaire.

1.2.2 La transcription chez l'embryon bovin

Initialement, il fut établi que le très jeune embryon bovin était une entité silencieuse au point de vue transcriptionnel pendant ses premiers cycles cellulaires (revu dans Memili & First, 2000). En effet, comme décrit plus tôt, dès la fin de l'ovogenèse, la transcription chez l'ovocyte diminue considérablement pour cesser complètement dès la condensation des chromosomes lors de la reprise méiotique. Les conclusions de plusieurs études ont longtemps laissé à croire que l'ovocyte mature et le jeune embryon formé suite à la fécondation ne synthétisent pas de nouveaux ARN et ce, jusqu'au stades embryonnaires 8- à 16-cellules, période où la transition maternelle embryonnaire est détectée chez le bovin (Camous *et al.*, 1986, King *et al.*, 1988, Frei *et al.*, 1989, Kopecny *et al.*, 1989, Telford *et al.*, 1990, Hyttel *et al.*, 2000, Laurincik *et al.*, 2003, Misirlioglu *et al.*, 2006).

Quelques études subséquentes ont toutefois remis en question cette inactivation de la transcription au cours des premiers stades embryonnaires bovins. Ces dernières ont

démontré une certaine synthèse d'ARN dans les embryons 2- et 4-cellules bovins, bien que ce niveau de transcription soit très faible en comparaison au niveau détecté aux stades 8- et 16-cellules (Barnes & First, 1991, Plante *et al.*, 1994, Hyttel *et al.*, 1996, Lavoit *et al.*, 1997, Memili *et al.*, 1998a).

1.2.2.1 La transition maternelle embryonnaire (MET)

La transition maternelle embryonnaire (MET) se définit comme le moment où la transcription embryonnaire est activée et où les ARNm d'origine maternelle présents dans l'embryon sont renouvelés par une nouvelle population d'ARNm cette fois de provenance embryonnaire (Figure 1.3). La nomenclature utilisée pour désigner cette période importante du développement embryonnaire est très variée puisque qu'elle survient dans une panoplie d'espèces et à différents stades cellulaires. Certains utilisent le terme MBT (Mid-Blastula Transition), MZT (Maternal to Zygotic Transition), EGA (Embryonic Genome Activation), ZGA (Zygotic Genome Activation) ou encore MET (Maternal to Embryonic Transition). Le terme MET sera celui utilisé dans cette ouvrage puisqu'il est applicable à toutes les espèces, contrairement à MZT ou ZGA qui sont plus appropriés pour la souris ou à MBT qui fait plutôt référence à la drosophile et à la grenouille (*Xenopus*).

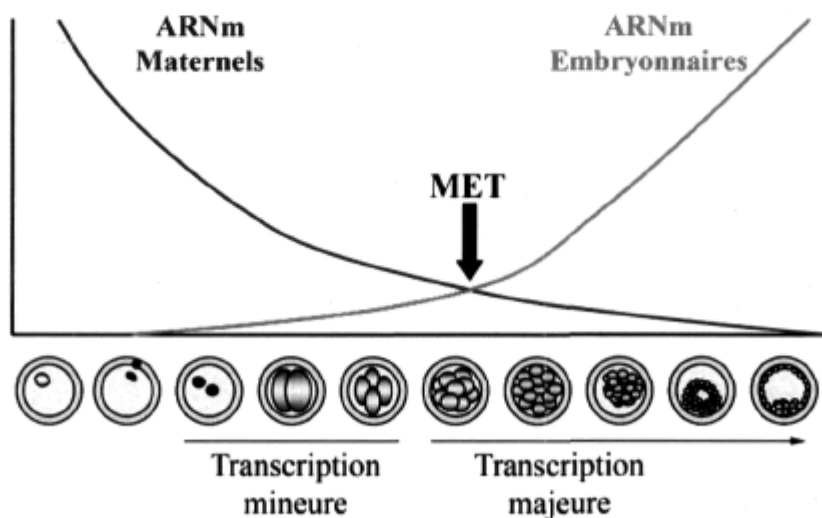


Figure 1.3. Schéma illustrant les niveaux d'ARNm maternels et embryonnaires en relation avec le développement embryonnaire bovin (adapté de Sirard *et al.*, 2003).

1.2.2.2 Comparaisons inter-espèces du moment où se produit la MET

Comme il a été décrit brièvement dans la section 1.1.5.2, les premiers stades du développement embryonnaires sont assez particuliers. En effet, chez *Xenopus* par exemple, une fois l'ovocyte fécondé, il s'ensuit onze divisions cellulaires très rapides composées de phases S et M successives sans jamais donner lieu à de réelles phases G1 ou G2 (Newport & Kirschner, 1982a, b). Conséquemment la transcription est éteinte dans l'embryon de *Xenopus* au cours de ces onze premières divisions embryonnaires, ce qui mène à la formation d'un embryon composé d'environ 4000 cellules qui n'a encore reçu aucun apport en nouveaux ARN. Ce n'est qu'au cours du 12^e cycle cellulaire que l'embryon entreprend ses premières vraies phases G1 et G2 et que la transcription embryonnaire est activée.

Chez la drosophile, un certain délai entre la fécondation et l'activation de la transcription est aussi observé. En effet, l'explosion de la transcription chez l'embryon de drosophile se produit au cours du 14^e cycle cellulaire, au même moment que les premières phases G1 et G2 sont détectées comme chez le bovin et la grenouille (McKnight & Miller, 1976).

Ce délai entre la fécondation et l'activation de la transcription embryonnaire observé chez le bovin, *Xenopus* et la drosophile a aussi été détecté chez tous les mammifères étudiés jusqu'à présent. La durée de ce délai est cependant spécifique à chaque espèce (revu dans Telford *et al.*, 1990). Chez la souris par exemple, qui est le mammifère le plus étudié au niveau de la MET, l'activation majeure de la transcription se produit au stade 2-cellules (Nothias *et al.*, 1995) alors que chez l'humain, la MET a lieu aux stades embryonnaires 4- à 8-cellules. Finalement, chez le cochon, le mouton et le lapin, cet événement se produit respectivement aux stades 4-, 8- et 16-cellules et tout comme chez *Xenopus*, cela coïncide avec l'allongement du cycle cellulaire (revu dans Telford *et al.*, 1990).

1.2.2.3 La transcription hâtive chez l'embryon pré-MET

Un aspect particulier de la MET a été observé chez tous les métazoaires étudiés. Il s'agit de la détection d'une certaine transcription avant la MET, mais à des niveaux très inférieurs (revu dans Memili & First, 2000). Cette transcription mineure détectée avant le stade 8-cellules chez le bovin ne fait donc pas exception à la règle. Chez la souris, cette transcription hâtive se produit principalement dans le pronoyau mâle du zygote avant même le premier clivage de l'embryon et génère environ 20% de l'activité transcriptionnelle détectable dans le 2-cellules (Aoki *et al.*, 1997).

Chez la drosophile, cette transcription mineure peut être détectée à partir de la 10^e division embryonnaire alors que ce n'est qu'à partir de la 14^e que l'initiation de la transcription majeure a été établie (Edgar & Schubiger, 1986). La même situation se produit chez *Xenopus* alors qu'un très faible niveau de transcription est perceptible suite à la sixième division embryonnaire (Kimelman *et al.*, 1987). Ces études démontrent bien une certaine conservation dans l'établissement de l'activation du génome embryonnaire chez les métazoaires où même si les stades embryonnaires impliqués diffèrent, on discerne toujours un début de transcription mineure suivit par l'activation majeure du génome embryonnaire (MET).

1.3 LA RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION

La MET est donc un processus très important pour le jeune embryon au cours duquel il doit produire de nouveaux ARN afin de supporter son développement présent et futur. Trois différentes ARN polymérases sont impliquées dans la transcription chez les eucaryotes: les ARN polymérases I, II ainsi que III et elles sont respectivement responsable de la transcription des ARN ribosomiaux (ARNr), des ARN messagers (ARNm) et des ARN de transfert (ARNt). La transcription par la RNA polymérase II (RNPII), responsable de la production de nouveaux ARNm lors de l'activation du génome embryonnaire, découle d'une régulation très complexe qui sera abordée dans les prochaines sections de ce chapitre.

1.3.1 Les régions régulatrices de la transcription

1.3.1.1 Le promoteur central (Core Promoter)

Chez les eucaryotes, les gènes sont composés de plusieurs régions régulatrices qui favorisent leur expression au moment opportun. La région primordiale dans la régulation de la transcription des gènes codant pour des protéines (gènes transcrits par l'ARN polymérase II) est sans l'ombre d'un doute le promoteur central. Ce dernier comporte plusieurs éléments clés (Smale & Kadonaga, 2003, Sandelin *et al.*, 2007). Le promoteur central couvre une région d'environ 50 nucléotides en amont et en aval du site d'initiation de la transcription et est composé de quatre principaux motifs : la boîte TATA (TATA-box), l'élément initiateur (Inr), l'élément promoteur en aval (DPE pour Downstream Promoter Element) et l'élément reconnu par TFIIB (BRE) (Figure 1.4).

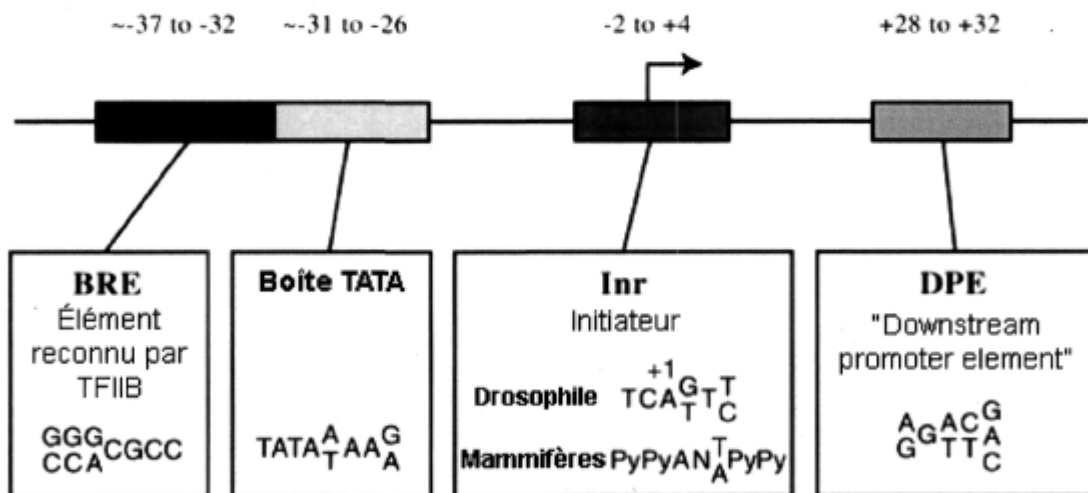


Figure 1.4 Structure d'un promoteur central typique et disposition de ses éléments généraux (Reproduit avec permission (Smale & Kadonaga, 2003)).

La boîte TATA a été le premier élément de régulation à être caractérisé à l'intérieur des promoteurs eucaryotes. Cet élément est reconnu par la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP). TBP est la protéine au cœur du complexe protéique TFIID qui est impliqué dans l'initiation de la transcription d'une multitude de gènes eucaryotes. La boîte TATA se

situe généralement à environ 30 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. De récentes études ont toutefois démontré que, contrairement à ce qui est classiquement enseigné, la séquence consensus TATAAA de la boîte TATA ne serait présente que dans 10 à 33% des promoteurs chez l'humain (Suzuki *et al.*, 2001, Gershenzon & Ioshikhes, 2005, Cooper *et al.*, 2006).

Le deuxième élément général du promoteur central est l'Inr. L'initiateur est une région riche en bases pyrimidines couvrant le site d'initiation de la transcription. L'Inr peut agir de manière synergique avec la boîte TATA ou seul en absence de cette dernière.

Le DPE (« Downstream Promoter Element ») comme le dicte son nom se retrouve en aval du site d'initiation de la transcription, à environ 28 à 32 nucléotides de ce dernier. Le DPE est majoritairement présent lors de l'absence de la boîte TATA, bien que les 2 motifs peuvent être retrouvés dans un certain nombre de promoteurs (Kutach & Kadonaga, 2000). Le complexe TFIID, contenant la protéine TBP, pourrait lier le DPE en synergie avec l'Inr pour initier la transcription en absence de boîte TATA.

Le dernier élément commun des promoteurs centraux est le BRE. Ce motif d'ADN reconnu par TFIIB se retrouve principalement dans les promoteurs à boîte TATA, directement en amont de celle-ci, et aurait une incidence sur la stimulation de la transcription par synergie avec TBP et la boîte TATA via des mécanismes encore mal caractérisés (Smale & Kadonaga, 2003).

1.3.1.2 Le promoteur proximal

Le promoteur proximal, désigne la région adjacente au promoteur central dans laquelle se retrouvent plusieurs éléments de liaison pour divers facteurs de transcription souvent plus spécifiques aux tissus. Cette région est généralement en amont du promoteur central bien que dans certains cas elle peut aussi déborder en aval du site d'initiation de la transcription. La longueur typique d'un promoteur proximal est assez subjective et difficile à établir car elle peut varier selon les gènes mais en général, elle se compose de quelques

centaines de nucléotides (Butler & Kadonaga, 2002, Heintzman & Ren, 2007). Ce sont ces éléments qui sont en général responsables de l'expression spécifiques aux tissus des gènes suite à leur liaison par une combinaison de facteurs de transcription spécifiquement exprimés dans un type cellulaire précis.

1.3.1.3 Les îlots CpG

Un autre élément qui caractérise les promoteurs eucaryotes est la présence d'une concentration accrue de dinucléotides cytosine-guanine. Les régions de 0.5 à 2 kb riches en ces dinucléotides sont appelés îlots CpG et se retrouvent dans plus de la moitié des promoteurs de gènes transcrits par l'ARN polymérase II (revu dans Antequera, 2003). La prévalence des îlots CpG est prononcée dans les promoteurs de gènes contenant peu ou pas d'éléments du promoteur proximal décrits dans la section précédente. Les gènes ubiquitairement exprimés (housekeeping) contiennent tous des promoteurs à îlots CpG (Gardiner-Garden & Frommer, 1987). En raison de leur composition, ces régions riches en CpG contiennent habituellement plusieurs boîtes GC qui sont des éléments de liaison potentiels pour le facteur de transcription SP1 qui dirige l'initiation de la transcription en l'absence des motifs de régulation communs comme la boîte TATA (Blake *et al.*, 1990).

Les cytosines des dinucléotides CpG peuvent être méthylés par des enzymes 5-cytosine-méthyltransférases à ADN (DNMT) (Chen & Li, 2006). Généralement, cette méthylation du promoteur est associée avec une inhibition de la transcription (revu dans Serman *et al.*, 2006). Les promoteurs des gènes housekeeping sont toutefois protégés de cette méthylation par la liaison du facteur de transcription SP1 et conservent donc leur expression tout au cours du développement (Brandeis *et al.*, 1994).

Cette méthylation des bases cytosines, présentes dans les îlots CpG des promoteurs eucaryotes, est une méthode déployée par la cellule pour inactiver l'expression de certains gènes lors de la différenciation terminale des cellules ou pour éteindre l'expression de certains gènes spécifiques aux cellules germinales dans les cellules somatiques comme dans le cas du facteur de transcription Oct-4 (Gu *et al.*, 2006, Weber *et al.*, 2007).

1.3.1.4 Les promoteurs distaux (enhancers)

La régulation de la transcription se produit via l'action d'un autre type de région régulatrice : les enhancers. Les enhancers sont des régions d'ADN contenant des motifs qui représentent des éléments de liaison pour des facteurs ou coactivateurs de transcription ce qui a comme résultante d'intensifier fortement l'expression des gènes, surtout dans le cas des gènes ayant un promoteur faible (Muller & Schaffner, 1990, Blackwood & Kadonaga, 1998, Bulger & Groudine, 1999). Ces promoteurs distaux peuvent tout aussi bien se situer en amont ou en aval du promoteur central et peuvent se nicher à des distances aussi grandes que plusieurs dizaines de kilobases du site d'initiation de la transcription. En fait, certains enhancers sont situés à des distances phénoménales comme dans le cas du gène *Shh* dont l'expression est modulée par un enhancer situé à environ 1 Mb du gène *Shh* (Lettice *et al.*, 2002). De manière encore plus déconcertante, certains coactivateurs de transcription comme l'élément GAGA, peuvent même moduler l'expression d'un gène via sa liaison à un enhancer situé sur un autre chromosome (Mahmoudi *et al.*, 2002, de Laat & Grosveld, 2007). L'effet des enhancers découle entre autre de l'action du complexe médiateur qui relie les activateurs de transcriptions liés à la séquence enhancer aux facteurs généraux de transcription via le repliement de la région chromosomique (Figure 1.5). Le complexe ainsi formé porte le nom d' « enhanceosome ».

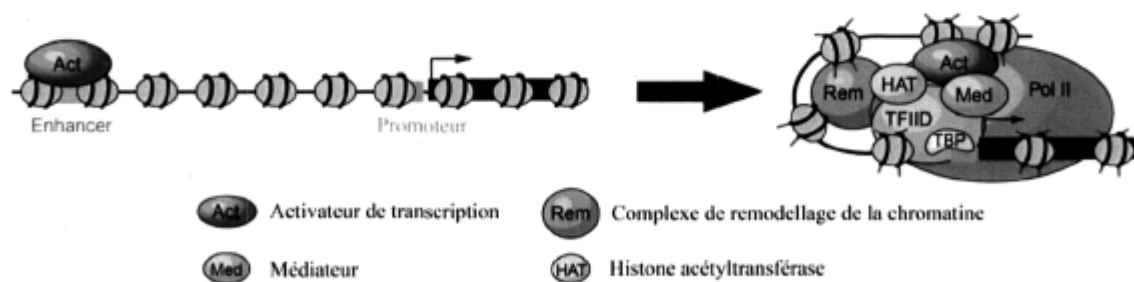


Figure 1.5. Formation de l'enhanceosome par la liaison entre un enhancer et le promoteur proximal via le médiateur (Reproduit avec permission (Szutorisz *et al.*, 2005)).

Le médiateur est un énorme complexe contenant de 28 à 30 sous unités protéiques connues à ce jour. Le médiateur a un rôle majeur à jouer dans la transcription génique

activée, c'est-à-dire dans la transcription accrue dirigée par un enhancer (revu dans Malik & Roeder, 2005). Le médiateur n'a aucun domaine de liaison à l'ADN mais il se lie à des activateurs de transcription liés à des enhancers et cette liaison mène au recrutement de la RNPII par le médiateur à la région promotrice du gène. Cette action portée par le médiateur a donc comme effet bénéfique de favoriser l'augmentation de l'efficacité du recrutement de la RNPII au promoteur central et ainsi, d'intensifier le degré de transcription du gène en question (Figure 1.6).

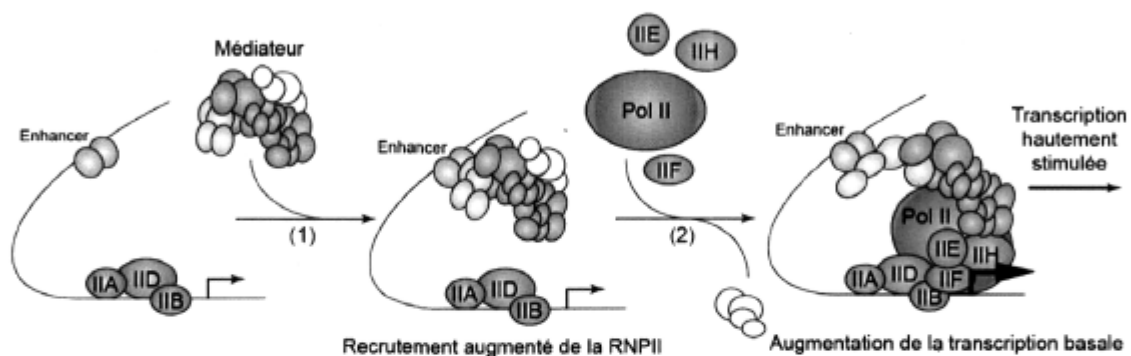


Figure 1.6. Recrutement de la RNPII et des GTF par la liaison du médiateur à des activateurs de transcription liés à un enhancer (Reproduit avec permission (Malik & Roeder, 2005)).

1.3.2 La machinerie transcriptionnelle basale

Bien que les facteurs ou activateurs de transcription soient indispensables dans l'expression différentielle de certains gènes en réponse à divers stimuli ou dans la différenciation cellulaire par leur liaison à certains éléments du promoteur proximal ou des enhancers, leur action doit obligatoirement passer par les facteurs de transcription généraux (GTFs). Ce sont ces facteurs généraux de transcription qui sont à l'origine du recrutement de l'enzyme responsable de la transcription des ARNm ou des miRNA (Lee *et al.*, 2004): la RNA polymérase II.

1.3.2.1 Le complexe de pré-initiation (PIC) et l'initiation de la transcription

Pour une initiation efficace de la transcription, un prérequis indispensable est la formation du complexe de pré-initiation (PIC) qui est composé des GTFs et de l'ARN polymérase II (Thomas & Chiang, 2006). Les GTFs au cœur de l'assemblage du PIC (TFIIA, B, D, E, F et H) sont énumérés dans la Tableau 1.1.

Tableau 1.1. Composantes de la machinerie transcriptionnelle de base chez l'humain.

Facteur	Nombre de sous-unités	Fonctions
TFIIA	3	Stabilise TBP/boîte TATA, coactivateur
TFIIB	1	Stabilise TBP/boîte TATA, recrutement RNPII/TFIIF, liaison au promoteur (BRE)
TFIID	15	Liaison au promoteur (Boîte TATA et/ou DPE), coactivateur, protéine kinase, histone acétyltransférase
TFIIF	2	Liaison à la RNPII et recrutement de la RNPII au promoteur, recrutement de TFIIE et TFIIF, participe à l'élongation de la RNPII
TFIIE	2	Recrutement de TFIIE, impliqué dans l'évacuation du site d'initiation de la transcription
TFIIH	10	Initiation de la transcription par activité ATPase, ouverture du promoteur par activité hélicase, phosphorylation du domaine C terminal (CTD) de la RNPII, réparation de l'ADN couplé à la transcription
Médiateur	28-30	Lie la RNPII pour activer la transcription basale ou activée par enhancers, cible de régulateurs de transcription, activité kinase et acétyltransférase
RNPII	12	Enzyme responsable de l'initiation, de l'élongation et de la terminaison de la transcription, recrutement des enzymes pour le « capping » des ARNm, recrutement des facteurs d'épissage et de traitement des extrémités 3', phosphorylation, ubiquitination et glycosylation du CTD

Inspiré de (Hahn, 2004, Malik & Roeder, 2005, Thomas & Chiang, 2006)

Typiquement, l'assemblage du PIC (revu dans Thomas & Chiang, 2006) débute par la liaison de TBP, une sous-unité de TFIID, à la boîte TATA du promoteur central. La liaison de TBP à l'ADN induit un grand repli de la structure de cette dernière au site de liaison (Tolic-Norrelykke *et al.*, 2006). TFIIA et TFIIB sont ensuite recrutés par TFIID et ce premier complexe stabilise la liaison de TFIID à l'ADN. Cette stabilité peut être accrue lors de la présence d'un élément BRE par la liaison de TFIIB à ce dernier. L'assemblage de ces trois facteurs (TFIIA, TFIIB et TFIID) permet l'ancrage du complexe préformé de l'ARN polymérase avec TFIIF et l'arrivée de TFIIE et TFIIH s'ensuit (Figure 1.7).

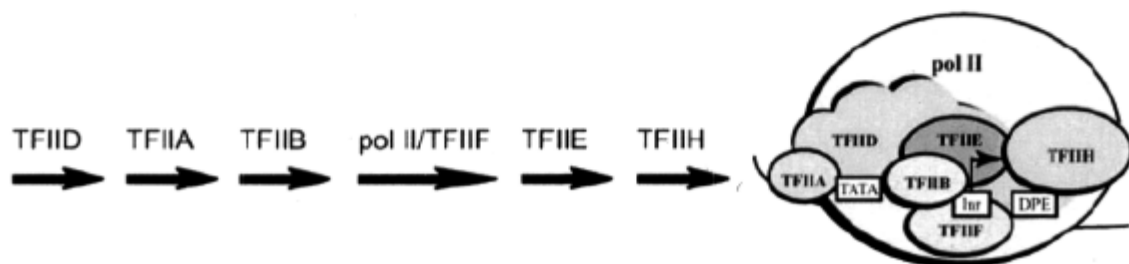


Figure 1.7. Déroulement de l'assemblage séquentiel du PIC (Reproduit avec permission (Thomas & Chiang, 2006)).

Alors que les premiers GTF qui forment le PIC servent en grande partie à stabiliser le complexe, TFIIE de son côté entame l'ouverture du promoteur et active TFIIH. Une fonction majeure de TFIIH est de phosphoryler le domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II, ce qui a comme effet d'activer cette enzyme (Lee *et al.*, 2004). Du même coup, TFIIH avec son activité hélicase rend disponible la région promotrice en aval du site d'initiation de la transcription en séparant les deux brins d'ADN (revu dans Woychik & Hampsey, 2002). Cette séparation de la structure double-brin de l'ADN est indispensable à l'initiation de la transcription et à son élongation. Ces fonctions de TFIIH permettent donc à l'ARN polymérase II de se séparer du PIC et du promoteur et d'initier la transcription.

Une deuxième voie d'assemblage du PIC passe par une cascade d'événements complètement différente de celle décrite précédemment. Cet assemblage survient par

l'élaboration de l'holoenzyme RNPII préalablement à la liaison au promoteur. Contrairement à l'assemblage séquentiel (Figure 1.7), l'ARN polymérase II se lie aux autres GTF, sauf TFIID et TFIIA, ainsi qu'à d'autres facteurs de transcription pour former un complexe de pré-assemblage désigné comme l'holoenzyme RNPII (Thomas & Chiang, 2006). RNPII est ensuite recruté au site d'initiation suivant la liaison préalable de TFIID au promoteur central (Figure 1.8) (Thomas & Chiang, 2006).

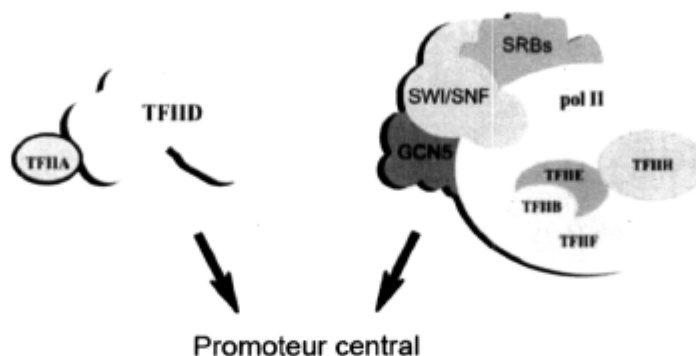


Figure 1.8. Formation du PIC par le recrutement de l'ARN polymérase II holoenzyme au promoteur central par TFIID (Reproduit avec permission (Thomas & Chiang, 2006)).

1.3.2.2 La sous unité carboxy-terminale de l'ARN polymérase II (CTD)

L'ARN polymérase II est un complexe de 12 sous-unités protéiques qui est au cœur de l'holoenzyme RNPII. L'extrémité C-terminale de la plus grosse sous-unité de la RNPII est définie par le terme CTD et est une région régulatrice extrêmement importante pour l'activité transcriptionnelle de la RNPII (revu dans Meinhart *et al.*, 2005). L'état de phosphorylation de la CTD de la RNPII est un bon indicateur de son activité transcriptionnelle. En effet, alors qu'une hypophosphorylation de la CTD induit généralement la liaison de la RNPII au promoteur et la formation du PIC, une hyperphosphorylation de la CTD va de son côté provoquer la libération de la RNPII du PIC et l'élongation de la transcription (revu dans Hahn, 2004). La CTD humaine est composée de 52 répétitions en tandem de l'hexapeptide YSPTSPS. Ce sont les sérines (S) 2 et 5 qui sont phosphorylées pour moduler l'activité de la RNPII et l'effet varie selon le résidu phosphorylé. La phosphorylation unique des sérines 5 joue un rôle dans l'initiation de la transcription, alors que la phosphorylation additionnelle des sérines 2 favorise l'élongation

de la transcription et participe à la modification des ARNm à mesure qu'ils sont transcrits en recrutant des facteurs d'épissage ou de polyadénylation au site de transcription (revu dans Hahn, 2004).

1.3.2.3 L'élongation de la transcription et l'ARN polymérase II

Sachant que l'ARN polymérase II doit faire un bon bout de chemin lors de la transcription, souvent sur plusieurs kilobases, il faut que la chromatine soit décondensée sur toute cette longueur pour lui permettre de faire son travail. C'est pourquoi certaines protéines appelées facteurs d'élongation, comme par exemple FACT, s'associent à l'ARN polymérase II pour modifier la structure des nucléosomes au cours de la transcription. FACT agit en retirant les histones H2A et H2B des nucléosomes, ce qui relaxe grandement la structure de l'ADN pendant le processus de la transcription. (Belotserkovskaya *et al.*, 2003). D'autres protéines à activités hélicase sont aussi impliquées dans la décondensation de l'ADN comme c'est le cas pour le GTF TFIIF. Finalement, des histones acétyltransférases sont aussi associées à la polymérase afin d'acétyler les histones composants les nucléosomes de la région transcrite et ainsi décompacter ces nucléosomes pour favoriser une transcription plus efficace (détaillé dans la section suivante) (Orphanides & Reinberg, 2002). Tous ces facteurs sont souvent recrutés au site de transcription par des complexes de protéines d'échafaudage comme par exemple le médiateur.

1.3.3 Régulation de la transcription par les histones et le nucléosome

Sur les 35 000 à 50 000 gènes estimés chez l'humain, on croit que plus de 5% coderaient pour des facteurs de transcription (revu dans Orphanides & Reinberg, 2002). Cela démontre bien l'importance de ces protéines dont la fonction est de promouvoir l'expression spatio-temporelle des gènes. Cependant, tous les facteurs de transcription n'ont pas comme seule fonction de se lier aux éléments promotrices ou aux enhanceurs afin de recruter ultimement la RNPII. Afin d'assurer leur activité, plusieurs activateurs de transcription utilisent des liaisons protéine-protéine pour agir au site de transcription et ce, sans passer par la liaison directe à l'ADN.

L'action de ces facteurs de transcription dans l'activation de la transcription passe principalement dans la modification de la chromatine ou des nucléosomes, soit pour favoriser la formation du PIC ou pour favoriser l'élongation de la transcription dans un contexte de chromatine décondensée. Ce rôle est fondamental puisqu'une chromatine compacte est très peu propice à la transcription. La chromatine se définit comme un agencement d'ADN avec diverses protéines dont la majorité sont des histones (revu dans Marmorstein, 2001). Le nucléosome est une entité ADN-histones retrouvée dans le noyau et est constitué d'environ 146 pb d'ADN enroulé autour d'un noyau particulaire d'histones composé d'un octamère d'histones (2 H2A, 2 H2B, 2 H3 et 2 H4). Les queues N-terminales des histones nucléosomales sont basiques et chargées positivement, ce qui leur permet d'interagir assez fortement avec l'ADN, puisque celui-ci est acide et chargé négativement. Les nucléosomes sont stabilisés par la liaison de l'histone H1 à l'ADN de liaison reliant chaque nucléosome afin de former une chromatine plus compacte (Robinson & Rhodes, 2006). En regroupant les nucléosomes dans une configuration encore plus compacte, les histones H1 ont donc un certain rôle inhibiteur de la transcription et leur remaniement est impliqué dans l'activation de la transcription (revu dans Bustin *et al.*, 2005). La chromatine subit des étapes subséquentes de compaction jusqu'à l'atteinte du degré de compaction ultime, retrouvé dans le chromosome mitotique (Figure 1.9). Avec de tels degrés de condensation possibles, l'accès de la RNPII à l'ADN peut être fortement compromis, démontrant ainsi l'importance des régulateurs de condensation de la chromatine lors de la transcription.

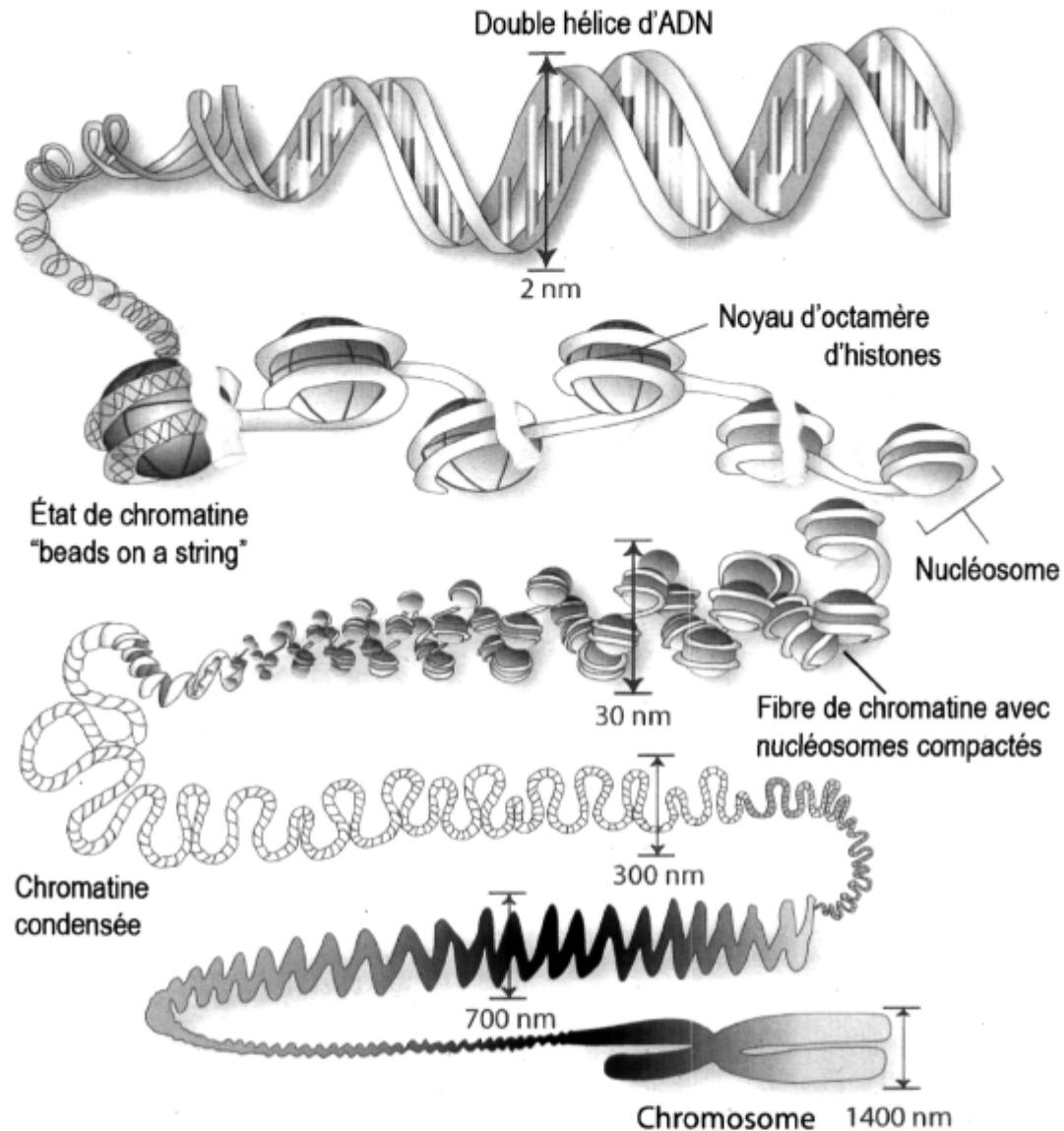


Figure 1.9. Illustration des différents degrés de compaction de la chromatine (adapté de (www.epitron.eu)).

Les queues N-terminales des histones du nucléosome possèdent de multiples cibles pour des modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, la méthylation ou la phosphorylation qui affectent leur stabilité et jouent ainsi sur le degré de condensation de la chromatine (Figure 1.10) (revu dans Lacoste & Cote, 2003).

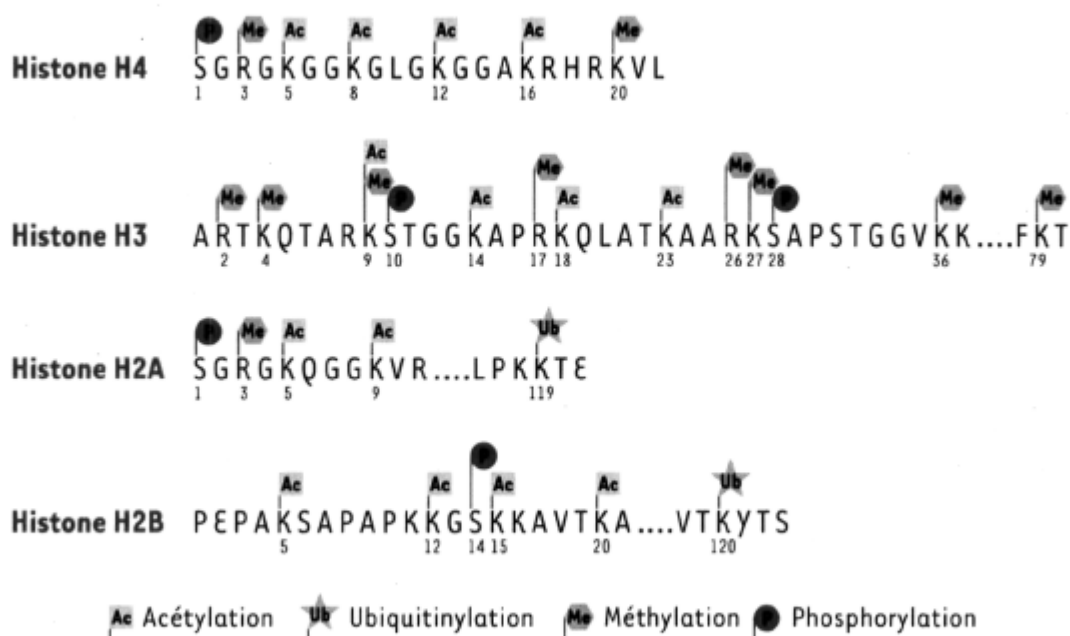


Figure 1.10. Modifications possibles des histones composant le nucléosome (Reproduit avec permission (Lacoste & Cote, 2003)).

Par exemple, l'acétylation des histones a comme conséquence de modifier la charge nette des queues d'histones et ainsi, ces portions protéiques s'éloignent de l'ADN par répulsion des charges (Figure 1.11) (revu dans Marmorstein, 2001).

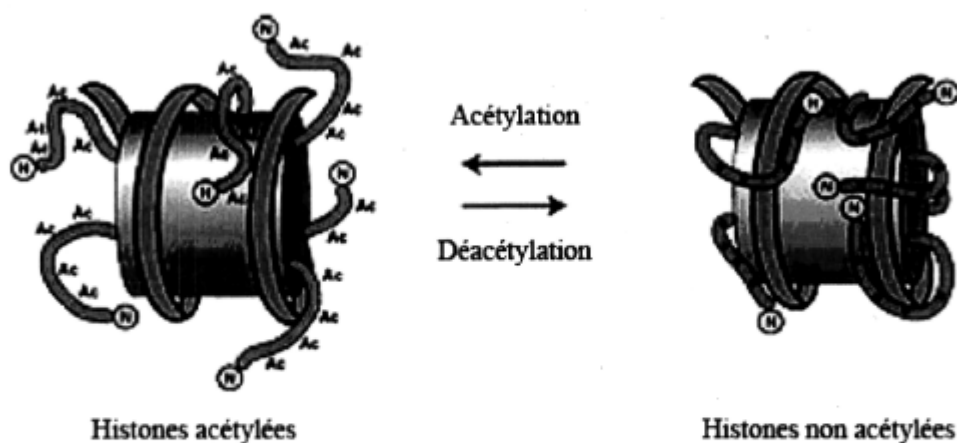


Figure 1.11. Acétylation des queues d'histones et relaxation de la structure nucléosomale (Reproduit avec permission (Hassig & Schreiber, 1997)).

Ces modifications post-traductionnelles peuvent aussi induire des changements conformationnels de la chromatine en modifiant fortement les noyaux particuliers d'histones ou en déplaçant les nucléosomes (Marmorstein, 2001, Narlikar *et al.*, 2002). Pour réussir ce tour de force, les facteurs de transcription doivent bien souvent compter sur l'aide de plusieurs coactivateurs de transcription, qui sont aussi des facteurs de transcription. Ces coactivateurs vont habituellement se lier à des facteurs de transcription déjà fixés au promoteur plutôt que directement se lier à l'ADN. Ces mêmes coactivateurs sont surtout impliqués dans l'apport de modifications post-traductionnelles sur certains facteurs de transcription afin de les activer ou parfois de les rendre silencieux. Une modification post-traductionnelle très fréquente appliquée aux facteurs de transcription est la phosphorylation, mais l'acétylation, la méthylation ou même la sumoylation de certains autres facteurs de transcription jouent aussi un rôle crucial afin de les activer ou les inactiver (revu dans Narlikar *et al.*, 2002). Une fois activés, ces facteurs vont à leur tour recruter des facteurs de transcription de base ou d'autres complexes de remodelage de la chromatine, qui ultérieurement donneront accès à la machinerie transcriptionnelle au site de transcription (Figure 1.12)

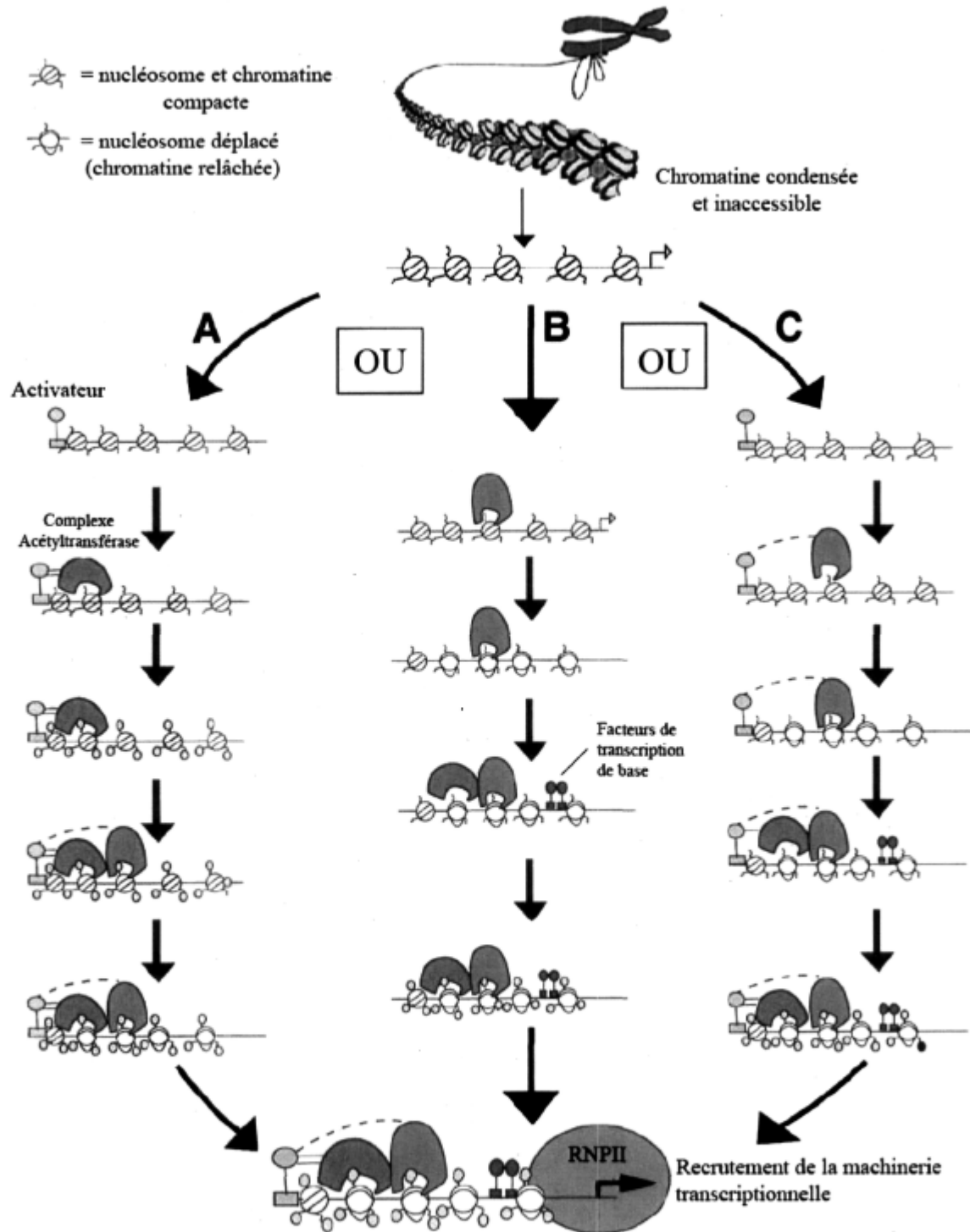


Figure 1.12. Illustration des différentes voies utilisées par les complexes à activité histone acétyltransférase et des complexes de remodelage de la chromatine dans l'activation de la transcription (Reproduit avec permission (Narlikar *et al.*, 2002)).

Parmi les multiples modifications administrées aux queues N-terminales des histones afin de moduler l'activité transcriptionnelle via la déstabilisation du nucléosome, l'acétylation est celle qui est vue comme la plus impliquée dans la régulation de la transcription. Il y a une très forte corrélation entre l'hyperacétylation des histones et l'activation de la transcription ainsi qu'entre l'hypoacétylation des histones et la répression de la transcription (Hassig & Schreiber, 1997, Marmorstein, 2001). Plusieurs enzymes peuvent influencer le degré d'acétylation des histones. Une catégorie d'enzymes, les histones déacétylases (HDAC), sont impliquées dans le retraitement des groupements acétyls présents sur les queues d'histones afin de former un état de chromatine transcriptionnellement inactif et condensé (Hassig & Schreiber, 1997). L'autre classe d'enzymes comprend la famille des histones acétyltransférases (HAT). Cette famille regroupe une multitude de protéines capables d'ajouter des groupements acétyls aux queues d'histones afin de favoriser la transcription (Hassig & Schreiber, 1997). Plusieurs de ces enzymes sont à la base, des cofacteurs de transcription, c'est-à-dire qu'ils ont été initialement identifiés par leurs interactions avec d'autres facteurs de transcriptions ou avec l'ARN polymérase. Ce n'est que plus tard que leur fonction d'acétyltransférase a été découverte, comme ce fut le cas par exemple pour GCN5, p300 et CBP (revu dans Marmorstein, 2001).

Ainsi, il est clair que les histones ne sont pas seulement présentes sur la chromatine pour jouer un rôle structural en compactant l'ADN, puisqu'elles agissent aussi à divers niveaux pour réguler la transcription. Pour que la chromatine soit permissive du point de vue transcriptionnel, plusieurs protéines doivent donc agir à différents niveaux en conjonction avec la machinerie transcriptionnelle de base et l'ARN polymérase II. Un bel exemple illustrant cette coopération est la liaison de l'acétyltransférase p300 au site d'initiation de la transcription par sa liaison au médiateur (Black *et al.*, 2006). Cette présence de p300 provoque donc l'acétylation des histones nucléosomales et ainsi, favorise l'initiation de la transcription. Afin d'augmenter son activité, p300 doit être acétylé, soit par lui-même ou par son interaction avec d'autres facteurs protéiques avoisinants (Thompson *et al.*, 2004, Pugh, 2006). Ce procédé démontre bien l'importance de

l'association d'une multitude de facteurs de transcription simultanément afin de constituer une machinerie transcriptionnelle d'efficacité plus ou moins grande selon le besoin.

1.3.3.4 La matrice nucléaire et son importance dans la régulation de la transcription

Les sections précédentes démontrent bien l'existence de la synergie entre divers facteurs de transcription et régulateurs de l'état de la chromatine, ce qui mène à une multitude de différentes combinaisons possibles, expliquant par le fait même la très grande diversité dans l'efficacité de la transcription selon les types cellulaires et les conditions environnantes de la cellule. Cependant, afin de regrouper les conditions gagnantes au niveau de la région d'intérêt transcrite, certains ont amené l'hypothèse de régionalisation au sein du noyau des différentes activités nucléaires (revu dans Zaidi *et al.*, 2005). Ces microdomaines favoriseraient la transcription en regroupant au même endroit la machinerie transcriptionnelle et les protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. Cette organisation de la chromatine dans ces microdomaines passe par la liaison de certaines régions d'ADN présentes dans l'euchromatine appelées les S/MARs (Scaffold / Matrix Associated Regions) (Davie, 1997) (Figure 1.13).

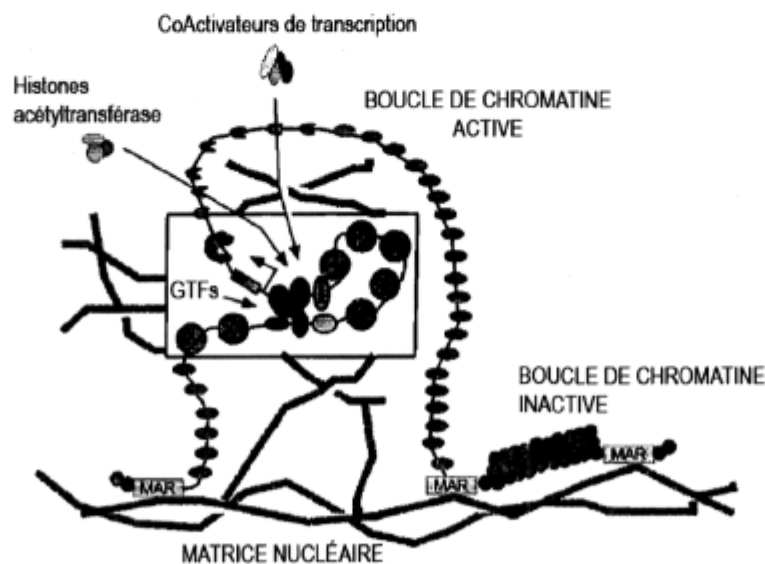


Figure 1.13. Représentation schématique des domaines transcriptionnellement actifs et de leur association à la matrice nucléaire (Adapté de (Davie, 1997)).

Ces microdomaines centraliseraient aussi les facteurs d'épissage et ceux impliqués dans le maniement des ARNm aux sites de transcription et près des pores nucléaires afin de favoriser leur exportation au cytoplasme. La composition de la matrice nucléaire, notamment composée des lamines et autres protéines de liaisons à l'ADN ou ARN est toutefois encore obscure (revu dans Nickerson, 2001). De plus, certains remettent en question les résultats publiés par plusieurs études sur le sujet, accusant les méthodes d'extraction utilisées comme étant responsables des conclusions erronées tirées de ces études (Pederson, 2000). Néanmoins, même si l'agencement des composantes de la matrice nucléaire interagissant avec la chromatine est encore mal définie, plusieurs études et évidences pointent toutefois vers l'existence certaine de ces domaines (revu dans Gilbert *et al.*, 2005).

1.4 LE CONTRÔLE DE LA TRANSITION MATERNELLE EMBRYONNAIRE

L'importance de la transition maternelle embryonnaire (MET) est attribuable au fait qu'après un certain temps, l'embryon épuise les réserves d'ARNm et de protéines qui lui ont été transmises par l'ovocyte et acquises durant l'ovogenèse. L'embryon doit dès lors produire ses propres ARNm s'il veut pouvoir poursuivre son développement. En plus de permettre le renouvellement des ressources en ARNm et protéines de provenance maternelle, la MET permet aussi au jeune embryon d'activer l'expression de différents facteurs qui sont spécifiques aux embryons et aussi impliqués dans la reprogrammation nucléaire se produisant dans les jeunes embryons.

La MET est indispensable à la progression du développement de l'embryon et à sa survie. Lorsque l'on ajoute un inhibiteur de transcription, l' α -amanitin, aux milieux de culture, on observe un arrêt du développement au stade embryonnaire où se produit la MET, tant chez la souris que chez le bovin (Braude, 1979, Barnes & First, 1991, Memili & First, 1998, Lequarre *et al.*, 2003). Ceci démontre bien que l'ovocyte détient le pouvoir de faire progresser l'embryon jusqu'à la MET sans l'apport de nouveaux ARNm. Néanmoins, la transcription des nouveaux ARNm amenés par la MET est absolument indispensable à la continuation du développement embryonnaire ultérieurement à cette étape.

1.4.1 Activation de la transcription par la traduction d'ARNm maternels

Avant d'activer sa propre machinerie transcriptionnelle, l'embryon utilise les ressources maternelles pour se préparer à cette étape cruciale de son développement. Comme décrit précédemment, une très grande synthèse protéique à partir des ARNm maternels a lieu lors de la maturation des ovocytes et des premiers stades embryonnaires (Sirard *et al.*, 1989, Memili & First, 1999, Coenen *et al.*, 2004, Massicotte *et al.*, 2006). Il a été démontré chez la souris que la synthèse protéique dans l'embryon pré-MET est indispensable pour la transcription d'un certain nombre de gènes exprimés au cours de la MET (Wang Q. & Latham, 1997).

Il est connu chez la souris que les facteurs de transcription SP1 et TBP sont présents sous forme protéique dans l'ovocyte mais que leur concentration diminue substantiellement vers la fin de sa croissance (Worrad *et al.*, 1994). Par contre, au cours de la première division cellulaire, la concentration nucléaire de SP1 et TBP augmente à nouveau en concomitance avec la MET. Cette augmentation est soutenue entre les stades 1- à 2-cellules et est dépendante de la synthèse protéique et non de la transcription de nouveaux ARNm (Worrad *et al.*, 1994). Cela confirme donc l'idée selon laquelle certains facteurs ou activateurs de transcription sont présents sous forme d'ARNm avant la MET et doivent être traduits en protéines au temps voulu afin de permettre l'activation de la transcription chez l'embryon de souris. La même observation a été faite chez *Xenopus* dans le cas de TBP. Alors que l'œuf de *Xenopus* ne contient pas de TBP sous forme protéique, ce dernier renferme de grandes quantités d'ARNm maternel codant pour TBP (Veenstra *et al.*, 1999). Ces ARNm maternels sont ensuite traduits durant les premiers stades embryonnaires pour obtenir une quantité maximale de TBP sous forme protéique à la MET.

La cycline A2 est un autre bel exemple d'ARNm maternels indispensable à la MET chez la souris. Cette cycline est absente au niveau protéique chez le jeune embryon 1-cellule et apparaît seulement au cours du premier cycle cellulaire suite à la traduction de ses ARNm maternels (Hara *et al.*, 2005). L'arrivée de la cycline A2 active ensuite CDK2 pour former le complexe CycA2-CDK2 qui participe à la MET via la phosphorylation de divers

facteurs dans le but de permettre la transcription. Un des nombreux facteurs pouvant être phosphorylé par CycA2-CDK2 est SP1 et sa phosphorylation mène à l'augmentation de son efficacité dans le processus de transcription (Fojas de Borja *et al.*, 2001). CycA2-CDK2 peut aussi agir sur l'action de la protéine du rétinoblastome (pRB) qui peut, entre autre, lier les facteurs de transcription E2F pour réduire son activité transcriptionnelle (revu dans Harbour & Dean, 2000). La phosphorylation de pRB par les CDK brise le lien pRB-E2F et redonne sa pleine activité à E2F. Du même coup, la phosphorylation de pRB réduit l'activité déacétylase de certaines HDAC qui lui son liés, augmente par le fait même l'activité transcriptionnelle (revu dans Harbour & Dean, 2000). Ainsi, l'apport de la cycline A2 sous forme d'ARNm maternel par l'ovocyte est de la plus grande importance dans la progression de l'embryon de souris lors de la MET.

L'ajout de cycloheximide, un inhibiteur de traduction, avant la MET ou l'inhibition de la polyadénylation des ARNm maternels causent l'entrave de la transcription lors de la MET chez la souris, démontrant ainsi l'importance de la traduction des ARNm maternels au moment de la MET (Aoki *et al.*, 2003).

1.4.2 MET dirigée par les modifications post-traductionnelles

L'ovocyte n'est pas simplement une source d'ARNm pour le jeune embryon, il fournit également des protéines ayant un rôle à jouer dans la MET. Il a été démontré que l'inhibition de la protéine PKA (cAMP-dependent protein kinase) dans les zygotes empêche l'apparition de certaines protéines synthétisées spécifiquement au stade 2-cellules lors de la MET dans l'embryon de souris sans toutefois empêcher le clivage de ces zygotes en embryons 2-cellules (Poueymirou & Schultz, 1989). Deux principales hypothèses tentent d'expliquer l'inhibition de cette synthèse protéique. La première est que l'inhibition de PKA réduit l'efficacité de la machinerie traductionnelle, empêchant la traduction d'ARNm maternels codant pour des facteurs de transcription qui eux seraient impliqués dans la transcription de ces nouvelles protéines. L'autre possibilité, plus plausible, est que PKA phosphoryle divers éléments de la machinerie transcriptionnelle, ayant comme conséquence l'activation de la transcription. Les auteurs ont démontré que l'action de PKA

passé nécessairement par la transcription puisque le retrait des inhibiteurs de PKA suivie de l'inhibition de la transcription par l' α -amanitin empêche l'apparition des mêmes protéines lors de la MET (Poueymirou & Schultz, 1989). Ceci démontre donc que la synthèse de ces protéines n'est pas seulement bloquée par une inhibition de la traduction des ARNm codant pour ces protéines, suite à une réduction de la polyadénylation par exemple, car ces protéines seraient traduites suite au retrait de l'inhibition de PKA même en présence d' α -amanitin. PKA a donc un effet au niveau de l'activation de la transcription à la MET, soit au niveau de la traduction de facteurs de transcription ou soit au niveau de la phosphorylation et activation de facteurs de transcriptions déjà présents sous forme protéique.

Cette hypothèse a été corroborée dans un cas précis chez la souris, puisque l'expression de l'ARNm codant pour Hsp70 au stade 2 cellules n'est pas affectée par l'inhibition de la synthèse protéique dans l'embryon 1 cellule mais est inhibée par l'inhibition de PKA (Manejwala *et al.*, 1991). Cela suggère ainsi que l'expression du gène codant pour Hsp70 à la MET n'implique pas la présence de nouvelles protéines synthétisées à partir d'ARNm maternels, mais plutôt la modification post-traductionnelle par phosphorylation de facteurs de transcription déjà présents dans l'embryon 1 cellule (Manejwala *et al.*, 1991).

Pour continuer dans la veine des modifications post-traductionnelle et de leur rôle dans la MET, il fût démontré qu'une certaine proportion des RNPII dans l'ovocyte mature est rapidement déphosphorylée suite à la fécondation (Bellier *et al.*, 1997). Étant donné que la déphosphorylation de la CTD compris dans RNPII est nécessaire à sa liaison aux promoteurs et que cette même déphosphorylation survient lors de la MET chez la souris, on peut suggérer que la régulation de la MET ainsi que le degré de phosphorylation de la RNPII sont interreliés. La forme hypophosphorylée de la RNPII détectée suite à la fécondation ne découle pas de la traduction de nouvelles RNPII à partir des réserves ovocytaires. Cependant, le cas contraire pourrait être possible pour la forme hyperphosphorylée puisqu'elle disparaît complètement suite à l'inhibition de la traduction par la cycloheximide (Bellier *et al.*, 1997). Deux explications sont alors plausibles : cette portion

hyperphosphorylée de RNPII provient de la traduction de nouvelles RNPII à partir des ARNm maternels et/ou des kinases traduites à partir des ARNm maternels sont impliqués dans l'hyperphosphorylation de la CTD. Un profil de déphosphorylation et phosphorylation *de novo* de la CTD chez *Xenopus* suite à la fécondation et à la MET a aussi été observé (Palancade *et al.*, 2001). La relation entre le degré de phosphorylation de la CTD et la MET chez le bovin est beaucoup moins évidente. D'abord, la RNPII hypophosphorylée est présente dans tous les stades embryonnaires de l'ovocyte immature jusqu'à l'embryon 8-cellules (Memili & First, 1998). Cependant, la qualité discutable des résultats obtenus dans cette étude ne permet aucune quantification valable des différents états de phosphorylation de la RNPII lors du développement embryonnaire bovin.

1.4.3 Transcription à la MET dirigée par les enhanceurs et les promoteurs sans boîte TATA

L'embryon de 2-cellules murin réagit aussi par une augmentation de la transcription suite à l'hyperacétylation de la chromatine induite par la présence d'inhibiteurs d'histones déacétylases (Wiekowski *et al.*, 1993, Aoki *et al.*, 1997). Bien que très actif transcriptionnellement, cet embryon est pourvu d'une chromatine avec un certain degré d'inhibition. Une répression partielle de la transcription chez les embryons 2-cellules de souris est observable par l'inhibition de transcription de gènes rapporteurs avec un promoteur de base injectés dans ces embryons alors que ces mêmes promoteurs sont actifs lorsqu'ils sont injectés dans les pronoyaux mâles (Martinez-Salas *et al.*, 1989, Henery *et al.*, 1995). Si les embryons 2-cellules de souris sont fortement actifs au niveau transcriptionnel, comment expliquer le fait que les plasmides transcrits dans les pronoyaux mâles du zygote de cette espèce sont éteints lors du passage au stade 2-cellules?

L'explication résiderait dans la région régulatrice des gènes activés lors de la MET chez le jeune embryon. Il a été démontré qu'afin d'être transcrits à un niveau notable dans l'embryon 2-cellule, les promoteurs nécessitent l'action synergique d'un enhanceur et de coactivateurs de transcription (Wiekowski *et al.*, 1991, 1993, Majumder *et al.*, 1993, Henery *et al.*, 1995, Majumder *et al.*, 1997). En d'autres mots, les embryons à partir de la

MET transcrivent plus favorablement les gènes dirigés par des enhancers et par le fait même, éteignent ou diminuent l'expression des promoteurs de base. La capacité des coactivateurs de transcription via leur liaison aux enhancers, permet de décondenser la chromatine et ce serait donc à l'origine de l'importance des enhancers dans la MET.

Conjointement au rôle critique des enhancers durant la MET, l'expression génique dans le jeune embryon de souris s'effectue préférentiellement via des promoteurs sans boîte TATA. Le cas du gène eIF-1A illustre très bien cette énoncé (Davis & Schultz, 2000). Dans l'ovocyte et l'embryon pré-MET, l'ARNm codant pour eIF-1A a été transcrit à partir d'un promoteur à boîte TATA, alors que de la MET jusqu'au stade de blastocyste, la machinerie transcriptionnelle de l'embryon utilise tout à coup un nouveau promoteur sans boîte TATA pour transcrire le même gène (Davis & Schultz, 2000). Cette préférence pour les gènes à promoteur sans boîte TATA permet, entre autre, à l'embryon post-MET de renouveler ses réserves en ARNm codant pour des protéines housekeeping qui sont dans bien des cas dirigées par de tels promoteurs (Azizkhan *et al.*, 1993). Cette transcription activée par un promoteur sans boîte TATA conjointement à l'utilisation d'enhancers permet aussi l'expression chez le jeune embryon de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et/ou la reprogrammation nucléaire tel Oct-4 (Nordhoff *et al.*, 2001, Ovitt & Scholer, 1998). Les facteurs de transcription avec domaine de transformation spécifique aux érythroblastes (ETS) ont un rôle à jouer dans l'expression de Oct-4 et eIF-1A chez l'embryon post-MET, suggérant ainsi l'implication de l'action de ces facteurs ETS dans la transcription des promoteurs sans boîte TATA chez l'embryon (Kageyama *et al.*, 2006).

1.4.4 Dilution d'inhibiteurs de transcription

Plusieurs hypothèses tentent donc d'expliquer ce qui active la MET. Une des hypothèses très étudiée, spécialement chez *Xenopus*, est la présence d'inhibiteurs de transcription dans le jeune embryon pré-MET. Cet inhibiteur, qui serait en quelque sorte un répresseur global de transcription, serait ainsi titré par la quantité d'ADN grandissante à chaque division cellulaire jusqu'à l'atteinte du ratio favorable ADN/cytoplasme (Figure 1.14). L'injection simultanée dans l'ovocyte de *Xenopus* d'un plasmide avec un promoteur

ciblé par la RNA polymérase III et d'une quantité d'ADN égale à celle présente dans un embryon de 4000 cellules, qui correspond au moment où se produit la MET, induit la transcription prématurée du plasmide (Newport & Kirschner, 1982a). Alors que l'injection du plasmide seul résulte en une rapide inhibition de transcription, l'injection simultanée de l'ADN compétiteur (ADN exogène aléatoire) est capable de conserver l'activité transcriptionnelle du promoteur du plasmide dans les embryons *Xenopus* pré-MET. L'ovocyte de *Xenopus* contient sous forme cytoplasmique plus d'histones qu'il n'en faut pour enrouler en « chromatine » le nouveau plasmide et permettre son masquage par des inhibiteurs de transcription qui peuvent se lier par la suite à cette chromatine (Woodland & Adamson, 1977). L'injection de l'ADN compétiteur, en mimant l'augmentation de la quantité de chromatine à la MET, pourrait ainsi accaparer une proportion des inhibiteurs suite à son enroulement en chromatine et laisser libre accès à la machinerie transcriptionnelle pour stimuler la transcription du plasmide (Figure 1.14).

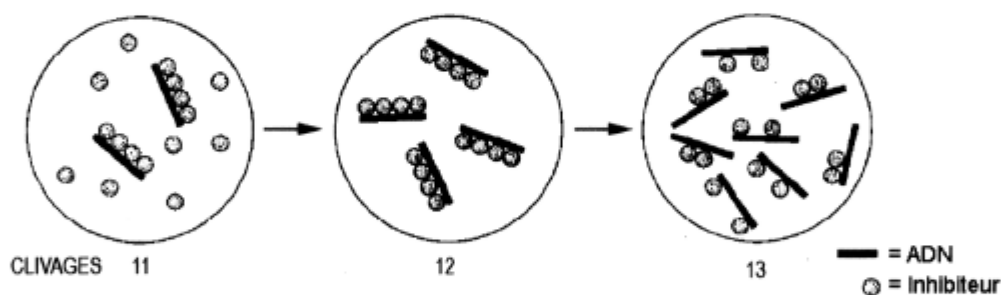


Figure 1.14. Titration d'inhibiteurs de transcription avec la duplication de la quantité d'ADN génomique lors des divisions cellulaires chez l'embryon *Xenopus* à la MET (Reproduit avec permission (Newport & Kirschner, 1982a)).

Le même résultat a été obtenu dans une étude subséquente avec un promoteur de la RNPII sauf que cette fois, la titration seule par l'injection d'ADN compétiteur n'a pas suffi. L'ajout simultané du facteur de transcription basal TBP est requis pour la transcription prématurée de promoteur de classe II (Almouzni & Wolffe, 1995). Cela illustre bien le fait que non seulement l'embryon contient des inhibiteurs de transcription mais aussi, qu'il est déficient en certaines composantes de la machinerie transcriptionnelle de base. Cependant, même si certaines composantes fonctionnelles de la machinerie basale de transcription, dont TBP, semblent manquantes dans les embryons *Xenopus* pré-MET,

plusieurs facteurs de transcription de base sont présents à ces stades comme l'a démontré cette même étude (Almouzni & Wolffe, 1995). En effet, l'injection simultanée d'un plasmide avec un promoteur adénoviral E4 contenant 5 sites de liaison Gal4 ainsi que l'activateur de transcription Gal4-VP16 dans les embryons pré-MET induit la transcription de ce plasmide, et ce, même si c'est un promoteur de classe II, c'est-à-dire transcrit par la RNPII. Gal4-VP16 est reconnu pour se lier à l'ADN même dans une chromatine relativement compacte, peu importe l'injection ou non de TBP exogène, ou bien en l'absence de titration d'inhibiteurs par l'injection d'ADN non spécifique. Gal4-VP16 est capable d'induire la transcription pré-MET d'un vecteur injecté. Tout cela démontre bien que la transcription, activée par de très forts activateurs de transcription, peut survenir dans les embryons pré-MET. On déduit qu'une certaine machinerie transcriptionnelle de base est présente à ce stade, dont la RNPII, puisqu'elle répond à l'activation de la transcription par Gal4-VP16.

La nécessité de cette dilution des inhibiteurs pour la MET est moins définie chez les mammifères, surtout que l'activation du génome embryonnaire a lieu après seulement quelques divisions cellulaires contrairement à *Xenopus* où nous avons 4000 copies d'un noyau diploïde au moment de la MET. Néanmoins, la réplication semble avoir un certain rôle à jouer dans l'activation de la transcription puisque l'inhibition de la réplication de l'ADN par l'aphidicolin réduit la transcription dans le pronoyau mâle de souris, démontré par une diminution de 35% d'incorporation de BrUTP chez les embryons traités (Aoki *et al.*, 1997). Cette transcription favorisée par la réplication de l'ADN pourrait ne pas être liée à la dilution d'un inhibiteur mais tout simplement être expliquée par le fait que lors de la réplication de l'ADN durant la phase S, le désordre créé dans la chromatine du zygote procure un meilleur accès à l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle (Wolffe, 1991). La divergence entre *Xenopus* et les mammifères du point de vue de la nécessité de dilution d'inhibiteurs par la multiplication de l'ADN afin d'activer la transcription du génome embryonnaire fût suggérée par l'existence d'une certaine forme d'horloge biologique régulant l'initiation de la transcription à la MET (Schultz, 1993). Peu importe le stade cellulaire de l'embryon, une activation de la transcription est détectée au temps où la MET se produit normalement, et ce, chez la souris (Bolton *et al.*, 1984, Wiekowski *et al.*, 1991,

Schultz, 1993, Zuccotti *et al.*, 2002), le lapin (Delouis *et al.*, 1992) et le bovin (Gagne *et al.*, 1995). Ainsi, en bloquant un embryon au stade 1 cellule avec l'aide d'un inhibiteur de réplication de l'ADN, on observe l'activation de la transcription dans cet embryon au moment où la MET survient normalement.

Toutefois, même si l'augmentation de la quantité d'ADN génomique ne semble pas indispensable pour l'activation de la transcription lors de la MET chez les mammifères, une chromatine répressive est tout de même présente dans les embryons pré-MET murins. Comme chez *Xenopus*, lorsque de l'ADN exogène sous forme plasmidique est injecté dans les ovocytes ou embryons murins, cet ADN est aussitôt assemblé sous une forme de « chromatine » (Martinez-Salas *et al.*, 1989). L'expression d'un plasmide injecté dans les zygotes est dépendante du pronoyau dans lequel il est injecté. En effet, lorsque l'injection a lieu dans le pronoyau mâle, on assiste à un certain niveau de transcription du plasmide alors que lorsqu'elle a lieu dans le pronoyau femelle, aucune transcription n'est détectable (Wiekowski *et al.*, 1993). Cette inhibition de la transcription du plasmide injecté dans le pronoyau femelle est levée par le traitement des embryons injectés avec du byturate (Majumder *et al.*, 1993, Wiekowski *et al.*, 1993). Le byturate est un inhibiteur qui agit sur les histones déacétylases, et ainsi, provoque une hyperacétylation des histones. Le pronoyau femelle contient donc une chromatine répressive à la transcription alors que ce n'est pas le cas chez le pronoyau mâle puisqu'aucune augmentation de transcription n'est détectée suite à l'utilisation de byturate. Ceci coïncide avec le fait que le pronoyau mâle est déjà hyperacétylé suivant le remplacement des protamines par des histones H4 cytoplasmiques hyperacétylées lors de la fécondation (Adenot *et al.*, 1997).

1.4.5 La méthylation de l'ADN et la MET

Bien que l'importance du degré d'acétylation des histones dans le niveau d'activité de la transcription chez les embryons a été démontrée dans les sections précédentes, un autre type de modification épigénétique semble nécessaire pour la MET : la méthylation de l'ADN. Des chambardements majeurs au niveau de la méthylation ont lieu au cours du développement embryonnaire précoce chez les mammifères. L'ADN des gamètes des

mammifères est fortement méthylé sur les résidus cytosine au cours de la gamétogenèse et cette méthylation est maintenue jusqu'à la fécondation (revu dans Dean *et al.*, 2005). Suite à la fécondation, une vaste déméthylation des génomes se produit débutant par une déméthylation active très rapide du pronoyau mâle suivit d'une déméthylation passive du génome maternel au cours des premières divisions embryonnaires (Figure 1.15) (Dean *et al.*, 2003). On assiste par la suite à une méthylation *de novo* du génome de l'embryon dans sa progression vers le blastocyste. Cette reprogrammation épigénétique est très importante car un mauvais établissement du profil de méthylation peut résulter en divers problèmes développementaux entraînant même la mort comme le démontre entre autre une récente étude sur le clonage (Liu *et al.*, 2007). Le knock-out d'une enzyme majeure, DNMT1 (DNA MethylTransferase 1), impliquée dans la méthylation chez la souris démontre aussi l'importance de cette modification lors du développement embryonnaire car les embryons déficients en DNMT1 meurent avant de voir le jour (Li *et al.*, 1992).

Comme décrit brièvement précédemment, la méthylation est généralement associée avec la répression de la transcription. La très rapide déméthylation du pronoyau mâle suite à la fécondation corrèle avec le fait que ce dernier est actif transcriptionnellement chez la souris alors que le pronoyau femelle qui demeure hautement méthylé est réprimé au niveau de la transcription (Beaujean *et al.*, 2004). Chez le bovin, cette déméthylation du pronoyau mâle est toutefois moins drastique que chez la souris (Beaujean *et al.*, 2004), ce qui est en accord à un certain niveau avec le silence transcriptionnel du très jeune embryon bovin. Toutefois, une déméthylation progressive du génome embryonnaire bovin est observée et son niveau le plus bas est atteint dans l'embryon 8-cellules, ce qui coïncide avec la MET (Figure 1.15).

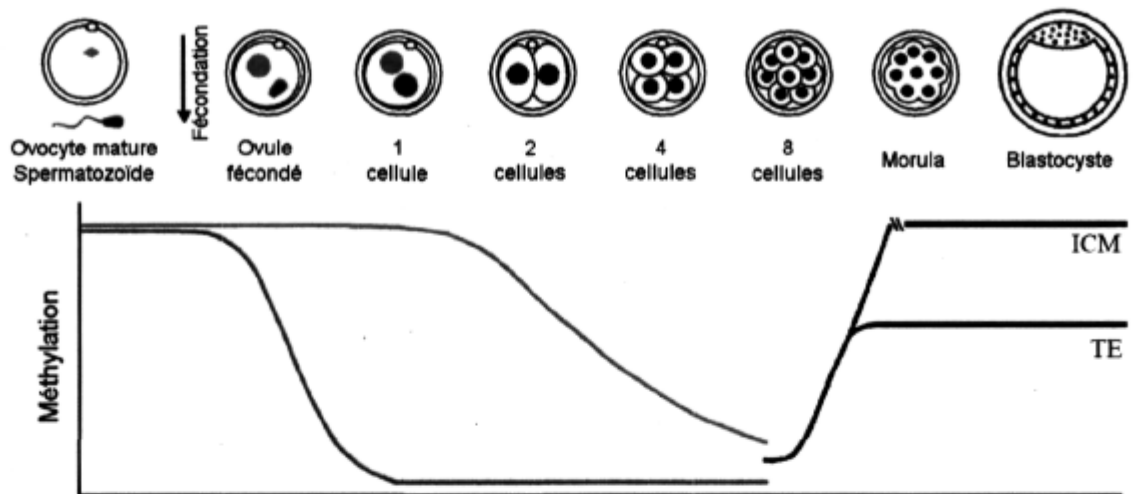


Figure 1.15. Niveaux de méthylation globaux des gamètes et des embryons bovins (Reproduit avec permission (Dean *et al.*, 2003)).

Dans les cellules somatiques, les protéines responsables de la répression de la transcription par la méthylation de l'ADN contiennent des domaines de liaison aux cytosines méthylées (MBD) (Wade, 2001). Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer l'action des MBD dans la répression de la transcription mais les plus cohérentes impliquent le masquage du promoteur par l'encombrement causé par la liaisons des MBD au promoteur, ou encore le recrutement des HDAC par les MBD aux sites méthylés afin de provoquer une déacétylation des histones de la région méthylée (revu dans Bird & Wolffe, 1999). Mais peu importe, une chromatine non permissive en résulte et du fait même, la répression de la transcription de la région touchée (Turner, 2000). Alors que la répression de la transcription par les MBD a été démontrée dans les cellules somatiques, la présence de tous les sous-types de protéines MBD dans les embryons murins et bovins pré- et post-MET suggèrent un rôle analogue dans ces tissus (Ruddock-D'Cruz *et al.*, 2008).

Des DNMT, MBD, HAT et HDAC impliquées respectivement dans la méthylation de l'ADN, la liaison de cet ADN méthylé et l'acétylation et la déacétylation des histones sont présentes au cours du développement embryonnaire bovin (Segev *et al.*, 2001, Golding & Westhusin, 2003, McGraw *et al.*, 2003, McGraw *et al.*, 2007, Ruddock-D'Cruz *et al.*, 2008). La présence de ces différentes classes de protéines suggère un très fort remodelage de la chromatine chez le jeune embryon et à la MET. Cependant, ce modèle de méthylation

de l'ADN dans la pré-MET, bien qu'il semble plausible chez la souris et le bovin, ne semble pas cadrer à tous les modèles de mammifères (Beaujean *et al.*, 2004, Young & Beaujean, 2004). Chez le mouton par exemple, la déméthylation embryonnaire est moins prononcée et moins corrélable à l'activation du génome embryonnaire qui se produit aux stades 8- à 16-cellules chez cette espèce. Il faut cependant noter que ces études tiennent compte de l'état global de méthylation du noyau par immunocytochimie et non seulement du degré de méthylation des promoteurs de gènes exprimés chez l'embryon. Toutes les autres régions méthylées, servant à maintenir l'intégrité du génome, qui regroupent la majorité des cytosines méthylées sont aussi prises en considération (Weber & Schubeler, 2007). On ne peut donc pas exclure la possibilité que chez le mouton, les promoteurs actifs soient déméthylés durant la MET alors que les autres régions génomiques demeurent fortement méthylées.

1.4.6 Les protéines HMG et la MET

La famille des protéines HMG (High Mobility Group) regroupe des protéines chromosomales non-histones qui sont classées principalement en trois grands groupes : HMGA, HMGB et HMGN selon la nouvelle nomenclature adoptée par le NIH (voir <http://www.nlm.nih.gov/mesh/hmg.html>). Cette famille de protéines a un rôle important à jouer dans la transcription et le remodelage de la chromatine.

1.4.6.1 Protéines HMGA (AT-hook High Mobility Group proteins)

Dans la sous-famille des protéines HMGA, nous retrouvons 4 membres, HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c et HMGA2. Les 3 premières protéines, HMGA1a, 1b et 1c, proviennent de l'épissage alternatif du même gène : HMGA1. HMGA1a est l'ARNm le plus long des 3 et il correspond à la forme HMG-I selon l'ancienne nomenclature alors que HMGA1b et HMGA1c correspondent respectivement aux formes HMG-Y et HMG-I/R. HMGA2, correspondant à HMGI-C, provient d'un autre gène ayant certaines caractéristiques retrouvées chez HMGA1 comme les 3 AT-hook permettant la liaison à l'ADN (revu dans Bianchi & Beltrame, 2000). Ces motifs AT-hook, Pro-Arg-Gly-Arg-Pro,

se lie dans le sillon mineur de l'ADN de forme B (forme naturelle la plus souvent retrouvée dans les cellules) sur une séquence riche en A-T (revu dans Bianchi & Beltrame, 2000). Cet attachement spécifique à l'ADN se fait non pas sur une séquence précise mais plutôt sur une structure distincte de l'ADN formée par les nucléotides A-T. Les protéines HMGA possèdent peu ou même aucune structure secondaire lorsqu'elles sont en solution et acquièrent certaines structures seulement lorsqu'elles se lient à d'autres molécules comme l'ADN ou d'autres protéines (revu dans Reeves & Beckerbauer, 2001).

Lorsqu'un AT-hook se lie à l'ADN par le biais de la structure générée par la séquence AT riche (entre 4 à 6 pb), une multitude de ponts hydrogènes sont créés entre les résidus de l'AT-hook et les acides nucléiques (revu dans Reeves & Beckerbauer, 2001). Aussi, des interactions entre les résidus de chaque côté de l'AT-hook et les phosphates de l'hélice d'ADN vont stabiliser encore plus le complexe AT-hook-ADN. Les protéines HMGA contiennent donc 3 de ces AT-hook qui sont reliées par des peptides sans aucune structure secondaire particulière, ce qui permet aux HMGA de pouvoir adopter plusieurs conformations différentes pour s'ajuster à différentes séquences riches en AT. Même si une liaison AT-hook-ADN est forte, la liaison de 2 ou 3 AT-hook avec l'ADN va augmenter de beaucoup la force d'interaction entre HMGA et l'ADN. Le fait que les AT-hook d'une HMGA se lient à 3 séquences très rapprochées ou très éloignées va avoir un impact différent sur son degré d'action (revu dans Reeves & Beckerbauer, 2001).

Les protéines HMGA régulent la transcription en favorisant la formation des « enhanceosomes », des complexes multiprotéiques-ADN qui servent à recruter l'ARN polymérase II et d'autres co-facteurs indispensables à l'initiations de la transcription en faisant le pont entre les éléments enhancers et les promoteurs de base (revu dans Reeves & Beckerbauer, 2001). L'action des HMGA dans la formation des enhanceosomes peut se faire à 2 niveaux : en liant l'ADN pour induire le repliement de celui-ci et ainsi rapprocher des séquences éloignées pour favoriser les interactions entre divers facteurs et activateurs de transcription (Yie *et al.*, 1999) ou par le biais de liaisons directes à d'autres protéines pour faire le pont entre différentes régions d'ADN et autres facteurs de transcription (Chin *et al.*, 1998).

HMGA peut aussi agir à titre d'activateur de transcription en offrant une certaine compétition à des protéines inhibitrices de transcription comme les histones H1 dans la liaison des régions génomiques riches en AT (revu dans Reeves, 1992). Cette liaison favorise un état de chromatine relaxé et ainsi plus permissif à la transcription par un déplacement localisé des nucléosomes. Les protéines HMGA sont parmi les protéines nucléaires les plus phosphorylées. Ces phosphorylations sont dépendantes des phases du cycle cellulaire et de l'environnement. Outre la phosphorylation, les HMGA peuvent aussi subir des modifications d'acétylation et de méthylation et toutes ces modifications vont influencer la capacité de liaison des HMGA à l'ADN ou aux protéines, et ainsi agir sur l'activation de la transcription par les HMGA (Reeves, 1992, Reeves & Beckerbauer, 2001).

HMGA1 est présent en assez forte concentration dans les pronoyaux mâle et femelle ainsi que dans l'embryon 2-cellules murin (Thompson *et al.*, 1995). Ce signal s'atténue aux stades 4- et 8-cellules et augmente à nouveau dans le blastocyste. Cette forte présence de HMGA1 dans le jeune embryon coïncide avec l'activation du génome embryonnaire chez la souris qui se produit au stade 2-cellules et sa diminution au stade 4-cellules coïncide avec l'arrivée de l'histone H1 somatique (Clarke *et al.*, 1992).

La décortication de la localisation de HMGA1 dans les pronoyaux a démontré que 19 heures post-hCG, HMGA1 est absent des pronoyaux et sa localisation nucléaire n'est détectée qu'à partir de 24 heures post-hCG (Beaujean *et al.*, 2000). Chez la souris, la transcription majeure de nouveaux ARNm est détectable par incorporation de BrUTP à 26 heures post-hCG chez environ 35% des embryons alors que 27 heures post-hCG tous les embryons sont transcriptionnellement actifs (Beaujean *et al.*, 2000). La micro-injection de HMGA1 exogène 19 à 20 heures post-hCG devance cette activation en provoquant une activation de la transcription chez 40% des embryons micro-injectés seulement 25 heures post-hCG. L'ADN de ces embryons ont une plus grande sensibilité à la DNase I, ce qui démontre bien l'effet de HMGA1 sur la décondensation de l'ADN chez le jeune embryon (Beaujean *et al.*, 2000). Finalement, la micro-injection d'histone H1 somatique dans les embryons murins provoque une diminution de 50% des embryons transcriptionnellement

actifs 27 heures post-hCG (Beaujean *et al.*, 2000). Cela confirme la compétition probable entre l'histone H1 et HMGA1 pour la chromatine riche en séquences AT. En présence d'une grande concentration d'histone H1, il se peut que les HMGA1 soient délogés et que la chromatine acquiert un état de condensation plus compacte, nuisant ainsi à l'activation de la transcription.

1.4.6.2 Protéines HMGN (High Mobility Group Nucleosome Binding Proteins)

Cette famille regroupe les protéines HMGN1 et HMGN2 respectivement appelées HMG-14 et HMG-17 par le passé ainsi que HMGN3 et HMGN4. Les HMGN sont de très petites protéines (10 à 20 kDa) qui se lient directement aux nucléosomes (Hock *et al.*, 1998a). Deux protéines HMGN peuvent se lier sur chaque nucléosome simultanément (Bustin *et al.*, 1995). Tout comme c'est le cas pour les protéines HMGA, la liaison des protéines HMGN entraîne une compétition avec les histones H1 pour la liaison aux nucléosomes et induit ainsi une décondensation de la chromatine (Catez *et al.*, 2002, Catez *et al.*, 2004). La liaison de HMGN aux nucléosomes favorise donc la transcription. Cependant, pour être effective, l'intégration des HMGN doit avoir lieu lors du processus de formation de la chromatine car si l'on ajoute les HMGN après la formation de la chromatine *in vitro*, il n'y a aucune augmentation de la transcription (Bustin *et al.*, 1995). L'incorporation des protéines HMGN aux nucléosomes doit donc avoir lieu lors de la réplication de l'ADN afin d'obtenir une chromatine moins compacte donc qui est plus facile d'accès à la machinerie transcriptionnelle et de ce fait, HMGN se retrouve plus souvent associées à la chromatine plus transcriptionnellement active (Bustin *et al.*, 1995).

HMGN1 et HMGN2 sont présents dans les noyaux des embryons murins à partir du stade de zygote (pronoyaux mâle et femelle) jusqu'à blastocyste (Mohamed *et al.*, 2001). La diminution de la quantité de HMGN1 et HMGN2 par injection d'ARN antisens ciblant les 2 HMGNs dans les zygotes murins retarde les divisions cellulaires de l'embryon (Mohamed *et al.*, 2001). Cette réduction des HMGN n'a cependant pas d'effet sur la quantité de [³²P]UTP incorporée par l'embryon 2-cellules alors qu'une diminution notable est observée dans l'embryon 4-cellules (Mohamed *et al.*, 2001). Cette technique de

détection de la transcription a cependant ses limites puisqu'elle détecte aussi la transcription d'ARNr qui représente la très forte majorité de l'ARN transcrit dans une cellule. Sachant que les protéines HMGN agissent au niveau de la transcription par la RNPII (Hock *et al.*, 1998b), une diminution de l'expression de certains ARNm peut donc être difficilement perceptible. Il est alors permis de spéculer que la quantité moindre d'ARN détectée dans les embryons 4-cellules injectés avec des ARN antisens contre HMGN1 et HMGN2 soit la résultante du manque de divers facteurs de transcription normalement transcrits dans l'embryon 2-cellules.

Il est à noter que l'effet causé par l'absence des HMGN1 et HMGN2 n'est obtenu que par la disparition des 2 protéines simultanément, ce qui suggère une action redondante des 2 protéines (Mohamed *et al.*, 2001). L'existence de souris knock-out pour HMGN1 en parfaite santé va aussi dans ce sens (revu dans Bianchi & Beltrame, 2000).

1.4.6.3 Protéines HMGB (High Mobility Group Box proteins)

La troisième sous-famille de gènes de la famille des protéines HMG comprend les HMGB. Ces protéines avec boîte HMG (HMG Box) sont les HMG les plus abondantes dans les cellules de mammifères (Bianchi & Beltrame, 2000). Trois différentes protéines HMGB synthétisées à partir de gènes différents sont connues chez les mammifères : HMGB1, HMGB2 et HMGB3 qui correspondent respectivement à HMG1, HMG2 et HMG4 selon l'ancienne nomenclature.

Les HMGB contiennent 2 HMG-box, n'ont pas de séquence de liaison privilégiées et ne se lient pas efficacement à l'ADN standard de forme B contrairement au HMGA (revu dans Bianchi & Beltrame, 2000). Les HMGB ont plutôt une meilleure affinité pour l'ADN de liaison qui relie les nucléosomes entre eux. Étant donné le site de liaison des HMGB à l'ADN, tout comme dans le cas des autres sous-familles des protéines HMG précédemment décrites, les HMGB rivalisent avec les histones H1 pour s'attacher à l'ADN retrouvé entre les nucléosomes (Catez *et al.*, 2004).

Des souris knock-out pour HMGB1 ont été produites mais décèdent rapidement après leur naissance suite à des problèmes dans le métabolisme du glucose (Calogero *et al.*, 1999). Des anomalies comme la répression de l'expression du récepteur des glucocorticoïdes ont été détectées chez ces souris (Calogero *et al.*, 1999). HMGB2 est exprimé préférentiellement dans l'embryon et dans les testicules (Ronfani *et al.*, 2001). Étant donné la très forte homologie entre HMGB1 et B2, il est donc suggéré que HMGB2 remplace une partie du travail effectué par HMGB1 dans les souris knock-out lors du développement embryonnaire, ce qui permettrait le développement fœtal jusqu'à la naissance. Par ailleurs, des souris knock-out pour HMGB2 ont été produites, et celles-ci sont normales sauf pour le fait que les mâles montrent une fertilité réduite (Ronfani *et al.*, 2001). Ainsi, tout comme pour les HMGN, une certaine redondance de fonctionnalité est donc envisageable pour les différentes protéines HMGB.

HMGB2 induit de forts replis dans l'ADN et un certain degré de déroulement de la séquence au site de liaison (Ross *et al.*, 2001). Ainsi, HMGB2 aide à l'activation de la transcription en induisant les replis nécessaires dans les régions promotrices pour permettre aux différents facteurs de transcription liés aux promoteurs et enhancers d'interagir entre eux. De plus, un rôle structurel pour HMGB1 a été proposé chez la drosophile ou *Xenopus*. Chez ces espèces, HMGB1 remplacerait le rôle des histones H1 somatiques dans le développement embryonnaire précoce chez la grenouille et la drosophile (Spada *et al.*, 1998). La très forte présence d'HMGB1 dans les embryons avant la MET chez ces espèces contribuerait à la réplication très rapide de l'ADN dans ces embryons en raison de la structure très peu compacte et instable de cet ADN dépourvu d'histone H1.

Cette complémentarité entre HMGB1 et l'histone H1 ne se transpose pas au modèle murin. Alors que certains variants de l'histone H1 somatique apparaissent seulement post-MET chez la souris (Clarke *et al.*, 1992), aucune présence de HMGB1 n'est détectable dans les embryons pré-MET (Spada *et al.*, 1998). À l'opposé de ce qui est observé chez la drosophile et *Xenopus*, HMGB1 apparaît fortement dans les noyaux des embryons 4-cellules chez la souris, soit au même moment que l'histone H1 (Spada *et al.*, 1998). La

présence de HMGB1 chez les embryons post-MET chez la souris suggère donc un rôle dans l'activité transcriptionnelle chez cette espèce.

Finalement, HMGB3 est la troisième et plus récente protéine de la famille de HMGB à avoir été identifiée (Vaccari *et al.*, 1998). HMGB3 possède le même domaine fonctionnel que les deux autres HMGB et son expression est très élevée dans le jeune embryon alors qu'elle est à des niveaux très faibles dans les tissus adultes (Vaccari *et al.*, 1998). Toutefois, son implication dans l'activation de la transcription reste à démontrer.

1.5 HYPOTHÈSES

Nul ne doute de l'importance de l'activation du génome embryonnaire dans le bon déroulement des événements embryonnaires menant à la conception d'un nouvel individu. Cette transition caractérisée par le remplacement des ARNm maternels par de nouveaux transcrits embryonnaires permet le maintien du métabolisme de l'embryon, sa différenciation ainsi que sa préparation pour son attachement à l'utérus. Bien que les études et les hypothèses diverses au sujet de la MET se soient multipliées dans les années 90, tant chez *Xenopus* que chez la souris, on constate une certaine diminution des recherches sur le sujet depuis quelques années. Une des raisons de cette accalmie est sans doute le manque d'un modèle animal de choix pour étudier la MET. En effet, chez les 2 modèles animaux abondamment utilisés pour étudier la MET, la fenêtre d'observation disponible est extrêmement éphémère. Bien que chez *Xenopus* la MET survient lorsque l'embryon atteint le stade de 4000 cellules, cela ne donne qu'une très brève période d'observation possible puisque l'embryon de *Xenopus* atteint le stade de 4000 cellules seulement 6 heures post-fécondation (Kimelman *et al.*, 1987). Le même phénomène se produit chez la souris alors qu'un intervalle d'environ 24 heures est observé entre la fécondation et la MET, mais différemment à *Xenopus*, la MET chez la souris débute avant même la première division embryonnaire (Schultz, 1993). L'activation de la MET si tôt en terme de temps ou de divisions cellulaires rend difficile l'étude détaillée des événements cellulaires pouvant amener à cette activation. De plus, puisqu'elle se produit si tôt après la fécondation de l'ovocyte, cela rend difficile la distinction dans la provenance maternelle ou

embryonnaire des facteurs impliqués dans l'activation majeure de la transcription chez l'embryon. Afin de pallier à ces limitations qu'offrent la grenouille et la souris, l'utilisation du modèle bovin semble être un excellent choix permettant ainsi de décortiquer les différents facteurs et événements impliqués dans la MET puisqu'elle survient 3 jours post-fécondation aux stades 8- à 16-cellules. L'objectif général de cette thèse était donc d'étudier l'activation du génome embryonnaire chez le bovin afin d'obtenir une meilleure compréhension du phénomène de la MET chez cette espèce. Une meilleure compréhension de la MET pourra mener à l'amélioration des méthodes de cultures des embryons *in vitro* puisque cette étape du développement embryonnaire est probablement une des plus sensibles à de mauvaises conditions de culture.

La première étude de cette thèse, présentée au chapitre II, avait comme objectif de quantifier chez l'embryon bovin les transcrits de plusieurs facteurs ou activateurs de transcriptions ayant un rôle présumé dans la MET chez d'autres espèces. Cette étude devait donc illustrer les profils d'expression d'ARNm d'une multitude de facteurs de transcription et ainsi donner certain portrait de la présence de divers types et familles de facteurs de transcription pré-MET chez le bovin. Par le fait même, des candidats intéressants et susceptibles d'être impliqués dans la MET ont été identifiés et procurent des cibles intéressantes pour des études subséquentes.

En deuxième lieu, l'expression et la localisation protéique de TBP, un facteur de transcription de base très impliqué dans la transcription d'une multitude de gènes, a été démontrée dans le jeune développement embryonnaire bovin. Dans cette même étude, on a décortiqué l'expression et la localisation de ATF2, hautement présent en ARNm dans l'embryon bovin pré-MET, et de MSY2, une protéine très fortement impliquée dans le masquage des ARNm maternels. Les résultats issus de cette étude, décrits au chapitre III, sont concomitants aux recherches précédentes suggérant l'activation majeure du génome embryonnaire au stades 8- et 16-cellules chez le bovin. Les résultats obtenus mettent aussi l'emphase sur la très grande importance de vérifier le niveau d'expression protéique d'un gène présent sous forme d'ARNm lors du développement embryonnaire avant de tirer toute

conclusion sur la fonctionnalité de ce gène puisque les niveaux d'ARNm et de protéines ne corrélaient pas nécessairement, surtout chez les embryons pré-MET.

Par la suite, la composition du transcriptome de l'embryon 8-cellules bovin fut établit par hybridation soustractive suppressive (SSH). Ainsi, l'expression embryonnaire de plus de 300 gènes nouvellement transcrits à la MET est démontrée au chapitre IV. L'analyse des fonctions moléculaires de la liste des transcrits obtenus démontre que la majorité code pour des protéines impliquées dans la transcription ou la traduction ce qui est en accord avec l'état très actifs au niveau transcriptionnel des embryons post-MET et avec la reprogrammation cellulaire observée chez ces mêmes embryons. Ces résultats proposent maintenant une multitude de nouvelles cibles extrêmement intéressantes susceptibles d'être impliquées dans la MET ou dans le maintien de la pluripotence en régulant l'expression de facteurs de transcription impliqués dans cette pluripotence.

Ensuite, les travaux exposés au chapitre V mettent l'emphase sur le développement d'une technique indispensable à l'étude de la fonctionnalité des gènes dans le développement embryonnaire bovin : la micro-injection de siRNA dans les ovocytes bovins immatures pour le « knock-down » des transcrits d'intérêts. La démonstration de la faisabilité de l'injection des siRNA dans des ovocytes immatures contenus dans leurs cellules de cumulus sans affecter le développement embryonnaire permet donc de cibler la dégradation spécifique de gènes maternels stockés en ARNm dans l'ovocyte avant leur traduction en protéine. Ceci permet d'envisager de vérifier la fonctionnalité d'un gène d'intérêt dans les jeunes embryons bovins sans devoir passer par le « knock-out ». Cette technique a été mise à l'œuvre dans le « knock-down » de HMGN1 et HMGN2 simultanément dans les ovocytes bovins afin de vérifier leur action dans la MET chez le bovin.

Finalement, le chapitre VI a permis de démontrer l'utilité de la micro-injection des siRNA dans l'étude de la fonction d'un gène dont la fonction était encore inconnue dans le développement embryonnaire. Le gène visé était la Matrin 3 et fut découvert comme étant exprimé tôt à la MET lors des expériences décrites au chapitre IV. Le fait que la Matrin 3

soit présente dans les embryons à la MET, qu'elle entre dans la composition de la matrice nucléaire et quelle possède des domaines de liaisons à l'ADN et à l'ARN font de ce gène un candidat de choix pour sa possible implication comme protéine d'échafaudage dans l'agencement de la chromatine et le maniement des ARNm lors de la transcription dans les noyaux des embryons à la MET.

1.6 RÉFÉRENCES

- Adenot PG, Mercier Y, Renard JP & Thompson EM 1997 Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development* 124 4615-4625.
- Ali A & Sirard MA 2002 Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 66 901-905.
- Ali A, Coenen K, Bousquet D & Sirard MA 2004 Origin of bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 62 1596-1606.
- Almouzni G & Wolffe AP 1995 Constraints on transcriptional activator function contribute to transcriptional quiescence during early *Xenopus* embryogenesis. *Embo J* 14 1752-1765.
- Antequera F 2003 Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci* 60 1647-1658.
- Aoki F, Worrada DM & Schultz RM 1997 Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 181 296-307.
- Aoki F, Hara KT & Schultz RM 2003 Acquisition of transcriptional competence in the 1-cell mouse embryo: requirement for recruitment of maternal mRNAs. *Mol Reprod Dev* 64 270-274.
- Azizkhan JC, Jensen DE, Pierce AJ & Wade M 1993 Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 3 229-254.
- Bachvarova RF 1992 A maternal tail of poly(A): the long and the short of it. *Cell* 69 895-897.
- Barnes FL & Eystone WH 1990 Early cleavage and the maternal to zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology* 33 141-152.
- Barnes FL & First NL 1991 Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 29 117-123.
- Beaujean N, Bouniol-Baly C, Monod C, Kissa K, Jullien D, Aulner N, Amirand C, Debey P & Kas E 2000 Induction of early transcription in one-cell mouse embryos by microinjection of the nonhistone chromosomal protein HMG-I. *Dev Biol* 221 337-354.
- Beaujean N, Hartshorne G, Cavilla J, Taylor J, Gardner J, Wilmut I, Meehan R & Young L 2004 Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Curr Biol* 14 R266-267.

Bellier S, Chastant S, Adenot P, Vincent M, Renard JP & Bensaude O 1997 Nuclear translocation and carboxyl-terminal domain phosphorylation of RNA polymerase II delineate the two phases of zygotic gene activation in mammalian embryos. *Embo J* 16 6250-6262.

Belotserkovskaya R, Oh S, Bondarenko VA, Orphanides G, Studitsky VM & Reinberg D 2003 FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* 301 1090-1093.

Bianchi ME & Beltrame M 2000 Upwardly mobile proteins. Workshop: the role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia. *EMBO Rep* 1 109-114.

Bird AP & Wolffe AP 1999 Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 99 451-454.

Black JC, Choi JE, Lombardo SR & Carey M 2006 A mechanism for coordinating chromatin modification and preinitiation complex assembly. *Mol Cell* 23 809-818.

Blackwood EM & Kadonaga JT 1998 Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281 60-63.

Blake MC, Jambou RC, Swick AG, Kahn JW & Azizkhan JC 1990 Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Mol Cell Biol* 10 6632-6641.

Blondin P & Sirard MA 1995 Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 41 54-62.

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.

Bolton VN, Oades PJ & Johnson MH 1984 The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *J Embryol Exp Morphol* 79 139-163.

Bouvet P & Wolffe AP 1994 A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus* oocytes. *Cell* 77 931-941.

Bouvet P, Matsumoto K & Wolffe AP 1995 Sequence-specific RNA recognition by the *Xenopus* Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain. *J Biol Chem* 270 28297-28303.

- Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, Temper V, Razin A & Cedar H 1994 Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 371 435-438.
- Braude PR 1979 Time-dependent effects of alpha-amanitin on blastocyst formation in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 52 193-202.
- Braun RE 2001 Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* 28 10-12.
- Braw-Tal R & Yossefi S 1997 Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 109 165-171.
- Brevini-Gandolfi TA, Favetta LA, Mauri L, Luciano AM, Cillo F & Gandolfi F 1999 Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. *Mol Reprod Dev* 52 427-433.
- Brevini TA, Lonergan P, Cillo F, Francisci C, Favetta LA, Fair T & Gandolfi F 2002 Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. *Mol Reprod Dev* 63 510-517.
- Bulger M & Groudine M 1999 Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* 13 2465-2477.
- Bustin M, Trieschmann L & Postnikov YV 1995 The HMG-14/-17 chromosomal protein family: architectural elements that enhance transcription from chromatin templates. *Semin Cell Biol* 6 247-255.
- Bustin M, Catez F & Lim JH 2005 The dynamics of histone H1 function in chromatin. *Mol Cell* 17 617-620.
- Butler JE & Kadonaga JT 2002 The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16 2583-2592.
- Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtlander T, Ferrier P, Ferrari S & Bianchi ME 1999 The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet* 22 276-280.
- Camous S, Heyman Y, Meziou W & Menezo Y 1984 Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J Reprod Fertil* 72 479-485.
- Camous S, Kopečný V & Flechon JE 1986 Autoradiographic detection of the earliest stage of [³H]-uridine incorporation into the cow embryo. *Biol Cell* 58 195-200.
- Catez F, Brown DT, Misteli T & Bustin M 2002 Competition between histone H1 and HMGN proteins for chromatin binding sites. *EMBO Rep* 3 760-766.

Catez F, Yang H, Tracey KJ, Reeves R, Misteli T & Bustin M 2004 Network of dynamic interactions between histone H1 and high-mobility-group proteins in chromatin. *Mol Cell Biol* 24 4321-4328.

Chen T & Li E 2006 Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol* 301 179-201.

Chian RC, Chung JT, Niwa K, Sirard MA, Downey BR & Tan SL 2003 Reversible changes in protein phosphorylation during germinal vesicle breakdown and pronuclear formation in bovine oocytes in vitro. *Zygote* 11 119-129.

Chin MT, Pellacani A, Wang H, Lin SS, Jain MK, Perrella MA & Lee ME 1998 Enhancement of serum-response factor-dependent transcription and DNA binding by the architectural transcription factor HMG-I(Y). *J Biol Chem* 273 9755-9760.

Chouinard LA 1971 A light- and electron-microscope study of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepubertal mouse. *J Cell Sci* 9 637-663.

Clarke HJ, Oblin C & Bustin M 1992 Developmental regulation of chromatin composition during mouse embryogenesis: somatic histone H1 is first detectable at the 4-cell stage. *Development* 115 791-799.

Coenen K, Massicotte L & Sirard MA 2004 Study of newly synthesized proteins during bovine oocyte maturation in vitro using image analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Mol Reprod Dev* 67 313-322.

Cohen PE, Pollack SE & Pollard JW 2006 Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr Rev* 27 398-426.

Cooper SJ, Trinklein ND, Anton ED, Nguyen L & Myers RM 2006 Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome. *Genome Res* 16 1-10.

Corcoran D, Fair T, Park S, Rizos D, Patel OV, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ, Boland MP, Evans AC et al. 2006 Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction* 131 651-660.

Corcoran D, Rizos D, Fair T, Evans AC & Lonergan P 2007 Temporal expression of transcripts related to embryo quality in bovine embryos cultured from the two-cell to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Mol Reprod Dev* 74 972-977.

Darnbrough CH & Ford PJ 1981 Identification in *Xenopus laevis* of a class of oocyte-specific proteins bound to messenger RNA. *Eur J Biochem* 113 415-424.

Davie JR 1997 Nuclear matrix, dynamic histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Mol Biol Rep* 24 197-207.

Davies HG, Giorgini F, Fajardo MA & Braun RE 2000 A sequence-specific RNA binding complex expressed in murine germ cells contains MSY2 and MSY4. *Dev Biol* 221 87-100.

Davis W, Jr. & Schultz RM 2000 Developmental change in TATA-box utilization during preimplantation mouse development. *Dev Biol* 218 275-283.

de Laat W & Grosveld F 2007 Inter-chromosomal gene regulation in the mammalian cell nucleus. *Curr Opin Genet Dev* 17 456-464.

de Moor CH, Meijer H & Lissenden S 2005 Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 16 49-58.

Dean W, Santos F & Reik W 2003 Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin Cell Dev Biol* 14 93-100.

Dean W, Lucifero D & Santos F 2005 DNA methylation in mammalian development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75 98-111.

Delouis C, Bonnerot C, Vernet M & Nicolas JF 1992 Expression of microinjected DNA and RNA in early rabbit embryos: changes in permissiveness for expression and transcriptional selectivity. *Exp Cell Res* 201 284-291.

Edgar BA & Schubiger G 1986 Parameters controlling transcriptional activation during early *Drosophila* development. *Cell* 44 871-877.

Eppig JJ 1991 Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* 13 569-574.

Fair T, Hyttel P & Greve T 1995 Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 42 437-442.

Fair T, Hyttel P, Greve T & Boland M 1996 Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. *Mol Reprod Dev* 43 503-512.

Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T & Boland M 1997a Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. *Mol Reprod Dev* 46 208-215.

Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T & Boland M 1997b Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryol (Berl)* 195 327-336.

Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA & Boland MP 2001 Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev* 58 186-195.

Fair T 2003 Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 78 203-216.

Farin PW, Piedrahita JA & Farin CE 2006 Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 65 178-191.

Fojas de Borja P, Collins NK, Du P, Azizkhan-Clifford J & Mudryj M 2001 Cyclin A-CDK phosphorylates Sp1 and enhances Sp1-mediated transcription. *Embo J* 20 5737-5747.

Frei RE, Schultz GA & Church RB 1989 Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J Reprod Fertil* 86 637-641.

Gagne M, Pothier F & Sirard MA 1995 Effect of microinjection time during postfertilization S-phase on bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev* 41 184-194.

Gardiner-Garden M & Frommer M 1987 CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196 261-282.

Gershenson NI & Ioshikhes IP 2005 Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis. *Bioinformatics* 21 1295-1300.

Gilbert N, Gilchrist S & Bickmore WA 2005 Chromatin organization in the mammalian nucleus. *Int Rev Cytol* 242 283-336.

Gilchrist RB, Ritter LJ & Armstrong DT 2004 Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 82-83 431-446.

Giorgini F, Davies HG & Braun RE 2001 MSY2 and MSY4 bind a conserved sequence in the 3' untranslated region of protamine 1 mRNA in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 21 7010-7019.

Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ & Schier AF 2006 Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312 75-79.

Golding MC & Westhusin ME 2003 Analysis of DNA (cytosine 5) methyltransferase mRNA sequence and expression in bovine preimplantation embryos, fetal and adult tissues. *Gene Expr Patterns* 3 551-558.

Gu P, Le Menuet D, Chung AC & Cooney AJ 2006 Differential recruitment of methylated CpG binding domains by the orphan receptor GCNF initiates the repression and silencing of Oct4 expression. *Mol Cell Biol* 26 9471-9483.

Gu W, Tekur S, Reinbold R, Eppig JJ, Choi YC, Zheng JZ, Murray MT & Hecht NB 1998 Mammalian male and female germ cells express a germ cell-specific Y-Box protein, MSY2. *Biol Reprod* 59 1266-1274.

Hahn S 2004 Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* 11 394-403.

Hara KT, Oda S, Naito K, Nagata M, Schultz RM & Aoki F 2005 Cyclin A2-CDK2 regulates embryonic gene activation in 1-cell mouse embryos. *Dev Biol* 286 102-113.

Harbour JW & Dean DC 2000 The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14 2393-2409.

Hassig CA & Schreiber SL 1997 Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. *Curr Opin Chem Biol* 1 300-308.

Heintzman ND & Ren B 2007 The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. *Cell Mol Life Sci* 64 386-400.

Henery CC, Miranda M, Wiekowski M, Wilmut I & DePamphilis ML 1995 Repression of gene expression at the beginning of mouse development. *Dev Biol* 169 448-460.

Hock R, Scheer U & Bustin M 1998a Chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17 are released from mitotic chromosomes and imported into the nucleus by active transport. *J Cell Biol* 143 1427-1436.

Hock R, Wilde F, Scheer U & Bustin M 1998b Dynamic relocation of chromosomal protein HMG-17 in the nucleus is dependent on transcriptional activity. *Embo J* 17 6992-7001.

Huang YS, Kan MC, Lin CL & Richter JD 2006 CPEB3 and CPEB4 in neurons: analysis of RNA-binding specificity and translational control of AMPA receptor GluR2 mRNA. *Embo J* 25 4865-4876.

Hyttel P, Greve T & Callesen H 1989 Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J Reprod Fertil Suppl* 38 35-47.

Hyttel P, Viuff D, Avery B, Laurincik J & Greve T 1996 Transcription and cell cycle-dependent development of intranuclear bodies and granules in two-cell bovine embryos. *J Reprod Fertil* 108 263-270.

Hyttel P, Laurincik J, Viuff D, Fair T, Zakhartchenko V, Rosenkranz C, Avery B, Rath D, Niemann H, Thomsen PD et al. 2000 Activation of ribosomal RNA genes in preimplantation cattle and swine embryos. *Anim Reprod Sci* 60-61 49-60.

Kageyama S, Liu H, Nagata M & Aoki F 2006 The role of ETS transcription factors in transcription and development of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 344 675-679.

Kastrop PM, Bevers MM, Destree OH & Kruip TA 1990 Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *J Reprod Fertil* 90 305-310.

Kastrop PM, Bevers MM, Destree OH & Kruip TA 1991 Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in vivo. *Mol Reprod Dev* 29 271-275.

Keller RW, Kuhn U, Aragon M, Bornikova L, Wahle E & Bear DG 2000 The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail. *J Mol Biol* 297 569-583.

Kim JM, Ogura A, Nagata M & Aoki F 2002 Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic nuclear transfer. *Biol Reprod* 67 760-766.

Kim NH, Cho SK, Choi SH, Kim EY, Park SP & Lim JH 2000 The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. *Zygote* 8 25-32.

Kimelman D, Kirschner M & Scherson T 1987 The events of the midblastula transition in *Xenopus* are regulated by changes in the cell cycle. *Cell* 48 399-407.

King WA, Niar A, Chartrain I, Betteridge KJ & Guay P 1988 Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos. *J Reprod Fertil* 82 87-95.

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.

Kopecny V, Flechon JE, Camous S & Fulka J, Jr. 1989 Nucleologenesis and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. *Mol Reprod Dev* 1 79-90.

Kutach AK & Kadonaga JT 2000 The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol Cell Biol* 20 4754-4764.

Lacoste N & Cote J 2003 [The epigenetic code of histones]. *Med Sci (Paris)* 19 955-959.

Laurincik J, Schmoll F, Mahabir E, Schneider H, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Prella K, Hendriksen PJ, Voss PL, Moeszlaicher GG et al. 2003 Nucleolar proteins and ultrastructure in bovine in vivo developed, in vitro produced, and parthenogenetic cleavage-stage embryos. *Mol Reprod Dev* 65 73-85.

Lavoir MC, Kelk D, Rumph N, Barnes F, Betteridge KJ & King WA 1997 Transcription and translation in bovine nuclear transfer embryos. *Biol Reprod* 57 204-213.

Lee CT, Risom T & Strauss WM 2006 MicroRNAs in mammalian development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78 129-139.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH & Kim VN 2004 MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23 4051-4060.

Lequarre AS, Marchandise J, Moreau B, Massip A & Donnay I 2003 Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biol Reprod* 69 1707-1713.

Lequarre AS, Traverso JM, Marchandise J & Donnay I 2004 Poly(A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. *Biol Reprod* 71 425-431.

Lettice LA, Horikoshi T, Heaney SJ, van Baren MJ, van der Linde HC, Breedveld GJ, Joesse M, Akarsu N, Oostra BA, Endo N et al. 2002 Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 7548-7553.

Levesque JT & Sirard MA 1996 Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biol Reprod* 55 1427-1436.

Li E, Bestor TH & Jaenisch R 1992 Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69 915-926.

Liu JH, Yin S, Xiong B, Hou Y, Chen DY & Sun QY 2007 Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. *Mol Reprod Dev*.

Lodde V, Modina S, Galbusera C, Franciosi F & Luciano AM 2007a Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. *Mol Reprod Dev* 74 740-749.

Lodde V, Modina S, Maddox-Hyttel P, Franciosi F, Lauria A & Luciano AM 2007b Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. *Mol Reprod Dev*.

Lonergan P, Fair T, Khatir H, Cesaroni G & Mermillod P 1998 Effect of protein synthesis inhibition before or during in vitro maturation on subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology* 50 417-431.

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

Mahmoudi T, Katsani KR & Verrijzer CP 2002 GAGA can mediate enhancer function in trans by linking two separate DNA molecules. *Embo J* 21 1775-1781.

Majumder S, Miranda M & DePamphilis ML 1993 Analysis of gene expression in mouse preimplantation embryos demonstrates that the primary role of enhancers is to relieve repression of promoters. *Embo J* 12 1131-1140.

Majumder S, Zhao Z, Kaneko K & DePamphilis ML 1997 Developmental acquisition of enhancer function requires a unique coactivator activity. *Embo J* 16 1721-1731.

Malik S & Roeder RG 2005 Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci* 30 256-263.

Manejwala FM, Logan CY & Schultz RM 1991 Regulation of hsp70 mRNA levels during oocyte maturation and zygotic gene activation in the mouse. *Dev Biol* 144 301-308.

Marmorstein R 2001 Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 422-432.

Martinez-Salas E, Linney E, Hassell J & DePamphilis ML 1989 The need for enhancers in gene expression first appears during mouse development with formation of the zygotic nucleus. *Genes Dev* 3 1493-1506.

Massicotte L, Coenen K, Mourot M & Sirard MA 2006 Maternal housekeeping proteins translated during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Proteomics* 6 3811-3820.

Matsumoto K, Tanaka KJ, Aoki K, Sameshima M & Tsujimoto M 2003 Visualization of the reconstituted FRGY2-mRNA complexes by electron microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 306 53-58.

Mattson BA & Albertini DF 1990 Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol Reprod Dev* 25 374-383.

McGraw S, Robert C, Massicotte L & Sirard MA 2003 Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biol Reprod* 68 383-389.

McGraw S, Vigneault C & Sirard MA 2007 Temporal expression of factors involved in chromatin remodeling and in gene regulation during early bovine in vitro embryo development. *Reproduction* 133 597-608.

McKnight SL & Miller OL, Jr. 1976 Ultrastructural patterns of RNA synthesis during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 8 305-319.

McLay DW & Clarke HJ 2003 Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* 125 625-633.

- Meinhart A, Kamenski T, Hoepfner S, Baumli S & Cramer P 2005 A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* 19 1401-1415.
- Memili E, Dominko T & First NL 1998 Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 51 36-41.
- Memili E & First NL 1998 Developmental changes in RNA polymerase II in bovine oocytes, early embryos, and effect of alpha-amanitin on embryo development. *Mol Reprod Dev* 51 381-389.
- Memili E & First NL 1999 Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol Reprod* 61 1198-1207.
- Memili E & First NL 2000 Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8 87-96.
- Mendez R & Richter JD 2001 Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 521-529.
- Minami N, Suzuki T & Tsukamoto S 2007 Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *J Reprod Dev* 53 707-715.
- Misirlioglu M, Page GP, Sagirkaya H, Kaya A, Parrish JJ, First NL & Memili E 2006 Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 18905-18910.
- Mohamed OA, Bustin M & Clarke HJ 2001 High-mobility group proteins 14 and 17 maintain the timing of early embryonic development in the mouse. *Dev Biol* 229 237-249.
- Muller HP & Schaffner W 1990 Transcriptional enhancers can act in trans. *Trends Genet* 6 300-304.
- Narlikar GJ, Fan HY & Kingston RE 2002 Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108 475-487.
- Natale DR, Kidder GM, Westhusin ME & Watson AJ 2000 Assessment by differential display-RT-PCR of mRNA transcript transitions and alpha-amanitin sensitivity during bovine preattachment development. *Mol Reprod Dev* 55 152-163.
- Newport J & Kirschner M 1982a A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription. *Cell* 30 687-696.
- Newport J & Kirschner M 1982b A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* 30 675-686.

- Nickerson J 2001 Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci* 114 463-474.
- Nordhoff V, Hubner K, Bauer A, Orlova I, Malapetsa A & Scholer HR 2001 Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mamm Genome* 12 309-317.
- Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ & DePamphilis ML 1995 Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J Biol Chem* 270 22077-22080.
- Orphanides G & Reinberg D 2002 A unified theory of gene expression. *Cell* 108 439-451.
- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S & Suzuki T 1997 Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 48 769-774.
- Ovitt CE & Scholer HR 1998 The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol Hum Reprod* 4 1021-1031.
- Palancade B, Bellier S, Almouzni G & Bensaude O 2001 Incomplete RNA polymerase II phosphorylation in *Xenopus laevis* early embryos. *J Cell Sci* 114 2483-2489.
- Paynton BV, Rempel R & Bachvarova R 1988 Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Dev Biol* 129 304-314.
- Pederson T 2000 Half a century of "the nuclear matrix". *Mol Biol Cell* 11 799-805.
- Pepling ME 2006 From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis* 44 622-632.
- Plante L, Plante C, Shepherd DL & King WA 1994 Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. *Mol Reprod Dev* 39 375-383.
- Poueymirou WT & Schultz RM 1989 Regulation of mouse preimplantation development: inhibition of synthesis of proteins in the two-cell embryo that require transcription by inhibitors of cAMP-dependent protein kinase. *Dev Biol* 133 588-599.
- Pugh BF 2006 HATs off to PIC assembly. *Mol Cell* 23 776-777.
- Reeves R 1992 Chromatin changes during the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 4 413-423.
- Reeves R & Beckerbauer L 2001 HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta* 1519 13-29.
- Richter JD 2007 CPEB: a life in translation. *Trends Biochem Sci* 32 279-285.

Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP & Lonergan P 2002a Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev* 62 320-327.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP & Lonergan P 2002b Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61 234-248.

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.

Ro S, Song R, Park C, Zheng H, Sanders KM & Yan W 2007 Cloning and expression profiling of small RNAs expressed in the mouse ovary. *Rna*.

Robert C, Hue I, McGraw S, Gagne D & Sirard MA 2002 Quantification of cyclin B1 and p34(cdc2) in bovine cumulus-oocyte complexes and expression mapping of genes involved in the cell cycle by complementary DNA macroarrays. *Biol Reprod* 67 1456-1464.

Robinson PJ & Rhodes D 2006 Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol* 16 336-343.

Ronfani L, Ferraguti M, Croci L, Ovitt CE, Scholer HR, Consalez GG & Bianchi ME 2001 Reduced fertility and spermatogenesis defects in mice lacking chromosomal protein Hmgb2. *Development* 128 1265-1273.

Ross ED, Hardwidge PR & Maher LJ, 3rd 2001 HMG proteins and DNA flexibility in transcription activation. *Mol Cell Biol* 21 6598-6605.

Ruddock-D'Cruz NT, Xue J, Wilson KJ, Heffernan C, Prashadkumar S, Cooney MA, Sanchez-Partida LG, French AJ & Holland MK 2008 Dynamic changes in the localization of five members of the methyl binding domain (MBD) gene family during murine and bovine preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev* 75 48-59.

Ruzanov PV, Evdokimova VM, Korneeva NL, Hershey JW & Ovchinnikov LP 1999 Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *J Cell Sci* 112 (Pt 20) 3487-3496.

Saeki K, Nagao Y, Kishi M & Nagai M 1997 Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine. *Theriogenology* 48 1161-1172.

Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y & Hume DA 2007 Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet* 8 424-436.

Schultz RM 1993 Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays* 15 531-538.

Segev H, Memili E & First NL 2001 Expression patterns of histone deacetylases in bovine oocytes and early embryos, and the effect of their inhibition on embryo development. *Zygote* 9 123-133.

Serman A, Vlahovic M, Serman L & Bulic-Jakus F 2006 DNA methylation as a regulatory mechanism for gene expression in mammals. *Coll Antropol* 30 665-671.

Shi K, Yuan X, Du L, Pan D, Zhang Y, Zhao Y, Deng X, Hu X, Wu C & Li N 2007 Advanced methods of isolation and identification of porcine primordial follicles. *Anim Reprod Sci* 101 163-171.

Simon M, Jilek F & Fulka J, Jr. 1989 Effect of cycloheximide upon maturation of bovine oocytes. *Reprod Nutr Dev* 29 533-540.

Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML & First NL 1989 Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 40 1257-1263.

Sirard MA 2001 Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55 1241-1254.

Sirard MA, Dufort I, Coenen K, Tremblay K, Massicotte L & Robert C 2003 The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reprod Suppl* 61 117-129.

Sirard MA, Richard F, Blondin P & Robert C 2006 Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65 126-136.

Smale ST & Kadonaga JT 2003 The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72 449-479.

Soop T, Nashchekin D, Zhao J, Sun X, Alzhanova-Ericsson AT, Bjorkroth B, Ovchinnikov L & Daneholt B 2003 A p50-like Y-box protein with a putative translational role becomes associated with pre-mRNA concomitant with transcription. *J Cell Sci* 116 1493-1503.

Spada F, Brunet A, Mercier Y, Renard JP, Bianchi ME & Thompson EM 1998 High mobility group 1 (HMG1) protein in mouse preimplantation embryos. *Mech Dev* 76 57-66.

Stebbins-Boaz B, Cao Q, de Moor CH, Mendez R & Richter JD 1999 Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol Cell* 4 1017-1027.

Sun QY 2003 Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microsc Res Tech* 61 342-348.

Suzuki Y, Tsunoda T, Sese J, Taira H, Mizushima-Sugano J, Hata H, Ota T, Isogai T, Tanaka T, Nakamura Y et al. 2001 Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Res* 11 677-684.

Szutorisz H, Dillon N & Tora L 2005 The role of enhancers as centres for general transcription factor recruitment. *Trends Biochem Sci* 30 593-599.

Tafuri SR & Wolffe AP 1990 *Xenopus* Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 9028-9032.

Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA, Lee C, Tarakhovsky A, Lao K & Surani MA 2007 Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 21 644-648.

Telford NA, Watson AJ & Schultz GA 1990 Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26 90-100.

Thomas MC & Chiang CM 2006 The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41 105-178.

Thompson EM, Legouy E, Christians E & Renard JP 1995 Progressive maturation of chromatin structure regulates HSP70.1 gene expression in the preimplantation mouse embryo. *Development* 121 3425-3437.

Thompson PR, Wang D, Wang L, Fulco M, Pediconi N, Zhang D, An W, Ge Q, Roeder RG, Wong J et al. 2004 Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop. *Nat Struct Mol Biol* 11 308-315.

Tolic-Norrelykke SF, Rasmussen MB, Pavone FS, Berg-Sorensen K & Oddershede LB 2006 Stepwise bending of DNA by a single TATA-box binding protein. *Biophys J* 90 3694-3703.

Tomek W, Torner H & Kanitz W 2002 Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reprod Domest Anim* 37 86-91.

Traverso JM, Donnay I & Lequarre AS 2005 Effects of polyadenylation inhibition on meiosis progression in relation to the polyadenylation status of cyclins A2 and B1 during in vitro maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 71 107-114.

Tremblay K, Vigneault C, McGraw S & Sirard MA 2005 Expression of cyclin B1 messenger RNA isoforms and initiation of cytoplasmic polyadenylation in the bovine oocyte. *Biol Reprod* 72 1037-1044.

Turner BM 2000 Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22 836-845.

Vaccari T, Beltrame M, Ferrari S & Bianchi ME 1998 Hmg4, a new member of the Hmg1/2 gene family. *Genomics* 49 247-252.

Veenstra GJ, Destree OH & Wolffe AP 1999 Translation of maternal TATA-binding protein mRNA potentiates basal but not activated transcription in *Xenopus* embryos at the midblastula transition. *Mol Cell Biol* 19 7972-7982.

Vigneron C, Perreau C, Dalbies-Tran R, Joly C, Humblot P, Uzbekova S & Mermillod P 2004 Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. *Mol Reprod Dev* 69 457-465.

Viuff D, Avery B, Greve T, King WA & Hyttel P 1996 Transcriptional activity in in vitro produced bovine two- and four-cell embryos. *Mol Reprod Dev* 43 171-179.

Wade PA 2001 Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* 23 1131-1137.

Wang Q & Latham KE 1997 Requirement for protein synthesis during embryonic genome activation in mice. *Mol Reprod Dev* 47 265-270.

Watson AJ 1992 The cell biology of blastocyst development. *Mol Reprod Dev* 33 492-504.

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M & Schubeler D 2007 Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39 457-466.

Weber M & Schubeler D 2007 Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr Opin Cell Biol* 19 273-280.

Weston A & Sommerville J 2006 Xp54 and related (DDX6-like) RNA helicases: roles in messenger RNP assembly, translation regulation and RNA degradation. *Nucleic Acids Res* 34 3082-3094.

Wiekowski M, Miranda M & DePamphilis ML 1991 Regulation of gene expression in preimplantation mouse embryos: effects of the zygotic clock and the first mitosis on promoter and enhancer activities. *Dev Biol* 147 403-414.

Wiekowski M, Miranda M & DePamphilis ML 1993 Requirements for promoter activity in mouse oocytes and embryos distinguish paternal pronuclei from maternal and zygotic nuclei. *Dev Biol* 159 366-378.

Wolffe AP 1991 Implications of DNA replication for eukaryotic gene expression. *J Cell Sci* 99 (Pt 2) 201-206.

Woodland HR & Adamson ED 1977 The synthesis and storage of histones during the oogenesis of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 57 118-135.

Worrad DM, Ram PT & Schultz RM 1994 Regulation of gene expression in the mouse oocyte and early preimplantation embryo: developmental changes in Sp1 and TATA box-binding protein, TBP. *Development* 120 2347-2357.

Woychik NA & Hampsey M 2002 The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108 453-463.

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 Dev* 17 23-35.

Yang J, Medvedev S, Reddi PP, Schultz RM & Hecht NB 2005 The DNA/RNA-binding protein MSY2 marks specific transcripts for cytoplasmic storage in mouse male germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 1513-1518.

Yang J, Morales CR, Medvedev S, Schultz RM & Hecht NB 2007 In the absence of the mouse DNA/RNA-binding protein MSY2, messenger RNA instability leads to spermatogenic arrest. *Biol Reprod* 76 48-54.

Yie J, Merika M, Munshi N, Chen G & Thanos D 1999 The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome. *Embo J* 18 3074-3089.

Young LE & Beaujean N 2004 DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep. *Anim Reprod Sci* 82-83 61-78.

Yu J, Hecht NB & Schultz RM 2001 Expression of MSY2 in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol Reprod* 65 1260-1270.

Yu J, Deng M, Medvedev S, Yang J, Hecht NB & Schultz RM 2004 Transgenic RNAi-mediated reduction of MSY2 in mouse oocytes results in reduced fertility. *Dev Biol* 268 195-206.

Zaidi SK, Young DW, Choi JY, Pratap J, Javed A, Montecino M, Stein JL, van Wijnen AJ, Lian JB & Stein GS 2005 The dynamic organization of gene-regulatory machinery in nuclear microenvironments. *EMBO Rep* 6 128-133.

Zhao Y & Srivastava D 2007 A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci* 32 189-197.

Zuccotti M, Boiani M, Ponce R, Guizzardi S, Scandroglio R, Garagna S & Redi CA 2002 Mouse Xist expression begins at zygotic genome activation and is timed by a zygotic clock. *Mol Reprod Dev* 61 14-20.

**CHAPITRE II : QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DE
FACTEURS DE TRANSCRIPTION DANS L'EMBRYON BOVIN PRÉ-
MET.**

**CHAPTER II : TRANSCRIPTION FACTOR EXPRESSION
PATTERNS IN BOVINE IN VITRO-DERIVED EMBRYOS PRIOR TO
THE MATERNAL TO EMBRYONIC TRANSITION.**

Cet article est publié dans la revue "Biology of Reproduction" sous la référence suivante:
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

2.1 RÉSUMÉ

La transition maternelle embryonnaire (MET) est un phénomène complexe caractérisé par l'initiation de la transcription dans l'embryon dans le but de remplacer les ARNm maternels par de nouveaux ARNm de provenance embryonnaire. Pour avoir lieu, cette activation de la transcription nécessite la présence d'une multitude de facteurs et conditions favorables. Une de nos hypothèses qui pourrait expliquer le silence transcriptionnel dans le jeune embryon pré-MET est que ces embryons possèdent une machinerie transcriptionnelle incomplète ou réprimée. Selon cette hypothèse, l'expression ou l'apparition de régulateurs et facteurs de transcription « fonctionnels » devraient avoir lieu juste avant la MET pour assurer à l'embryon une machinerie transcriptionnelle adéquate et complète. Ainsi, dans cette étude, nous avons mesuré les profils de niveaux d'ARNm de divers facteurs ou régulateurs de transcription lors du développement embryonnaire bovin. La technique de PCR quantitatif en temps réel a été utilisée afin de quantifier les niveaux d'ARNm de quinze facteurs de transcription (*YY1*, *HMGAI*, *RY-1*, *P300*, *CREB*, *YAP65*, *HMGNI*, *HMGB1*, *NFAR*, *OCT-4*, *TEAD2*, *ATF-1*, *HMGN2*, *MSY2* and *TBP*) dans les ovocytes matures et immatures ainsi que dans les stades embryonnaires 2-, 4- et 8-cellules ainsi que dans les blastocystes, tous produits par fécondation *in vitro*. Bien que tous les gènes étudiés ont été retrouvés dans les embryons pré-MET, nos résultats ont permis d'établir cinq différents profils des niveaux d'ARNm et de regrouper les gènes évalués selon le profile des niveaux de son transcrit. À la lumière de ces résultats et de ceux précédemment obtenus chez d'autres espèces pour les mêmes gènes, il est bien probable que certains des facteurs de transcriptions considérés dans cette étude aient un rôle à jouer dans la MET chez le bovin.

2.2 ABSTRACT

Maternal to embryonic transition (MET) is a complex phenomenon characterized by the initiation of transcription in the embryo and the replacement of maternal mRNA with embryonic mRNA. In order for this to occur, transcriptional activation requires various factors and conditions. Our hypothesis is that the lack of transcription in the bovine pre-MET embryo is due, in part, to an incomplete or dormant transcriptional apparatus. Therefore, in accordance with this hypothesis, functioning transcriptional mechanisms should appear in the 8-cell bovine embryo to facilitate embryonic transcription during the MET. With this in mind, we examined the presence of selected transcription factors in pre-attachment embryo development to establish how their transcript levels change in bovine pre-MET embryos. To achieve this goal, real-time RT-PCR was used to quantify the mRNA level of several different transcription factors (*YY1*, *HMGAI*, *RY-1*, *P300*, *CREB*, *YAP65*, *HMGNI*, *HMGB1*, *NFAR*, *OCT-4*, *TEAD2*, *ATF-1*, *HMGN2*, *MSY2* and *TBP*) in germinal vesicle (GV) and metaphase II (MII) bovine oocytes and in 2-, 4-, 8-cell and blastocyst stage embryos produced in vitro. Our results demonstrate that all genes examined can be grouped into five different categories according to their mRNA expression patterns at the developmental stages observed. To summarize, all transcription factors studied were present in pre-MET embryos and the expression pattern of a many of them suggest a potential role in MET.

2.3 INTRODUCTION

As observed in others species, the mRNA and protein content of the bovine oocyte supports the embryo's first instances of life. It is believed that the mRNAs and proteins acquired by the oocyte during its growth and final maturation allow the zygote to go through the early stages of embryo development up until the moment when the embryo produces these factors on its own. The point at which embryonic transcription begins and maternal mRNA is replaced by embryonic is referred to as the maternal to embryonic transition (MET). This takes place at different periods, depending on the species (reviewed in [1, 2]). For example, MET occurs from the end of the 1-cell stage until the 2-cell stage in mice [3], at the 4- to 8-cell stage in humans [2] and in 4000- to 8000-cell embryos (stage 8-8.5) in *Xenopus* [4]. Although the bovine MET occurs at the 8- to 16- cell stage and is characterized by a major onset of transcription, minor transcription is observed as early as the 1-cell embryo [5]. The MET is thought to be an important and limiting step of development since it coincides with a "developmental block" observed in embryos cultured *in vitro* [6].

Many components and conditions are likely required to enhance transcription in the young embryo and most still remain to be identified. Evidence in mice suggest that DNA replication during embryo cleavage is a triggering event for MET [7]. However, in the bovine, MET occurs after three embryonic divisions suggesting another level of regulation. Therefore, in species with a MET occurring after more than one cleavage, pre-MET embryos transcriptional silence is probably due to a transcriptional non-permissive chromatin state and inefficient transcriptional apparatus.

Different factors are involved in chromatin remodelling to produce a transcriptional permissive chromatin state. Histone acetyltransferases (HAT) are proteins that acetylate the histone tails of the nucleosome and consequently relax the chromatin, leading to DNA that is more accessible to transcription factors (reviewed in [8]). Some studies have already revealed the importance of histone acetylation in MET [9, 10] and expression studies of HAT throughout bovine embryo development have been carried out [11]. In addition to

HAT, other factors may promote transcription by modifying chromatin conformation. This is the role of High Mobility Group (HMG) proteins, a family of chromosomal proteins that act as a structural element of the chromatin without being histones. HMG activity tends to produce a chromatin conformation that improves transcription [12]. In general, a balance between many chromatin-remodelling factors is probably necessary for transcription.

Once the chromatin conformation is adequate and permits the binding of transcription factors, these factors must be present and active to bind this DNA and transcribe the required genes. Transcription factors may be separated in two basic categories: general transcription factors and specific factors. General transcription factors encompass those required for basal transcription by the RNA polymerase II and include the TATA-binding protein (*TBP*) (reviewed in [13]). The other transcription factors and coactivators are proteins that bind specific DNA sequences in the promoters or enhancers of genes, or bind other transcription factors to recruit the basal transcription machinery to the promoter and facilitate transcription [13, 14].

It can be hypothesized that a virtual lack of transcription in the bovine embryo, prior to the 8-cell stage, is in part due to an absent or inefficient transcriptional apparatus. In the present study, we investigate the mRNA expression patterns of fifteen different transcription factors believed to play a potential role in early transcription during bovine embryo development. A real-time RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) approach was used to quantify the transcript level of each factor at different bovine pre-attachment embryonic stages from GV oocytes to blastocysts. The factors studied (listed in Table 2.1) are from many different families and were chosen for their suspected role in MET based on previously published data showing their presence or activity around the MET in other species.

The fifteen genes of interest evaluated in the present study were allocated to five different groups dependent on the appearance of their respective expression patterns. This study represents the first known attempt to evaluate the presence of transcription factors in pre-MET embryos and opens the door to future studies on factors with potential roles in

bovine MET based on their mRNA expression pattern. It is also suspected that a combination of different factors is required for such dramatic changes in gene expression, supporting the multi-gene analysis approach of this study.

2.4 MATERIALS AND METHODS

Note that all chemicals were obtained from Sigma-Aldrich, St-Louis, Mo, USA, unless otherwise stated.

2.4.1 Oocyte recovery and selection

Bovine ovaries were collected at a commercial slaughterhouse and transported to the laboratory in a 0.9% NaCl aqueous solution containing antimycotic agent. Cumulus-oocyte complexes (COCs) from 3- to 6-mm follicles were collected with an 18-g needle attached to a 10 mL syringe. Healthy COCs with at least 5 layers of cumulus were selected to proceed. The cumulus cells were removed mechanically by vortexing. The denuded oocytes were placed in PBS solution and washed generously, at least 3 times, to ensure the absence of contamination by cumulus cells. Groups of 40 GV oocytes were then frozen in a minimal volume of PBS and stored at -80°C until RNA extraction.

2.4.2 *In vitro* maturation

COCs with the same characteristics described above for GV oocytes were put through *in vitro* maturation after three washes in HEPES buffered Tyrode's medium (TLH) supplemented with 0.3% bovine serum albumin (BSA fraction V), 0.2 mM pyruvic acid and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin. Groups of 10 COCs were placed in droplets of media under mineral oil. Each droplet consisted of 50 μL of maturation medium composed of modified synthetic oviductal fluid (SOF) medium (Holm *et al.*, 1999) with 0.8% BSA, MEM nonessential amino acids (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada), MEM essential amino acids (Gibco) as well as 1 mM glutamine supplemented with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FSH, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LH

and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 17 β -estradiol. The droplets containing COCs were incubated in a humidified atmosphere for 24 h at 38.5°C with 5% CO_2 . Metaphase II (MII) oocytes were collected at that time and mechanically denuded by vortexing. The oocytes were washed at least 3 times with PBS to completely remove any contaminating cumulus cells. The MII oocytes were then frozen in groups of 40 in a minimal volume of PBS and stored at -80 °C until RNA extraction.

2.4.3 *In vitro* fertilization

For *in vitro* fertilization, 5 matured COCs were added to 48 μL droplets under mineral oil. The droplets were composed of modified Tyrode lactate medium, supplemented with 0.6% BSA fatty acid free (Sigma-Aldrich), 0.2 mM pyruvic acid, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heparin and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin. Prior to transfer, the COCs were washed twice in HEPES-buffered TL medium (TLH). Once transferred, 2 μL of PHE (1mM hypotaurine, 2 mM penicillamine, 250 mM epinephrine) were added to each droplet ~10 min before semen was added. The semen used consisted of a cryopreserved mixture of ejaculates from three bulls (Centre d'Insémination Artificielle du Québec; CIAQ, St-Hyacinthe, Qc, Canada). The semen was thawed in 37°C water for 1 min, put on a discontinuous Percoll gradient (2 mL of 45% Percoll over a 2 mL of 90% Percoll) and centrifuged at 700g for 30 min at 26°C. The pellet was resuspended in 1 mL of modified Tyrode's medium (TALP) and centrifuged at 250g for 5 min at 26°C. The supernatant was discarded and the spermatozoa were resuspended in IVF medium after being counted on a hemocytometer to obtain a final concentration of 1×10^6 cells/mL. Finally, 2 μL of the sperm suspension were added in each droplet and the incubation took place in a humidified atmosphere at 38.5°C, in 5% CO_2 for 15-18 h.

2.4.4 *In vitro* culture

Following fertilization, presumably zygotes were mechanically denuded by repeated pipetting, washed 3 times in PBS containing 0.3% BSA for complete removal of cumulus cells from solution and transferred to culture droplets (50 μL) in groups of 20-30 embryos.

Embryo culture was performed in modified synthetic oviduct fluid (SOF 1) under mineral oil at 38.5°C in 5% CO₂ in a reduced oxygen atmosphere (7%) with high humidity. SOF 1 medium was replaced after 72 h by SOF 2 to prevent toxicity due to ammonium accumulation resulting from amino acid degradation. The SOF 1 medium contained 0.8% BSA, MEM nonessential amino acids, 1 mM glutamine, 1.5 mM glucose and 10 µM EDTA. The SOF 2 medium contained 0.8% BSA, MEM nonessential amino acids, MEM essential amino acids, 1mM glutamine and 1.5 mM glucose. The effectiveness of the SOF system for bovine *in vitro* embryo development have already been shown (Ali & Sirard, 2002). The 2-, 4- and 8-cells embryos were collected 36 h, 48 h and 72 h post fertilization, respectively and blastocysts were collected after 7 days of development. All were washed 3 times in PBS, collected in groups of 40 in small volumes of PBS, frozen and stored at –80°C until RNA extraction. Note that all collected embryos were derived from populations of embryos that had cleaved at 36 h post fertilization (hpf). This criterion was used to identify embryos of superior quality. All oocyte and embryo pools were collected and analysed in triplicate.

2.4.5 RNA extraction and cDNA preparation

GFP RNA was transcribed from a partial GFP sequence cloned into pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA), to which a poly (A) tail of 21 bp was added. The GFP fragment that we cloned was isolated from the pHGFP-S65T vector (Clontech, Palo Alto, CA, USA) and corresponds to the sequence of the fragment between bases 892 to 1598 of the GenBank accession number sequence #U43284. This exogenous RNA was produced by *in vitro* transcription of the construct using the AmpliScribe™ T7 High Yield Transcription Kit (EPICENTRE, Madison, WI, USA). One pg of this exogenous RNA containing a poly-A tail was added to each pool of oocytes and embryos before RNA extraction. Thus, the RNA extractions of the oocytes or embryos pools containing GFP RNA were performed using the Absolutely RNA™ Microprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and the RNA was recovered by two subsequent 50 µL elutions with warmed (60°C) elution buffer provided in the kit. The RNA extraction procedure includes a DNase I treatment to remove genomic DNA. The RNA was precipitated with 10 µL of 3 M

sodium acetate pH 5.2, 2.5 μL of 1 mg/mL linear acrylamide (Ambion, Austin, TX, USA) and 100 μL of 100% isopropanol. The pellets were washed with cold EtOH 75%. Air-dried pellets were dissolved in 14.75 μL of 1.36 μM oligo_{dT(18)} (to obtain a final concentration of 1 μM after addition of the reverse transcriptase mix). To denature the RNA and remove secondary structures, the RNA was heated at 65°C for 5 min and then quenched rapidly on ice for 3min. A mix containing 2 μL of Omniscript 5X Buffer (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), 2 μL of 50 μM dNTPs (Qiagen), 0.25 μL of 40 U/ μL of RNASIN (Promega) and 1 μL of Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen) was then added to each tube. The reactions were then incubated at 37°C for 2 h.

2.4.6 Real-time polymerase chain reaction (PCR)

The primers for each gene were designed using Primer3 web interface [42] and from consensus sequences generally derived from human and mouse sequences from NCBI. Primers sequences are shown in Table 2.2. For each gene examined, a standard curve, consisting of PCR products purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and quantified with a spectrophotometer, was included in the run. The standard curve consisted of 4 standards of the purified PCR products diluted from 0.1pg to 0.1fg. Real-time PCR was executed on a Lightcycler apparatus (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) using SYBR green incorporation. The reaction was performed in capillaries and in a final volume of 20 μL (Roche). Each capillary contained the cDNA corresponding to a single oocyte or embryo and a reaction mixture consisting of: 0.5 μL of 10 μM of each primer; 1.6 μL of 25mM MgCl₂ (final concentration of 3mM); 2 μL of the SYBR green mix containing dNTPs; FastStart DNA polymerase enzyme and buffer (Roche). The PCR conditions used for all genes were as follows: denaturing cycle of 10min at 95°C; 40-50 PCR cycles (Denaturing: 95°C for 1sec, Annealing: Temperature (see Table 2.2) for 5sec, Extension: 72°C for 20sec); a melting cycle consisting of 95°C for 1sec, 70°C for 30sec and of a step cycle starting at 70°C up to 95°C with a 0.2°C/sec transition rate; a final cooling cycle of 40°C for 30sec. The cDNA quantification was performed using Lightcycler Software Version 3.5 (Roche) with comparison to the standard curve. The first gene to be quantified was the exogenous GFP. The GFP quantity obtained for each pool was used to

correct the values obtained for each gene. The pool showing the highest GFP level was designated the reference pool and the values of GFP obtained from each pool were then divided by the reference pool value. The values obtained for each gene in each pool were then divided by the correcting value of the corresponding pool. These calculations compensate for experimental errors caused by the technique or the materials used for the RNA extraction and reverse transcription. The real-time PCR product specificity was confirmed by analysis of the melting curve given by the Lightcycler software (Roche). The products were then migrated on agarose gel electrophoresis and were sequenced to confirm that the proper product was amplified.

2.4.7 Statistical analysis

Normalization of the results obtained for individual genes, within each pool of cDNA, was performed by calculating each as a ratio to the level of GFP RNA. Data are presented as mean \pm SEM. Statistically significant differences in mRNA level between each developmental stage were calculated by Student LSD (Least Significant Difference) test. Differences were considered statistically significant at the 95% confidence level ($P < 0.05$).

2.5 RESULTS

Our results show that all the factors examined are present throughout the period studied (i.e. from GV oocytes to the blastocyst stage). The transcription factors examined were classified into five groups, based on their expression patterns throughout these developmental stages. The results have been presented in five different Figures (Figs. 2.1 to 2.5) and significant differences between each group can be observed. Figures 2.1, 2.2 and 2.3 show genes with similar expression patterns. Indeed, the mRNA level of these genes decreases from the GV oocyte stage up until the 8-cell stage where it reach it lowest level, according to the stages studied. Also, for all these genes, except *NFAR*, a significant increase is observed in the blastocyst level compared to the 8-cell stage level. The primary difference between the first three groups (Figs. 2.1 to 2.3) is the mRNA profile for the GV

oocytes to the 8-cell embryos. For the transcription factors *HMGAI* and *YYI* (Figure 2.1), one can see a major decrease of the mRNA level during oocyte maturation. While for *RY-1*, *CREB*, *P300*, *HMGNI* and *YAP65*, the first reduction in mRNA level is observed between MII and the 2-cell stage (Figure 2.2). Although a major decrease in *RY-1* mRNA level occurs after oocyte maturation, a slight decrease during maturation is also observed. Finally, for the genes presented in Figure 2.3, the maternal mRNA level undergoes its first significant decrease later in development. That is, for *HMGB1*, *NFAR* and *TEAD2* this reduction occurs at the 4-cell stage, while for *OCT-4* it occurs at the 8-cell stage. The group of genes shown in Figures 2.1 to 2.3 presents expression patterns very similar to those of various housekeeping genes during the same period [43]. These patterns are characterized by a relatively high level of mRNA in the GV oocyte, followed by a decrease until the 8-cell stage, caused by the turnover of the maternal supply. Then finally, an expression of these genes is observed after the MET, deduced from the high level of mRNA at blastocyst stage compared to 8-cell stage.

In contrast, Figure 2.4 shows a single transcription factor, *ATF-1*, which has a constant level of mRNA in all embryonic stages examined. Unlike the other factors studied, *ATF-1* shows no significant decrease in mRNA level at any stage. We are unable to determine at this point if *ATF-1* transcripts observed at the 8-cell stage are of maternal or embryonic origin.

Finally, the last group illustrated in Figure 2.5 includes transcription factors *HMGN2* and *TBP* and *MSY2*, a translation repressor, that are present at a higher level in oocytes, 2- and 4-cell embryos compared to 8-cell embryos and blastocysts. Unlike for the other factors evaluated, the mRNA level of these genes do not increases significantly after embryonic genome activation or at the blastocyst stage. However, there is a significant decrease in the mRNA level during the meiotic maturation, after which mRNA levels remain stable until it decreases at the 8-cell stage and remains low in blastocyst stage.

2.6 DISCUSSION

All of the genes evaluated in this study are present in mRNA form in all pre-MET embryo stages. This suggests that the early embryo could translate these mRNAs into proteins to use these factors during development. Of interest is the fact that the highest level of mRNA is found in the GV oocytes for all the genes examined except for *HMGB1*, *OCT-4* and *TEAD2*. These three factors tend to be present at their highest level in the blastocyst. This indicates that the oocyte contains large stocks of mRNA of each factor that can be used for translation if the corresponding protein is required for transcription in early embryo development. Furthermore, given that they are strongly present in the oocyte, and presence diminishes up until MET, one would assume that these factors are of maternal origin. Nevertheless, an important point to consider is that this study was done on in vitro cultured embryos. It has been shown recently that differences exist between in vivo and in vitro cultured oocytes and embryos, especially in gene expression [44, 45]. It's important to consider this while interpreting the results of this study.

In the case of *HMGAI* and *YYI* (Figure 2.1), the mRNA population diminishes during oocyte meiotic maturation. It has been shown that elevated protein synthesis occurs at the GVBD period in bovine oocytes during *in vitro* maturation [46]. *HMGAI* and *YYI* mRNA recruitment by the translation machinery and subsequent degradation during maturation could explain the mRNA diminution observed, as this commonly occurs to many transcripts when they are translated [47, 48]. After this initial decrease, mRNA level is stable from the MII oocyte to the 4-cell stage, and then decline once again at the 8-cell stage. Assuming that a diminution in mRNA level indicates mRNA translation, this suggests the need for these factors in early steps of development for post maturation oocytes or early embryos. Thus, it appears that in bovine embryos, *YYI* could be involved in pre-MET transcription if it is translated during meiotic maturation. Furthermore, if *YYI* is present at the 8-cell stage or is translated at the 4- or 8-cell stages, it could participate in the MET. Previous expression studies of *HMGAI* in mouse embryos have shown that its mRNA is present before and during the MET and disappears soon after at the 8-cell stage [49]. In the present study, we do not observe this response in the bovine system, as levels

of *HMGAI* transcript is relatively low at the MET. An important point to consider is that our primers amplified the 3 known isoforms of *HMGAI* (*HMGAIa*, *HMGAIb* and *HMGAIc*). Nevertheless, our results suggest that *HMGAI* is present at the stages evaluated and could be involved in chromatin relaxation to promote pre-MET transcription or even in the chromatin remodeling of the male pronucleus.

The expression patterns of *RY-1*, *P300*, *CREB*, *YAP65* and *HMGNI* illustrated in Figure 2.2, are slightly different from patterns presented in Figure 2.1. In this case the first significant decrease in mRNA level occurs between the MII oocyte and 2-cell embryo stage, suggesting a possible production of proteins for pre-MET transcription and the following steps of development. The other mRNA decrease happens between the 4- and 8-cell stages, which could be related to the translation of new proteins implicated in embryonic gene activation. With its special constitution, it is possible that *RY-1* is implicated in the rearrangement of pronucleus chromatin following fertilization or mRNA splicing following transcription in early embryos [19]. The importance of this protein would explain why oocytes with good developmental competence contain higher amounts of *RY-1* than poorer ones [18]. Considering that *P300* and *CREB* are master switch genes and that we have shown they are present during early embryo development, one could propose that they play a significant role in transcription before or during the MET. Although an EST database analysis on 2-cell mouse embryos revealed the presence of *YAP65* [25], no studies describing the expression patterns of *YAP65* during pre-attachment embryo development have been published to date. These results show the presence of *YAP65* in mammalian early development and imply a role for this factor in the MET. For the remaining gene, *HMGNI*, expression studies in the mouse have revealed elevated transcript level in the GV oocytes and the lowest level in the 2-cell embryos [27]. If the MET timing difference between the mouse and bovine are considered, these results coincide with those of the current study in which the lowest quantity of *HMGNI* transcript is found in the 8-cell bovine embryo. Since our results are consistent with those obtained in the mouse, one could infer a role for *HMGNI* in bovine embryos transcription, principally the MET.

The group of factors presented in Figure 2.3, demonstrate constant mRNA level from the GV oocytes to the 2-cell embryos for *HMGB1*, *NFAR* and *TEAD2*, or up until the 4-cell stage in the case of *OCT-4*. The fact that this mRNA is conserved for such an extended period (12 to 36 hours considering the moment of collection of the embryos) reinforces the idea that these genes could be involved in the MET. *HMGB1* expression studies in mouse embryos have revealed a very weak presence of *HMGB1* mRNA and protein in 1- and 2-cell embryos compared to other stages [50]. These results suggest that *HMGB1* is probably not essential to the MET since it is absent in mouse 2-cell embryos. Our results for *HMGB* are analogous to those obtained from the mouse. If we take into account the timing of MET, we would expect very low *HMGB1* protein levels in bovine 8-cell embryos. Thus, the role of *HMGB1* in the embryo still remains to be elucidated and it could mainly act in pre-MET embryos. The results presented here show, for the first time, the expression pattern of *NFAR* in mammalian early development. However, it must be specified that the pattern of expression illustrated here combine both *NFAR-1* and *NFAR-2* mRNA (Figure 2.3). Nevertheless, if the sharp decrease in *NFAR* transcript level observed in 8-cell embryos (Figure 2.3) is due to translation and subsequent degradation, this would suggest that *NFAR* is also implicated in the MET. Furthermore, it would be very interesting to examine the possibility that *NFAR* is related to mRNA masking in oocytes and early embryos up until the MET as it has been found in *Xenopus* [51]. In the case of *TEAD2*, a previous publication has shown that this factor's mRNA is associated with polysomes in the 2-cell mouse embryo, but not in the oocyte or in the 1-cell embryo [52]. This strongly suggests that *TEAD2* mRNA is translated at this stage to coincide with the MET. Translation at this point seems to cause the loss of *TEAD2* transcript in mouse 2-cell embryos. In the bovine, as in the mouse, *TEAD2* mRNA is present at all stages of embryonic development prior to MET. The decrease of its mRNA level at the 4- and 8-cell stages suggests that it could be translated to provide *TEAD2* proteins for the MET [52]. As for *OCT-4*, our results coincide with those of another study showing mRNA expression patterns in bovine pre-attachment embryos, thereby confirming the accuracy of our technique [53]. As previously demonstrated, the *OCT-4* protein is present in the bovine pre-attachment embryos nucleus at all stages, which suggests that it most likely plays a role in the transcription of many genes important for early embryo development [33].

ATF-1 has a quite fascinating expression pattern. Contrary to other genes presented in this study, *ATF-1* expression pattern shows no significant decrease at the 8-cell stage compared to previous stages of development (Figure 2.4). If that mRNA present in the 8-cell embryos is from maternal origin, it would suggest that it is important for the MET since its mRNA has been preserved until that stage. Alternatively, if this is due to new embryonic transcript, it is still intriguing, since it would be one of the earliest embryonic transcription factors to be expressed in bovine embryos and therefore plays a primary role in the MET.

Finally, for all the genes studied here, the genes presented in Figure 2.5 are the only ones that demonstrate a low level of mRNA at the blastocyst stage compared to other stages. In fact, the mRNA level of these four genes is higher in the oocyte than in all other stages and do not increase at the blastocyst stage after the genome activation. This strongly suggests an important role for these factors in the very first developmental stages of bovine embryos. Earlier expression studies with *HMGN2* in mouse embryos showed that its mRNA is present in high quantities in the mouse GV oocyte. Then the level decreases until the 2-cell stage (at the MET) and increases from the 4-cell embryo to the blastocyst stages [27]. Our results show a similar expression pattern in bovine embryos in which the lowest level is detectable at the MET. However, unlike for the mouse, there is not a significant increase after the MET, according to the mRNA level observed in blastocysts. Our *HMGN2* expression pattern is very similar to that of the *HMGN1*, except that no increase is observed at the blastocyst stage. Consequently, our results suggest a possible implication for *HMGN2* in early bovine development and genome activation. In previous studies, *MSY2* protein has been detected in mouse oocytes and 1-cell embryos. Yet, no *MSY2* protein has been detectable in late 2-cell embryos, the time at which major mRNA degradation occurs and maternal mRNA is replaced by new embryonic mRNA [36, 38]. The *MSY2* mRNA level follows roughly the same pattern as the protein level except that a slight mRNA presence is still detected in the 2-cell embryos and even smaller amounts in blastocysts [36]. This could indicate that *MSY2* is present in pre-MET mouse embryos to protect maternal mRNA from degradation until it is translated. The results observed here are consistent with those of previous studies since we detect *MSY2* in stages leading up to

MET when mRNA protection is needed and the amount of *MSY2* decreases around the MET. At this point, stored maternal mRNA has to be translated to produce essential proteins for further development. The disappearance of *MSY2* coincides with mRNA degradation of almost all genes examined in this study. This supports the idea that the mRNA is protected from degradation, up until the time it needs to be recruited by the translation machinery to produce the required proteins, after which it is degraded. The remaining factor *TBP* has an mRNA expression pattern that has been previously characterized in mouse embryo development [52]. This study showed that the highest *TBP* mRNA level is observed in GV oocyte. This level then first decreases during maturation and then again during the first third of the 2-cell stage [52]. Protein localization experiments have shown that in the mouse *TBP* nuclear localization increases after fertilization up until the 2-cell stage embryos [54]. Our results support the findings that mRNA level decrease from the oocyte stage until the MET. The results presented by these previous studies confirm that protein level does not necessarily follow the corresponding mRNA level and that protein accumulation may correlate with the mRNA diminution. [52, 54, 55]. Our results consequently suggest that the *TBP* protein tends to accumulate in the pre-MET embryo. This is supported by the slight level of transcription observed in pre-MET bovine embryos [6]. Pre-MET transcription requires *TBP* since transcription in pre-MET embryos is regulated by TATA-box promoters, as shown in the mouse [56-58]. The decrease in *TBP* transcript level observed between the 4- to 8-cell stages suggests the production of new proteins and coincides with the timing of the MET when the use of TATA-box promoters is replaced by the use of TATA-less promoters in mouse [56, 57] and in human embryos [59]. However, the use of TATA-less promoters does not mean that the embryo is completely independent of *TBP* during this period, since it has been shown that *TBP* may still be required for TATA-less promoter activity [60]. The large amount of *TBP* mRNA found in oocytes, compared to other stages including the blastocyst, is consistent with expression patterns of other species [52, 55] and reinforces the perceived importance of *TBP* for basal transcription in pre-MET bovine embryos.

2.7 CONCLUSION

We have demonstrated that the fifteen genes examined in this study are all present in bovine oocytes throughout pre-MET embryonic development in their mRNA form. These results support the hypothesis that these factors could be implicated in the activation of embryonic transcription. It also lends support to the idea that transcription factors may be found as maternally stored mRNA in the oocyte until their recruitment for translation just in time for MET. Despite previous results, where DNA replication and chromatin regulation have been suggested as a limiting step in activation of embryonic transcription, the present study raises the possibility that transcription factors could be rate limiting. Furthermore, these results open the door to new avenues of research by proposing novel transcription factors that could be directly implicated in the MET.

2.8 ACKNOWLEDGMENTS

I thank Dr Atef Ali and Karine Tremblay for their technical assistance and the Canadian Natural Sciences and Engineering Research Council and the Canada Research Chair for their financial support. I would also like to acknowledge Dr Robert Viger for his critical reading of this manuscript. Finally, special thanks to Dr Susan Novak for her help in the statistical analysis and to Dr Michael K. Dyck for correcting the manuscript.

2.9 REFERENCES

1. Kanka J. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Theriogenology* 2003; 59: 3-19.
2. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 90-100.
3. Schultz RM. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays* 1993; 15: 531-538.
4. Etkin LD, Balcells S. Transformed *Xenopus* embryos as a transient expression system to analyze gene expression at the midblastula transition. *Dev Biol* 1985; 108: 173-178.
5. Memili E, First NL. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol Reprod* 1999; 61: 1198-1207.
6. Memili E, First NL. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 2000; 8: 87-96.
7. Schultz RM, Davis W, Jr., Stein P, Svoboda P. Reprogramming of gene expression during preimplantation development. *J Exp Zool* 1999; 285: 276-282.
8. Marmorstein R. Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 422-432.
9. Stein P, Worrada DM, Belyaev ND, Turner BM, Schultz RM. Stage-dependent redistributions of acetylated histones in nuclei of the early preimplantation mouse embryo. *PG - 421-9. Mol Reprod Dev* 1997; 47.
10. Worrada DM, Turner BM, Schultz RM. Temporally restricted spatial localization of acetylated isoforms of histone H4 and RNA polymerase II in the 2-cell mouse embryo. *Development* 1995; 121: 2949-2959.
11. McGraw S, Robert C, Massicotte L, Sirard MA. Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biol Reprod* 2003; 68: 383-389.
12. Bianchi ME, Beltrame M. Upwardly mobile proteins. Workshop: the role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia. *EMBO Rep* 2000; 1: 109-114.
13. Woychik NA, Hampsey M. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 2002; 108: 453-463.
14. Nikolov DB, Burley SK. RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 15-22.
15. Lee JS, Galvin KM, Shi Y. Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 6145-6149.
16. Donohoe ME, Zhang X, McGinnis L, Biggers J, Li E, Shi Y. Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7237-7244.
17. Reeves R, Beckerbauer L. HMG1/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1519: 13-29.

18. Robert C, Barnes FL, Hue I, Sirard MA. Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2000; 57: 167-175.
19. Nakamura Y, Moriuchi R, Nakayama D, Yamashita I, Higashiyama Y, Yamamoto T, Kusano Y, Hino S, Miyamoto T, Katamine S. Altered expression of a novel cellular gene as a consequence of integration of human T cell lymphotropic virus type 1. *J Gen Virol* 1994; 75: 2625-2633.
20. Vo N, Goodman RH. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2001; 276: 13505-13508.
21. Hai T, Hartman MG. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *PG* - 1-11. *Gene* 2001; 273.
22. Andrisani OM. CREB-mediated transcriptional control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999; 9: 19-32.
23. De Cesare D, Fimia GM, Sassone-Corsi P. Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 281-285.
24. Yagi R, Chen LF, Shigesada K, Murakami Y, Ito Y. A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *Embo J* 1999; 18: 2551-2562.
25. Vassilev A, Kaneko KJ, Shu H, Zhao Y, DePamphilis ML. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev* 2001; 15: 1229-1241.
26. Bustin M, Trieschmann L, Postnikov YV. The HMG-14/-17 chromosomal protein family: architectural elements that enhance transcription from chromatin templates. *Semin Cell Biol* 1995; 6: 247-255.
27. Mohamed OA, Bustin M, Clarke HJ. High-mobility group proteins 14 and 17 maintain the timing of early embryonic development in the mouse. *Dev Biol* 2001; 229: 237-249.
28. Bianchi ME, Beltrame M. Flexing DNA: HMG-box proteins and their partners. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1573-1577.
29. Ovsenek N, Karn HA, Heikkila JJ. Analysis of CCAAT box transcription factor binding activity during early *Xenopus laevis* embryogenesis. *Dev Biol* 1991; 145: 323-327.
30. Saunders LR, Jurecic V, Barber GN. The 90- and 110-kDa human NFAR proteins are translated from two differentially spliced mRNAs encoded on chromosome 19p13. *Genomics* 2001; 71: 256-259.
31. Saunders LR, Perkins DJ, Balachandran S, Michaels R, Ford R, Mayeda A, Barber GN. Characterization of two evolutionarily conserved, alternatively spliced nuclear phosphoproteins, NFAR-1 and -2, that function in mRNA processing and interact with the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Biol Chem* 2001; 276: 32300-32312.
32. Ovitt CE, Scholer HR. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 1021-1031.
33. van Eijk MJ, van Rooijen MA, Modina S, Scesi L, Folkers G, van Tol HT, Bevers MM, Fisher SR, Lewin HA, Rakacolli D, Galli C, de Vaureix C, Trounson AO,

- Mummery CL, Gandolfi F. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. *Biol Reprod* 1999; 60: 1093-1103.
34. Saijoh Y, Fujii H, Meno C, Sato M, Hirota Y, Nagamatsu S, Ikeda M, Hamada H. Identification of putative downstream genes of Oct-3, a pluripotent cell-specific transcription factor. *Genes Cells* 1996; 1: 239-252.
 35. Kaneko KJ, Cullinan EB, Latham KE, DePamphilis ML. Transcription factor mTEAD-2 is selectively expressed at the beginning of zygotic gene expression in the mouse. *Development* 1997; 124: 1963-1973.
 36. Yu J, Hecht NB, Schultz RM. Expression of MSY2 in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2001; 65: 1260-1270.
 37. Yu J, Hecht NB, Schultz RM. RNA-Binding Properties and Translation Repression In Vitro by Germ Cell-Specific MSY2 Protein. *Biol Reprod* 2002; 67: 1093-1098.
 38. Gu W, Tekur S, Reinbold R, Eppig JJ, Choi YC, Zheng JZ, Murray MT, Hecht NB. Mammalian male and female germ cells express a germ cell-specific Y-Box protein, MSY2. *Biol Reprod* 1998; 59: 1266-1274.
 39. Buratowski S. Snapshots of RNA polymerase II transcription initiation. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 320-325.
 40. Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. 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* 1999; 52: 683-700.
 41. Ali A, Sirard MA. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 2002; 66: 901-905.
 42. Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386 (Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html). 2000.
 43. Robert C, McGraw S, Massicotte L, Pravetoni M, Gandolfi F, Sirard MA. Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2002; 67: 1465-1472.
 44. Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP. Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Reprod Dev* 2003; 66: 297-305.
 45. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Moreira PM, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 2003; 69: 1424-1431.
 46. Tomek W, Torner H, Kanitz W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reprod Domest Anim* 2002; 37: 86-91.
 47. Grosset C, Chen CY, Xu N, Sonenberg N, Jacquemin-Sablon H, Shyu AB. A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell* 2000; 103: 29-40.

48. Hosoda N, Kobayashi T, Uchida N, Funakoshi Y, Kikuchi Y, Hoshino S, Katada T. Translation termination factor eRF3 mediates mRNA decay through the regulation of deadenylation. *J Biol Chem* 2003.
49. Thompson EM, Legouy E, Christians E, Renard JP. Progressive maturation of chromatin structure regulates HSP70.1 gene expression in the preimplantation mouse embryo. *Development* 1995; 121: 3425-3437.
50. Spada F, Brunet A, Mercier Y, Renard JP, Bianchi ME, Thompson EM. High mobility group 1 (HMG1) protein in mouse preimplantation embryos. *Mech Dev* 1998; 76: 57-66.
51. Brzostowski J, Robinson C, Orford R, Elgar S, Scarlett G, Peterkin T, Malartre M, Kneale G, Wormington M, Guille M. RNA-dependent cytoplasmic anchoring of a transcription factor subunit during *Xenopus* development. *Embo J* 2000; 19: 3683-3693.
52. Wang Q, Latham KE. Translation of maternal messenger ribonucleic acids encoding transcription factors during genome activation in early mouse embryos. *Biol Reprod* 2000; 62: 969-978.
53. Daniels R, Hall V, Trounson AO. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol Reprod* 2000; 63: 1034-1040.
54. Worrall DM, Ram PT, Schultz RM. Regulation of gene expression in the mouse oocyte and early preimplantation embryo: developmental changes in Sp1 and TATA box-binding protein, TBP. *Development* 1994; 120: 2347-2357.
55. Veenstra GJ, Destree OH, Wolffe AP. Translation of maternal TATA-binding protein mRNA potentiates basal but not activated transcription in *Xenopus* embryos at the midblastula transition. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7972-7982.
56. Davis W, Jr., Schultz RM. Developmental change in TATA-box utilization during preimplantation mouse development. *Dev Biol* 2000; 218: 275-283.
57. Majumder S, DePamphilis ML. TATA-dependent enhancer stimulation of promoter activity in mice is developmentally acquired. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4258-4268.
58. Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ, DePamphilis ML. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J Biol Chem* 1995; 270: 22077-22080.
59. Taylor DM, Ray PF, Ao A, Winston RM, Handyside AH. Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detectable in the human preimplantation embryo at the three- to four-cell stage. *Mol Reprod Dev* 1997; 48: 442-448.
60. Pugh BF, Tjian R. Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev* 1991; 5: 1935-1945.

2.10 TABLES

Table 2.1: Information on the transcription factors studied

Gene	Relevant information	References
YY1	It activates transcription by the binding of many others factors. Previous studies have shown that YY1 is cytoplasmic in mouse oocytes and 1-cell embryos and enters the nucleus in 2-cell embryos, just in time for MET.	[15, 16]
HMGA1	It is a non-histone chromosomal protein thought to bind DNA in AT-rich regions. It supports the formation of a large complex of transcription factors that recruits the basal transcriptional machinery to the transcription initiation site.	[17]
RY-1	Previous studies demonstrate that it is associated with oocytes possessing good developmental potential. RY-1 amino acid constitution is related to the composition of protamines and some proteins associated with mRNA splicing.	[18, 19]
P300	It is a transcription coactivator strongly related to CBP (CREB-binding protein) and is implicated in the transcription of several genes since it interacts with hundreds of transcription factors.	[20]
CREB	It is a member of a family of proteins that bind ATF/CRE sites to activate transcription of many different genes. CREB transcriptional activity can be induced by several signals including cAMP and various growth factors.	[21-23]
YAP65	It is a transcriptional coactivator that binds the activation domains of many transcription factors such as c-jun, c/EBP and AP2. It has been recently identified as a coactivator of the TEAD family transcription factors.	[24, 25]
HMGN1 and HMGN2	HMGN1 and HMGN2 are non-histone chromosomal proteins that bind nucleosome core particles. The incorporation of HMGN proteins to nucleosomes reduces nucleosome compaction and therefore promotes transcription. Knockdown of HMGN1 or HMGN2 into 1-cell mouse embryos cause delayed development in early mouse embryos and reduced the production of total RNA in the 4-cell embryo.	[26, 27]
HMGB1	It is a non-histone chromosomal protein that binds linker DNA between nucleosomes and disrupts the chromatin by inducing sharp bends that facilitate transcription.	[28]
NFAR	It encodes two splicing variants, NFAR-1 and NFAR-2, which bind DNA at the CCAAT box found in the promoters of many genes. As well, NFAR-1 and -2 possess two double-stranded RNA binding domain.	[29-31]
OCT-4	OCT-4 is a transcription factor widely expressed in embryos and associated with the totipotency of cells. It has also been shown to participate in the expression of numerous pluripotent cells genes.	[32-34]
TEAD-2	It is a member of a family of transcription factors with a TEA DNA binding domain present at a relatively high level throughout the preimplantation period in mouse.	[25, 35]
ATF-1	It is a member of the CREB/ATF family of transcription factors that respond to various growth factors or other signaling pathways to promote transcription, in a manner similar to CREB.	[21, 23]
MSY2	It contains two RNA binding domains and binds mRNA to stabilizes and protects them from degradation. Also, MSY2 has translation suppression activity.	[36-38]
TBP	It is implicated in the formation of the transcriptional complexes that recruit RNA polymerase II and initiate transcription.	[39]

Table 2.2: Information on primers used for RT-PCR experiments

Genes	Oligos Sequences	Accession Number	Length of PCR products (bp)	TM (°C)
ATF-1	Up 5'-AATACTTGTGCCCAAGCAACC-3' Low 5'-TGTAAGGGTCACGGGAGATG-3'	CB445926	133	58
CREB	Up 5'-CCAAGGAGGAGCAATACAAC-3' Low 5'-GACACTCTCGTGCTGCTTC-3'	AF006042	344	57
GFP	Up 5'-GTAAACGGCCACAAGTTCAG-3' Low 5'-CACACCACAGAAGTAAGTTCC-3'	U43284	708	59
HMGA1	Up 5'-GCCTCCAAGCAGGAAAAGG-3' Low 5'-TTGCTTCCCTTTGGTCGG-3'	BT006774	125	58
HMGB1	Up 5'-ATTTGAAGACATGGCAAAGG-3' Low 5'-TTTCCCTTTAGCTCGGTATG-3'	X12796	325	57
HMGN1	Up 5'-ATGCCCAAGAGGAAGGTC-3' Low 5'-AGACTTGGCTTCTTTCTCTCC-3'	BT007337	297	58
HMGN2	Up 5'-CCAAGAGAAAGGCTGAAGG-3' Low 5'-ACTTGGCATCTCCAGCAC-3'	NM_005517	267	57
MSY2	Up 5'-GTGCTGGCAATCCAAGTCC-3' Low 5'-CTTCTCTCCTTCCACGACATC-3'	NM_015982	195	58
NFAR	Up 5'-AGCTGGAGAAACGCTATCAG-3' Low 5'-CTGTGTGATATCTTCCCGTTG-3'	AF167570	397	57
p300	Up 5'-CCTTCCCAACCTCAAACACTAC-3' Low 5'-GACTCAGGGTGATTTTGTGCG-3'	U01877	299	58
OCT-4	Up 5'-CGAGTATCGAGAACCGAGTG-3' Low 5'-CAGGGTTCTCTCCCTAGCTC-3'	NM_174580	441	59
RY-1	Up 5'-CAGACCTTTGGATTCATTGC-3' Low 5'-AAATGGGGTTGGTGAAGTC-3'	CB440052*	252	56
TBP	Up 5'-CCTAAAGACCATTGCACTTCG-3' Low 5'-CTTCACTCTTGGCTCCTGTG-3'	NM_003194	146	57
TEAD-2	Up 5'-GGCAGATCTACGACAAATTCC-3' Low 5'-GTTCCGTCTCCACCTTCTC-3'	NM_003598	270	57
YAP65	Up 5'-TTGACCTAATCGTACCCGTTG-3' Low 5'-CCACCCAATACAACCAGGAAG-3'	CB436874	153	57
YY1	Up 5'-TCTGGAGGTTGATAACTTTGC-3' Low 5'-CACTGAACATCAGCATCTGG-3'	NM_003403	294	57

* Primers for this gene were deduced from a sequence obtained in our lab and not published that is very similar to accession number CB440052.

2.11 FIGURES

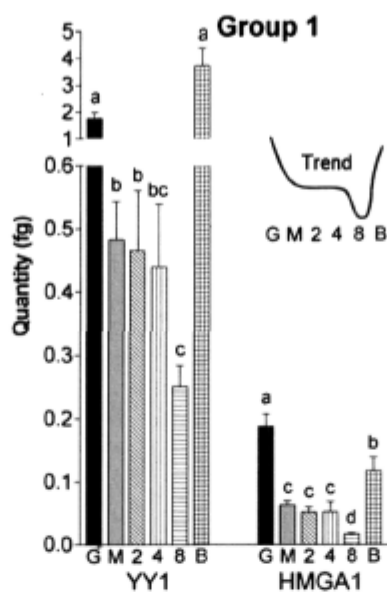


Figure 2.1. Quantification by Real-Time RT-PCR of YY1 and HMGA1 in bovine oocytes and embryos cultured *in vitro*. Letters below histograms represent the developmental stages studied: G = GV oocytes, M = MII oocytes, 2 = 2-cell embryos, 4 = 4-cell embryos, 8 = 8-cell embryos and B = Blastocysts. Each developmental stage was done in triplicates and the amounts of mRNA shown represent the quantity of transcript corrected with the GFP value obtained for each pool. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

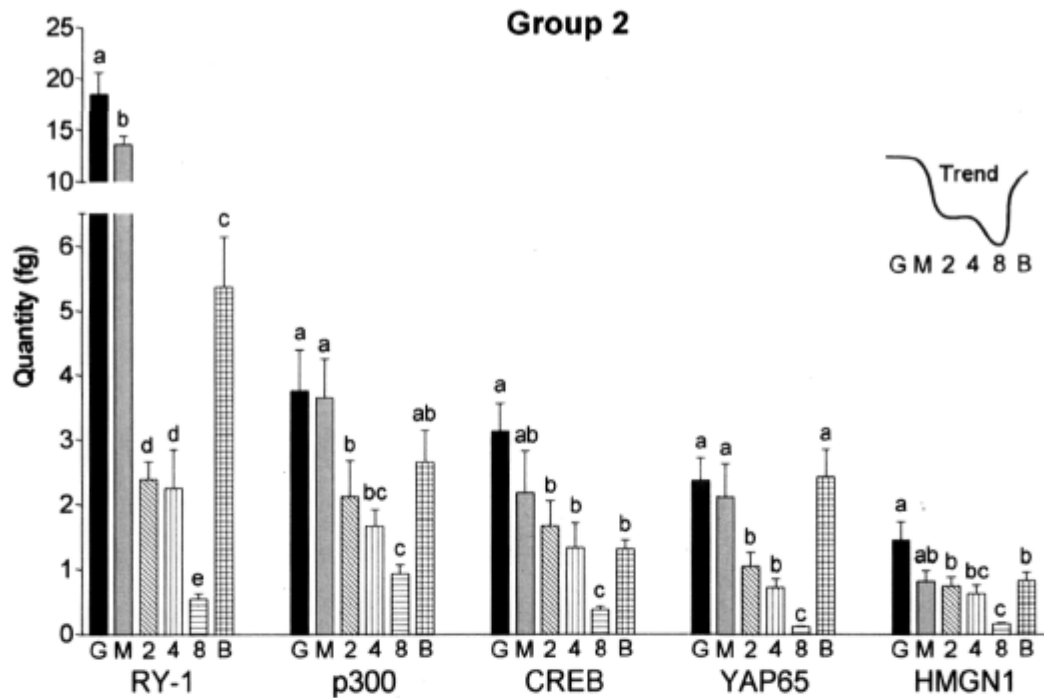


Figure 2.2. Quantification by Real-Time RT-PCR of RY-1, P300, CREB, YAP65 and HMGN1 in bovine oocytes and embryos cultured *in vitro*. Letters below histograms represent the developmental stages studied: G = GV oocytes, M = MII oocytes, 2 = 2-cell embryos, 4 = 4-cell embryos, 8 = 8-cell embryos and B = Blastocysts. Each developmental stage was done in triplicates and the amounts of mRNA shown represent the quantity of transcript corrected with the GFP value obtained for each pool. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

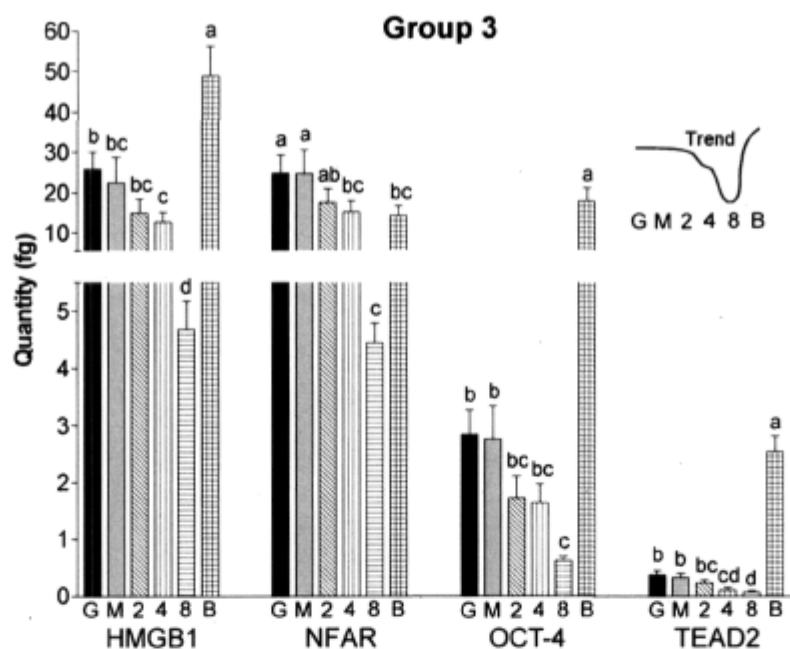


Figure 2.3. Quantification by real-time RT-PCR of HMGB1, NFAR, OCT-4 and TEAD2 in bovine oocytes and embryos cultured *in vitro*. Letters below histograms represent the developmental stages studied: G = GV oocytes, M = MII oocytes, 2 = 2-cell embryos, 4=4-cell embryos, 8 = 8-cell embryos and B = Blastocysts. Each developmental stage was done in triplicates and the amounts of mRNA shown represent the quantity of transcript corrected with the GFP value obtained for each pool. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

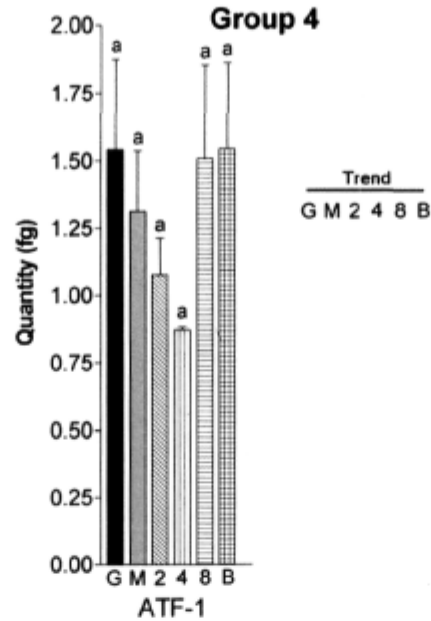


Figure 2.4. Quantification by Real-Time RT-PCR of ATF-1 in bovine oocytes and embryos cultured *in vitro*. Letters below histograms represent the developmental stages studied: G = GV oocytes, M = MII oocytes, 2 = 2-cell embryos, 4=4-cell embryos, 8 = 8-cell embryos and B = Blastocysts. Each developmental stage was done in triplicates and the amounts of mRNA shown represent the quantity of transcript corrected with the GFP value obtained for each pool. Different letters indicate a significant difference ($P<0.05$).

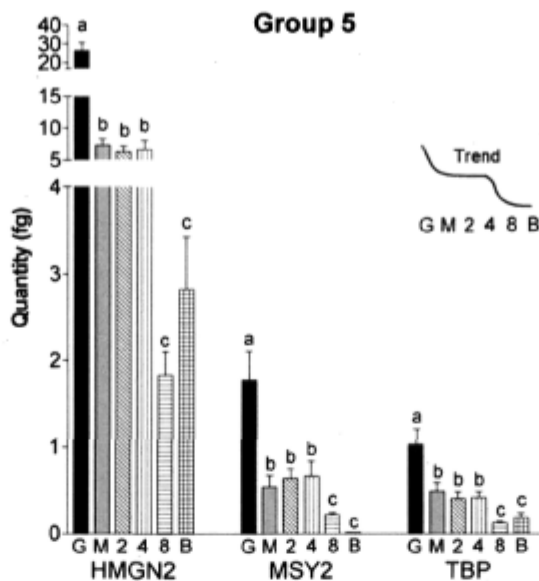


Figure 2.5. Quantification by Real-Time RT-PCR of HMG2, MSY2 and TBP in bovine oocytes and embryos cultured *in vitro*. Letters below histograms represent the developmental stages studied: G = GV oocytes, M = MII oocytes, 2 = 2-cell embryos, 4=4-cell embryos, 8 = 8-cell embryos and B = Blastocysts. Each developmental stage was done in triplicates and the amounts of mRNA shown represent the quantity of transcript corrected with the GFP value obtained for each pool. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

**CHAPITRE III : EXPRESSION ET LOCALISATION DE
RÉGULATEURS DE TRANSCRIPTION EN LIEN AVEC LA
TRANSITION MATERNELLE EMBRYONNAIRE CHEZ
L'EMBRYON BOVIN PRODUIT *IN VITRO***

**CHAPTER III : SPATIO-TEMPORAL EXPRESSION OF
TRANSCRIPTIONAL REGULATORS IN CONCERT WITH THE
MATERNAL TO EMBRYONIC TRANSITION IN BOVINE
IN VITRO EMBRYOGENESIS**

Christian Vigneault, Serge McGraw et Marc-André Sirard

Ce chapitre a été accepté pour publication dans la revue « *Reproduction* »

3.1 RÉSUMÉ

Les jeunes embryons bovins sont quiescents au niveau transcriptionnel jusqu'à ce qu'ils atteignent les stades 8- à 16-cellules. Ainsi, lors des premiers cycles embryonnaires qui précèdent l'activation de leur génome, les embryons dépendent pour leur survie des réserves maternelles d'ARNm et de protéines fournies par l'ovocyte. L'objectif de cette étude était de caractériser l'expression et la localisation au cours du jeune développement embryonnaire bovin des régulateurs de transcription et de traduction suivant : *TBP*, *ATF2* et *MSY2*. Des ovocytes matures et immatures ainsi que des embryons de stades 2-, 4-, 8- et 16-cellules, morulas et blastocystes ont été utilisés pour analyser l'expression et la localisation des protéines *ATF2*, *TBP* et *MSY2*. À l'aide de PCR quantitatif, le profil d'ARNm de *ATF2* de l'ovule au blastocyste a aussi été mesuré. Une divergence entre les profils d'ARNm et de protéines d'*ATF2* a été observée puisque la protéine maintient un niveau comparable à partir de l'ovocyte jusqu'au blastocyste alors que l'ARNm diminue grandement au niveau 8-cellules et demeure à un bas niveau jusqu'au stade blastocyste. *TBP* et *MSY2* ont révélé des profils d'expression protéique opposés au cours de la période étudiée. En effet, nos résultats ont démontré que la protéine *MSY2* diminue au cours du développement embryonnaire pour atteindre son niveau le plus bas dans le blastocyste alors que l'inverse est observé pour la protéine *TBP*. Finalement, nos résultats ont révélé une forte localisation nucléaire de *TBP* à partir des stades 8- à 16-cellules alors que *MSY2* a été détecté uniquement que dans le cytoplasme des ovocytes et des embryons des premiers stades embryonnaires. Cette étude procure de nouveaux éléments pour mieux comprendre les événements moléculaires impliqués dans l'activation du génome embryonnaire bovin.

3.2 ABSTRACT

Cleavage stage bovine embryos are transcriptionally quiescent until they reach the 8- to 16-cell stage, and thus rely on the reserves provided by the stored maternal mRNAs and proteins found in the oocytes to achieve their first cell divisions. The objective of this study was to characterize the expression and localization of the transcriptional and translational regulators, *MSY2*, *TBP* and *ATF2*, during bovine early embryo development. GV stage and MII stage oocytes as well as two-, four-, eight-, 16-cell stage embryos, morula and blastocysts produced *in vitro* were analysed for temporal and spatial protein expression. Using Q-PCR, *ATF2* mRNA expression was shown to remain constant from the GV stage oocyte to the 4-cell embryo, and then drastically decreased through to the blastocyst stage. In contrast, the protein levels of *ATF2* remained constant throughout embryo development and were found in both the cytoplasm and the nucleus. Both *TBP* and *MSY2* showed opposite protein expression patterns, as *MSY2* protein levels decreased throughout development while *TBP* levels increased through to the blastocyst stage. Immunolocalization studies revealed that *TBP* protein was clearly localized in the nucleus of 8- to 16-cell stage embryos, whereas the translational regulator *MSY2* was exclusively cytoplasmic and disappeared from the 16-cell stage onwards. This study shows that *MSY2*, *TBP* and *ATF2* are differentially regulated through embryo development and provides insight on the molecular events occurring during the activation of the bovine genome during embryo development *in vitro*.

3.3 INTRODUCTION

In the bovine as in other vertebrate species, the very early embryos are transcriptionally silent and the onset of transcription occurs at a precise stage of development which is species specific (reviewed in Telford *et al.*, 1990). Early embryos divide and subsist by using the stockpile of maternal proteins and mRNAs stored in oocytes during their growth. Before this maternal reserve is exhausted, the embryos start to produce new mRNAs by activating the transcription of their own genome to assure their development. This mRNA replacement occurs for the majority of the maternal mRNAs and is called the maternal to embryonic transition (MET). Even if the majority of factors involved in the MET remain elusive, it is understood that different conditions and mechanisms are required by the embryo to activate transcription from the newly permissive chromatin (Schultz, 2002). The understanding of the mechanisms and factors present at the MET are critical for improving methods and conditions for embryo production as the developmental block is observed at this stage *in vitro*.

According to previous studies, the major embryonic transcriptional activation corresponding to the MET in bovine occurs around the 8- to 16-cell stage embryos (Camous *et al.*, 1986, Frei *et al.*, 1989, King *et al.*, 1988, Kopecny *et al.*, 1989, Telford *et al.*, 1990). However, subsequent studies have shown that some transcription also occurs in earlier stages, in the 2- or 4-cell embryos (Barnes & First, 1991, Plante *et al.*, 1994, Hyttel *et al.*, 1996, Viuff *et al.*, 1996, Lavoit *et al.*, 1997, Memili *et al.*, 1998a, Natale *et al.*, 2000a). However, this early transcription is low and the major activation of transcription still appears to occur in the 8-cell stage embryos.

One reason explaining the transcriptional silencing in pre-MET embryos is the presence of a inhibitive state of chromatin in these stages (Newport & Kirschner, 1982a, Majumder *et al.*, 1993, Wiekowski *et al.*, 1993). One major modification inducing remodeling of this silent chromatin is the acetylation of the histone tails from the nucleosome which result in a relaxed chromatin structure and therefore, allows the binding of the transcriptional machinery and transcription activation (reviewed in Hassig &

Schreiber, 1997). However, even in the presence of permissive chromatin, the cell needs a functional transcriptional machinery to recruit RNA polymerase II to the transcription initiation sites.

At least in *Xenopus laevis*, deficient basal transcriptional machinery is a limitative aspect for pre-MET transcriptional activation. Indeed, the injection of exogenous TATA-Box Binding Protein (*TBP*) in early embryos in permissive conditions results in a premature activation of transcription, prior to the normal timing of MET (Almouzni & Wolffe, 1995). *TBP* is a general transcription factor that has a key role in the RNA polymerase II recruitment, and its absence in *Xenopus* pre-MET embryos (Veenstra *et al.*, 1999) confirms the hypothesis that pre-MET embryos are deficient in some key factors necessary for proper transcriptional activity. This regulation of transcription by *TBP* in early embryos seems evolutionarily conserved since mouse pre-MET embryos show only a slight nuclear presence of TBP which increases substantially at MET (Worrad *et al.*, 1994, Gazdag *et al.*, 2007) and the knock-down of *TBP* in zebrafish affects the expression of a subset of genes at the MET (Muller F. *et al.*, 2001).

The maternal contribution of the oocyte in mRNA coding for transcription factors like TBP is crucial to the embryo. These stockpiles of mRNA are masked in messenger ribonucleoproteins complexes (mRNPs) that protect it from premature translation and degradation (reviewed in Weston & Sommerville, 2006). Y-Box protein 2 (*MSY2*) is a major component of the mRNPs found in oocytes (Bouvet & Wolffe, 1994, Yu *et al.*, 2001) and plays an essential role in the storage of maternal mRNA for the normal subsequent embryonic development (Yu *et al.*, 2004)

The young embryo encloses highly proliferative and pluripotent cells that could be related to cancerous cells in some ways. Activating Transcription Factor 2 (*ATF2*) plays a significant role in tumorigenesis (Huguier *et al.*, 1998) and its prominent presence in MET embryos in *Xenopus* propose a regulatory role for *ATF2* in transcription in pluripotent embryos (Villarreal & Richter, 1995).

Recent studies have shown that the maternal mRNA levels of stockpiled genes exhibit a rapid decrease in the first cleavage stages in early bovine embryos (Vigneault *et al.*, 2004, McGraw *et al.*, 2007). However, *TBP* and *MSY2* have been previously shown to have an expression pattern in which the mRNA levels are nearly fully conserved until the 4-cell stage and do not increase significantly at the blastocyst stage (Vigneault *et al.*, 2004). This implies that these factors are conserved until their presumptive role in the MET at the 8 to 16-cell stage.

The objective of this paper was to reveal the temporal expression and localization patterns of *MSY2*, *TBP* and *ATF2* in bovine early development and to establish their relationship with the timing of the MET. These genes were chosen for their known involvement in the MET of other species and for their particular mRNA profile in early embryo development. Besides identifying factors potentially implicated in MET, we also report a particular relationship between mRNA levels and protein expression during bovine pre-MET development.

3.4 MATERIALS AND METHODS

3.4.1 Tissue collection and embryo production

Oocyte collection and embryo production in synthetic oviduct fluid (SOF) medium was performed as described earlier (Vigneault *et al.*, 2004). In brief, bovine ovaries were collected from a local abattoir and oocytes were aspirated from healthy 3- to 6-mm follicles. The healthy cumulus-oocyte complexes were selected for culture in SOF using our defined protocols. Oocytes were fertilized using thawed frozen semen from a mixture of three different bulls and embryos were cultured also using our standard protocols in SOF medium supplemented with 0.3% BSA. Bovine oocytes and embryos were denuded and washed three times in PBS before freezing at -80°C for further analysis. Bovine oocytes were collected at the GV stage (uncultured) and MII stage (24 h *in vitro* matured) for use in further experiments. Embryos for use in immunofluorescence were collected at 30, 42, 60,

90 and 105 h post-fertilization for two, four, early eight, late eight and 16-cell stage embryos respectively. Morulae and blastocysts were collected at day 6 and 8 post-fertilization respectively. RT-PCR and immunoblotting experiments were performed on mid eight-cell embryos that were collected 72 h post-fertilization. Experiments were repeated at least three times for each developmental stage for each protein studied and at least 5 specimens were observed for each replicate.

3.4.2 RNA extraction and reverse transcription

RNA extraction was performed using the Absolutely RNA Microprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA) and the RNA was reverse transcribed using Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen) with oligo-dT (18). One pg of *GFP in vitro* transcribed RNA was added before extraction as a technical external control for RNA extraction and reverse transcription. Three pools of 20 oocytes and embryos of each stage were used for extraction. For the detailed procedure see our previous study (Vigneault *et al.*, 2004).

3.4.3 Real-time polymerase chain reaction

The primers for *ATF2* amplification were designed using Primer3 web (Rozen & Skaletsky, 2000) and from consensus sequences generally derived from human and mouse sequences from NCBI. Primers used are 5'- GTAATCACCCAGGCACCATC- 3' and 5'- GGATTCCTGGAACACTAGGC- 3'. An annealing temperature of 58°C was used. For detailed lightcycler procedure and quantification please refer to (Vigneault *et al.*, 2004).

3.4.4 Immunoblotting

Immunoblotting was performed on bovine oocytes and embryos with each antibody to ensure their specificity for studies as well as to examine protein expression across the different stages of development. For the antibody specificity testing, 30 GV stage oocytes were used for MSY2, 100 GV stage oocytes were used for ATF2, and 80 blastocysts were used for testing with the TBP antibody. For temporal protein expression immunoblots, 75

oocytes and embryos of each stage were directly lysed in 2X SDS-PAGE sample buffer, resolved on standard 10% SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Osmonics, Minnetonka, MN, USA) using a semi-dry transfer apparatus following the Tris/CAPS discontinuous buffer protocol from Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The transfer was performed at 1.5 mA/cm² for 45 min at room temperature. Membrane blotting was performed as follows: The membrane was blocked in blocking solution for 90 min at room temperature and then incubated with the first antibody overnight at 4°C. The membranes were washed three times for 15 min in TBS-Tween (0.05%) and the membrane was incubated with secondary antibody, goat anti-rabbit IgG (H+L), horseradish peroxidase conjugate (Molecular Probes, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) diluted 1:300 000 in 2% non-fat dry milk in TBS-Tween (0.05%). Membranes were washed three times in TBS-Tween (0.05%) and revealed with ECL Advance Western Blotting Detection kit from Amersham (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, USA). Blocking solution contained 5% non-fat dry milk for MSY2 and ATF2, 10% goat serum / 3% milk for TBP and 2% ECL advance blocking reagent for β -actin. For incubations, antibodies were diluted in their corresponding blocking solutions diluted 1:1 with TBS-T. Antibody dilutions were 1:10 000, 1:500, 1:1000 and 1:1000 for MSY2, ATF2, TBP and β -actin respectively. ATF2 (#sc-187) and TBP (#sc-204) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA), β -actin (#4967) antibody was bought from Cell Signaling (Danvers, MA, USA) and MSY2 was a kind gift from Dr Richard Schultz from University of Pennsylvania. The same membrane was used for all four antibodies. To ensure the validity of the results, the complete immunoblotting was repeated two more times with new membranes with 50 oocytes and embryos of each stage for each replicate. Equivalent results were obtained with each replicate. Protein expression was quantified with the software ImageJ (Rasband, 1997-2007) developed by the National Institute of Health (NIH) and the expression level was calculated relatively to the level measured in the stage with the higher level detected.

3.4.5 Immunofluorescence

GV and MII stage oocytes, two-, four-, eight-, and sixteen-cell embryos, morulae and blastocysts, were attached onto poly-L-lysine coated coverslips, fixed in 2%

paraformaldehyde/PBS for 30 min at room temperature and then permeabilized in PBS with 0.4% Triton X-100 for 30 min. Samples were washed three times for 15 min before blocking for 2 h at room temperature. Blocking solution contained 5% non-fat dry milk for MSY2 and ATF2 and 10% goat serum / 3% milk for TBP. Samples were then incubated with the primary antibodies overnight at 4°C. The antibodies used for immunofluorescence were the same as those used for immunoblotting and they were diluted in their corresponding blocking solutions diluted 1:1 with TBS-T. The dilutions used were 1:5000, 1:300 and 1:500 for MSY2, ATF2 and TBP respectively. The samples were washed three times for 15 min in TBS-T (0.05%) and were incubated 45 min in the secondary antibody solution containing the Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1:1000 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) in a solution of TBS-T containing 2% non-fat dry milk. Three washes of 15 min each in TBS-T were performed prior to incubation for 10 min in propidium iodide (10µg/mL) in PBS for nuclear staining. Negative controls were prepared with either no primary antibody or normal rabbit serum (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Experiments were done in triplicate and at least 5 oocytes or embryos were observed each time on a Nikon TE2000 confocal microscope (Nikon, Mississauga, ON, Canada).

3.4.6 Statistical analysis

Levels of mRNA were normalized using the GFP external control as described previously (McGraw *et al.*, 2006b, Vigneault *et al.*, 2004). Statistically significant differences in mRNA levels for ATF2 and protein levels for ATF2, MSY2 and TBP between each developmental stage were calculated by ANOVA followed by a Newman-Keuls test. Replicates were included in the statistical model. Differences were considered statistically significant at the 95% confidence level ($P < 0.05$). Data are presented as mean \pm SEM.

3.5 RESULTS

3.5.1 ATF2 mRNA quantification in bovine early embryo development

Real-time RT-PCR experiments for ATF2 showed a mRNA quantification pattern (Figure 3.1) similar to genes of maternal origin, which is also comparable to the mRNA profiles obtained for MSY2 and TBP in our earlier study (Vigneault *et al.*, 2004). The levels of mRNA remained constant from the GV stage oocyte until the 4-cell stage embryo. At the 8 to 16-cell stage, the levels of ATF2 mRNA decreased and remained low throughout the blastocyst stage.

3.5.2 Protein expression levels of MSY2, TBP and ATF2 in bovine embryos

We sought to determine the relative protein expression of MSY2, TBP and ATF2 during early developmental stages (oocyte to blastocyst). First, antibody specificity in bovine tissues was demonstrated on immunoblots (Figure 3.2). During early embryo development, MSY2 protein levels remained high until the 8-cell stage and decreased considerably after to the point of being barely detectable in the blastocyst stage (Figure 3.3a). TBP detection revealed a very different pattern during the same period of development. The TBP protein level detected remained very low in the first stages of development and tended to increase at the mid 8-cell stage (Figure 3.3b). This increase accentuated and became significant in the later stages and progressed to its highest level in the blastocyst stage (Figure 3.3b). As for ATF2, it showed a different expression pattern as its protein level remained invariable during the stages investigated (Figure 3.3c). A consistently strong signal was observed for ATF2 in all stages examined, from the GV oocyte to the blastocyst. β -actin was used as a well loading control to ensure that equal amounts of protein were loaded in each well (data not shown).

3.5.3 Immunolocalization of MSY2, TBP, and ATF2 in oocytes and embryos

Immunofluorescence experiments revealed that MSY2 is present throughout bovine pre-attachment embryo development (Figure 3.4). MSY2 was exclusively cytoplasmic in

all stages studied and appeared to be preferentially located in the cortex instead of being randomly diffuse in the cytoplasm. Furthermore, as shown in Figure 3.4, and immunoblots (Figure 3.3a), MSY2 was not detected at the same intensity in all stages studied. While a relatively high signal of the MSY2 protein was detected in the period between the GV oocyte and the 8-cell stage, very low amounts were detected afterwards.

The TBP localization pattern in the oocyte and early embryos (Figure 3.5) was very different from MSY2. In contrast to MSY2, TBP signal intensity was very low in the GV oocyte and very high in the blastocysts. We detected a faint cytoplasmic presence of TBP protein in all stages examined. In the mature oocyte, TBP seemed associated with the mitotic spindle as it was located around the chromosomes. Subsequently, in the two-, four- and early eight-cell embryos, a faint nuclear signal for TBP was detected, but the signal in the nucleus intensified in the late eight-cell stage embryos. This increase in the signal intensity was accentuated in the subsequent stages of development as a very bright nuclear signal was observed in the 16-cell, morulae and blastocyst stage embryos.

Detection of ATF2 protein remained relatively constant in all stages of bovine early embryo development (Figure 3.6), which is consistent with the immunoblot results (Figure 3.3c). In every stage examined, both cytoplasmic and nuclear signals were detected with the exception of the metaphase II oocytes where the nuclear envelope was absent and ATF2 was exclusively cytoplasmic.

3.6 DISCUSSION

Our results report the expression and localization of an RNA binding protein, *MSY2*, and two transcription factors, *TBP* and *ATF2* in bovine early embryo development. This provides insight into the regulation and the potential involvement of these factors in the MET during bovine embryo development *in vitro*.

Because bovine embryos are mostly transcriptionally silent until MET that occurs at the eight- to 16-cell stage, various mechanisms have to be present to protect the stocked maternal mRNAs from degradation until their translation. In mouse embryos, it is recognized that *MSY2* performs such functions (Yu *et al.*, 2001, 2003). This protein is a member of the Y-box family, which binds mRNAs in order to prevent their degradation and also suppresses their translation (Yu *et al.*, 2002). *MSY2* mRNA is also present in the bovine and we have previously characterized its expression during early embryo development (Vigneault *et al.*, 2004). The present study demonstrates that the protein expression of *MSY2* is similar to the mouse, in that it is more abundant in the early cleavage stages, and decreases after MET (Yu *et al.*, 2001). Our results also showed a prevalence of *MSY2* in the cortex of oocytes and early embryos, suggesting that it could be associated with the cytoskeleton, as previously proposed by Yu *et al.* (Yu *et al.*, 2001). As a consequence, *MSY2* could provide an anchor for the mRNA to the cytoskeleton for its storage in mRNPs, thus having a similar role as its relative YBX1 (Ruzanov *et al.*, 1999). By acting accordingly, *MSY2* would avoid the premature translation of mRNA in early embryos and keep specific mRNAs intact until they are recruited for specific needs in the developing embryo. Because 16-cell stage embryos are able to transcribe their own mRNAs, the assistance of RNA binding proteins like *MSY2* is no longer required and thus, offers an explanation for the disappearance of *MSY2* protein after MET and implies a role for this protein until the onset of embryonic transcription.

Y-Box proteins are not purely translation regulators since they can also act as transcription factors. Their binding to DNA sequences (Y-box) in specific gene promoters could promote the transcription and/or the binding of Y-Box proteins to pre-mRNA during transcription (Tafuri & Wolffe, 1990, Soop *et al.*, 2003). The transcriptional activity of *MSY2* and its binding to specific mRNAs has been verified in male germ cells (Yiu & Hecht, 1997, Yang *et al.*, 2005a). However, it is still unclear how *MSY2* binds to stored mRNA in oocytes. As in spermatogenesis, *MSY2* could be implicated in the transcription of important genes in oogenesis since the *MSY2* knockout leads to infertility problems due to defective ovarian development and ovulation (Yang *et al.*, 2005b). This suggests that *MSY2* binds to pre-mRNA in early oogenesis during the period of transcriptional activity

and translocates to the cytoplasm with the mRNA for their storage. Therefore, further studies on the mechanisms of action of MSY2 in oogenesis will have to be done.

Because high amounts of *TBP* mRNA are present in bovine GV oocytes (Vigneault et al., 2004), it could have a potential role in the activation of transcription in the developing embryo. TBP is a core protein that forms the TFIID complex, with other TBP-associated factors (TAFs), which organizes the initiation of transcription. TBP binds to the TATA box motif in the promoter regions and recruits basal transcription factors and RNA polymerase II to initiate gene transcription (reviewed in Thomas & Chiang, 2006). In the mouse and *Xenopus laevis*, low levels of TBP protein are detected in fully grown and matured oocytes, however levels subsequently increase during development up to embryonic genome activation (Worrad et al., 1994, Veenstra et al., 1999, Jallow et al., 2004, Yang et al., 2006, Gazdag et al., 2007). Our results also show a similar pattern of TBP protein expression in bovine early development; where protein levels remain low until the eight-cell stage, then increase through to the blastocyst stage. Thus, this TBP protein accumulation could occur as a result of the translation of maternal *TBP* mRNA stored in oocytes as observed in mouse embryos (Worrad et al., 1994). Further evidence suggests that TBP is implicated in embryonic transcription, since its early translation directly activates the basal transcription of *Xenopus* embryos before MET (Veenstra et al., 1999) and its knock-down reduces transcription at MET in zebrafish (Muller F. et al., 2001). The translocation of the TBP protein into the nucleus of embryos approaching MET suggests an active role for this protein in transcriptional activation in both the mouse (Worrad et al., 1994, Wang K. et al., 2006, Gazdag et al., 2007) and *Drosophila* embryos (Wang & Lindquist, 1998). The present study also provides evidence for nuclear localization of TBP protein during bovine embryo development just prior to MET, suggesting its involvement in MET. However, a low amount of TBP protein was detected in the nucleus of early stage embryos, which could be related to the faint transcription detected in these stages (Barnes & First, 1991, Plante et al., 1994, Hyttel et al., 1996, Viuff et al., 1996, Lavoit et al., 1997, Memili et al., 1998a, Natale et al., 2000a). Therefore, the increasing signal of TBP in the nucleus of late 8- and 16-cell embryos together with the disappearance of MSY2 provides

evidence supporting that major genome activation in the bovine occurs at the 8- to 16-cell stage.

Our findings also characterized the mRNA expression and protein expression and localization of *ATF2*, also known as the cAMP response element binding protein 1 (*CRE-BP1*), a member of the large *ATF/CREB* transcription factor family. This protein induces transcription by binding to cyclic AMP-response element (CRE) motifs present in many promoters. *ATF2* is associated with tumor progression and metastasis (Huguier *et al.*, 1998, Recio & Merlino, 2002, Papassava *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2007) and its inhibition in melanoma derived cells prevents metastasis and cell growth (Bhoumik *et al.*, 2002). Embryonic cells share similarities with cancerous cells; both are highly proliferative and undifferentiated. These characteristics could imply that cancerous cells use molecular pathways analogous to those found in early embryos (Strizzi *et al.*, 2005). Our results were surprising as *ATF2* protein levels remained constant throughout embryo development, while mRNA levels drastically decreased at the eight-cell stage, just prior to MET. A similar discrepancy between mRNA and protein levels in bovine embryos exists for the gene *MATER* (Pennetier *et al.*, 2006). A long half life of the protein could explain such a pattern. Another possible explanation for our results could be that the protein present in oocytes and early embryos came from the oocyte and would be replaced by *ATF2* proteins translated *de novo* in early embryos, which would cause the depletion of *ATF2* mRNA observed at MET. Moreover, even if the level of *ATF2* mRNA detected in blastocysts was quite low compared to the level found in oocytes, this level was not nil and could be at the source of the *ATF2* protein detected in this stage. GV oocytes displayed higher amounts of mRNA but it must be kept in mind that oocytes need to store very high amounts of mRNA for the first embryonic stages which is not the case for the blastocyst embryos. In contrast to our results, a study in *Xenopus laevis* showed a different expression pattern for *ATF2* mRNA and proteins where amounts were low in the oocyte but increased at MET (Villarreal & Richter, 1995). This inconsistency between the two species could be explained by minor transcription observed in bovine pre-MET embryos and the duration of the pre-MET period. The period from the resumption of meiosis to the MET in the bovine lasts 90 h, whereas in the pre-MET phase in *Xenopus laevis*, the 12 cleavages occur in only

6 h where transcription begins (Kimelman *et al.*, 1987). Thus, since this interval is very short in *Xenopus laevis*, it could be considered that these embryos are less reliant on minor transcription before MET. Further studies need to be conducted to understand the role of *ATF2* in early embryo development; however the presence of high levels of *ATF2* in both embryonic cells and cancer cells suggests that this transcription factor could be implicated among other things in the expression of genes involved in proliferation and/or maintenance of pluripotency in early embryos.

The present study clearly demonstrates the discrepancy between mRNA and protein profiles in bovine early embryo development, especially pre-MET. Frequently gene activity is measured by gene expression, however although there is a strong relationship between mRNA levels and protein levels in somatic tissues, the situation is drastically distinct in early embryos. Higher mRNA levels of a specific gene in GV oocytes is not reflective of high protein levels at that stage. For some genes, GV oocytes need to stock large amounts of mRNAs to reach MET several days later, at which time embryos become transcriptionally active. For example, *TBP* is a classic maternally-inherited gene that is stored in oocytes as mRNA and later translated in embryos when required. However, *MSY2* demonstrates a significant role in the pre-MET period and in the activation of the embryonic genome as both mRNA and protein are elevated in early developmental stages and disappear together after MET. Finally, a different situation applies to *ATF2*, where protein levels remained stable in early embryonic development while *ATF2* mRNA levels decreased drastically around MET.

3.7 CONCLUSION

By examining the protein expression and localization of several factors implicated in MET, this study brings forward molecular evidence that strengthens the hypothesis for the timing of the MET at the eight- to 16-cell stage in bovine *in vitro* embryogenesis. First, expression of the *MSY2* protein is in agreement with the period of maternal mRNA masking in bovine embryogenesis, which is a very important period prior to the MET.

Second, the transcription regulator ATF2 becomes visible in the nucleus of early bovine embryos prior to the MET, and third, TBP accumulates in the nucleus right at an appropriate time during the 8- to 16-cell stage. This study also established for the first time the expression and localization of *ATF2* in early mammalian embryogenesis. Further investigations such as knockdown experiments using RNA interference could reveal functional details on the implication of these factors, especially *ATF2*, in the genome activation of early embryos.

Furthermore, this study highlights the importance of characterizing both mRNA and protein levels of specific genes during early embryo development in the understanding of the roles of these genes in early embryo development, as mRNA and protein levels are not always related. By focusing on only three genes, three distinct relationships between mRNA and protein levels in pre-MET bovine embryos were demonstrated.

3.8 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Isabelle Laflamme for her technical assistance in embryos production. Also, we thank Dr. Richard Schultz for the kind gift of the MSY2 antibody. We also thank Gabrielle Roy for her technical assistance. Finally, we would like to thank Dr Susan Novak and David Gosselin for manuscript corrections Canadian Natural Sciences and Engineering Research Council, the Fonds Quebecois de Recherche sur la Nature et les technologies and the Canada Research Chair for their financial support.

3.9 REFERENCES

- Almouzni G & Wolffe AP 1995 Constraints on transcriptional activator function contribute to transcriptional quiescence during early *Xenopus* embryogenesis. *Embo J* 14 1752-1765.
- Barnes FL & First NL 1991 Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 29 117-123.
- Bhousmik A, Huang TG, Ivanov V, Gangi L, Qiao RF, Woo SL, Chen SH & Ronai Z 2002 An ATF2-derived peptide sensitizes melanomas to apoptosis and inhibits their growth and metastasis. *J Clin Invest* 110 643-650.
- Bouvet P & Wolffe AP 1994 A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus* oocytes. *Cell* 77 931-941.
- Camous S, Kopečný V & Flechon JE 1986 Autoradiographic detection of the earliest stage of [³H]-uridine incorporation into the cow embryo. *Biol Cell* 58 195-200.
- Frei RE, Schultz GA & Church RB 1989 Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J Reprod Fertil* 86 637-641.
- Gazdag E, Rajkovic A, Torres-Padilla ME & Tora L 2007 Analysis of TATA-binding protein 2 (TBP2) and TBP expression suggests different roles for the two proteins in regulation of gene expression during oogenesis and early mouse development. *Reproduction* 134 51-62.
- Hassig CA & Schreiber SL 1997 Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. *Curr Opin Chem Biol* 1 300-308.
- Huguier S, Baguet J, Perez S, van Dam H & Castellazzi M 1998 Transcription factor ATF2 cooperates with v-Jun to promote growth factor-independent proliferation in vitro and tumor formation in vivo. *Mol Cell Biol* 18 7020-7029.
- Hyttel P, Viuff D, Avery B, Laurincik J & Greve T 1996 Transcription and cell cycle-dependent development of intranuclear bodies and granules in two-cell bovine embryos. *J Reprod Fertil* 108 263-270.
- Jallow Z, Jacobi UG, Weeks DL, Dawid IB & Veenstra GJ 2004 Specialized and redundant roles of TBP and a vertebrate-specific TBP paralog in embryonic gene regulation in *Xenopus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 13525-13530.
- Kim ES, Sohn YW & Moon A 2007 TGF-beta-induced transcriptional activation of MMP-2 is mediated by activating transcription factor (ATF)2 in human breast epithelial cells. *Cancer Lett* 252 147-156.

- Kimelman D, Kirschner M & Scherson T 1987 The events of the midblastula transition in *Xenopus* are regulated by changes in the cell cycle. *Cell* 48 399-407.
- King WA, Niar A, Chartrain I, Betteridge KJ & Guay P 1988 Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos. *J Reprod Fertil* 82 87-95.
- Kopecny V, Flechon JE, Camous S & Fulka J, Jr. 1989 Nucleologenesi and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. *Mol Reprod Dev* 1 79-90.
- Lavoit MC, Kelk D, Rumph N, Barnes F, Betteridge KJ & King WA 1997 Transcription and translation in bovine nuclear transfer embryos. *Biol Reprod* 57 204-213.
- Majumder S, Miranda M & DePamphilis ML 1993 Analysis of gene expression in mouse preimplantation embryos demonstrates that the primary role of enhancers is to relieve repression of promoters. *Embo J* 12 1131-1140.
- McGraw S, Vigneault C, Tremblay K & Sirard MA 2006 Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. *Mol Reprod Dev*.
- McGraw S, Vigneault C & Sirard MA 2007 Temporal expression of factors involved in chromatin remodeling and in gene regulation during early bovine in vitro embryo development. *Reproduction* 133 597-608.
- Memili E, Dominko T & First NL 1998 Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 51 36-41.
- Muller F, Lakatos L, Dantonel J, Strahle U & Tora L 2001 TBP is not universally required for zygotic RNA polymerase II transcription in zebrafish. *Curr Biol* 11 282-287.
- Natale DR, Kidder GM, Westhusin ME & Watson AJ 2000 Assessment by differential display-RT-PCR of mRNA transcript transitions and alpha-amanitin sensitivity during bovine preattachment development. *Mol Reprod Dev* 55 152-163.
- Newport J & Kirschner M 1982 A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription. *Cell* 30 687-696.
- Papassava P, Gorgoulis VG, Papaevangelidou D, Vlahopoulos S, van Dam H & Zoumpourlis V 2004 Overexpression of activating transcription factor-2 is required for tumor growth and progression in mouse skin tumors. *Cancer Res* 64 8573-8584.
- Pennetier S, Perreau C, Uzbekova S, Thelie A, Delaleu B, Mermillod P & Dalbies-Tran R 2006 MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. *BMC Dev Biol* 6 26.

- Plante L, Plante C, Shepherd DL & King WA 1994 Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. *Mol Reprod Dev* 39 375-383.
- Rasband WS 1997-2007 ImageJ. U. S. National Institutes of Health Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Recio JA & Merlino G 2002 Hepatocyte growth factor/scatter factor activates proliferation in melanoma cells through p38 MAPK, ATF-2 and cyclin D1. *Oncogene* 21 1000-1008.
- Rozen S & Skaletsky HJ 2000 Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386 (Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).
- Ruzanov PV, Evdokimova VM, Korneeva NL, Hershey JW & Ovchinnikov LP 1999 Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *J Cell Sci* 112 (Pt 20) 3487-3496.
- Schultz RM 2002 The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update* 8 323-331.
- Soop T, Nashchekin D, Zhao J, Sun X, Alzhanova-Ericsson AT, Bjorkroth B, Ovchinnikov L & Daneholt B 2003 A p50-like Y-box protein with a putative translational role becomes associated with pre-mRNA concomitant with transcription. *J Cell Sci* 116 1493-1503.
- Strizzi L, Bianco C, Normanno N & Salomon D 2005 Cripto-1: a multifunctional modulator during embryogenesis and oncogenesis. *Oncogene* 24 5731-5741.
- Tafari SR & Wolffe AP 1990 *Xenopus* Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 9028-9032.
- Telford NA, Watson AJ & Schultz GA 1990 Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26 90-100.
- Thomas MC & Chiang CM 2006 The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41 105-178.
- Veenstra GJ, Destree OH & Wolffe AP 1999 Translation of maternal TATA-binding protein mRNA potentiates basal but not activated transcription in *Xenopus* embryos at the midblastula transition. *Mol Cell Biol* 19 7972-7982.

- 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.
- Villarreal XC & Richter JD 1995 Analysis of ATF2 gene expression during early *Xenopus laevis* development. *Gene* 153 225-229.
- Viuff D, Avery B, Greve T, King WA & Hyttel P 1996 Transcriptional activity in in vitro produced bovine two- and four-cell embryos. *Mol Reprod Dev* 43 171-179.
- Wang K, Sun F & Sheng HZ 2006 Regulated expression of TAF1 in 1-cell mouse embryos. *Zygote* 14 209-215.
- Wang Z & Lindquist S 1998 Developmentally regulated nuclear transport of transcription factors in *Drosophila* embryos enable the heat shock response. *Development* 125 4841-4850.
- Weston A & Sommerville J 2006 Xp54 and related (DDX6-like) RNA helicases: roles in messenger RNP assembly, translation regulation and RNA degradation. *Nucleic Acids Res* 34 3082-3094.
- Wiekowski M, Miranda M & DePamphilis ML 1993 Requirements for promoter activity in mouse oocytes and embryos distinguish paternal pronuclei from maternal and zygotic nuclei. *Dev Biol* 159 366-378.
- Worrad DM, Ram PT & Schultz RM 1994 Regulation of gene expression in the mouse oocyte and early preimplantation embryo: developmental changes in Sp1 and TATA box-binding protein, TBP. *Development* 120 2347-2357.
- Yang J, Medvedev S, Reddi PP, Schultz RM & Hecht NB 2005a The DNA/RNA-binding protein MSY2 marks specific transcripts for cytoplasmic storage in mouse male germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 1513-1518.
- Yang J, Medvedev S, Yu J, Tang LC, Agno JE, Matzuk MM, Schultz RM & Hecht NB 2005b Absence of the DNA-/RNA-binding protein MSY2 results in male and female infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 5755-5760.
- Yang Y, Cao J, Huang L, Fang HY & Sheng HZ 2006 Regulated expression of TATA-binding protein-related factor 3 (TRF3) during early embryogenesis. *Cell Res* 16 610-621.
- Yiu GK & Hecht NB 1997 Novel testis-specific protein-DNA interactions activate transcription of the mouse protamine 2 gene during spermatogenesis. *J Biol Chem* 272 26926-26933.
- Yu J, Hecht NB & Schultz RM 2001 Expression of MSY2 in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol Reprod* 65 1260-1270.

- Yu J, Hecht NB & Schultz RM 2002 RNA-Binding Properties and Translation Repression In Vitro by Germ Cell-Specific MSY2 Protein. *Biol Reprod* 67 1093-1098.
- Yu J, Hecht NB & Schultz RM 2003 Requirement for RNA-binding activity of MSY2 for cytoplasmic localization and retention in mouse oocytes. *Dev Biol* 255 249-262.
- Yu J, Deng M, Medvedev S, Yang J, Hecht NB & Schultz RM 2004 Transgenic RNAi-mediated reduction of MSY2 in mouse oocytes results in reduced fertility. *Dev Biol* 268 195-206.

3.10 FIGURES

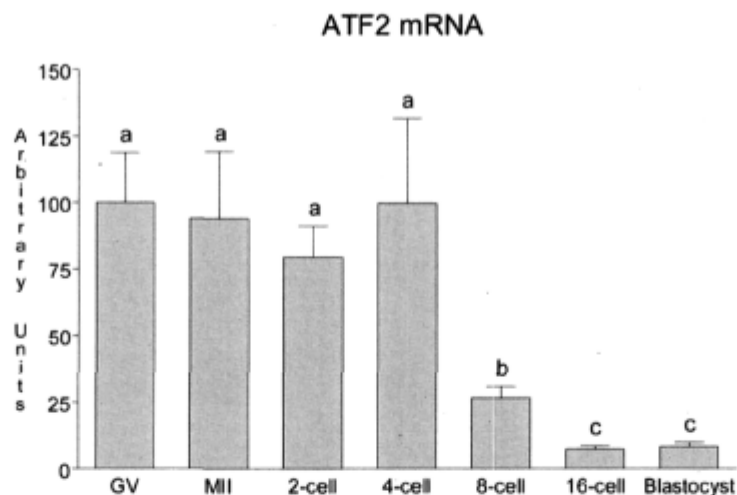


Figure 3.1. Quantification of *ATF2* mRNA in bovine oocytes and early embryos using real-time RT-PCR. Each developmental stage was performed in triplicate using one oocyte or one embryo per reaction. The relative mRNA levels shown represent the quantity of transcript corrected with the *GFP* value obtained for each pool. The highest level in each case was given the arbitrary value of 100 and levels shown are relative to the highest level (mean \pm SEM). Abbreviations for the developmental stages are: GV= GV oocytes, MII = MII oocytes, 2C = 2-cell stage embryos, 4C = 4-cell stage embryos, 8C = 8-cell stage embryos, 16C = 16-cell stage embryos and Bl. = Blastocysts. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

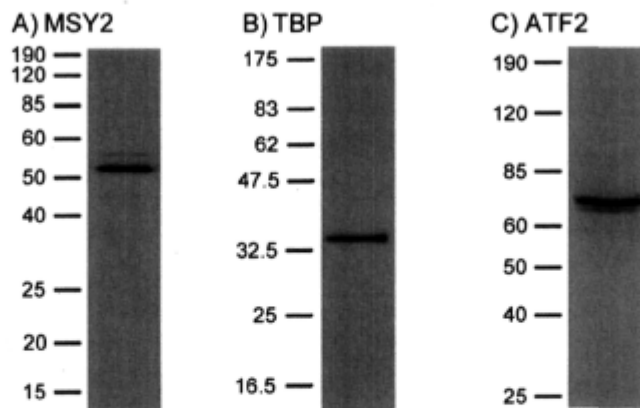


Figure 3.2. Immunoblotting showing antibody specificity with bovine protein samples. A, B and C show the specificity of antibodies used for the detection of bovine MSY2, TBP and ATF2 protein respectively. 30 and 100 GV oocytes were used for MSY2 and ATF2 respectively while 80 blastocysts were used for TBP.

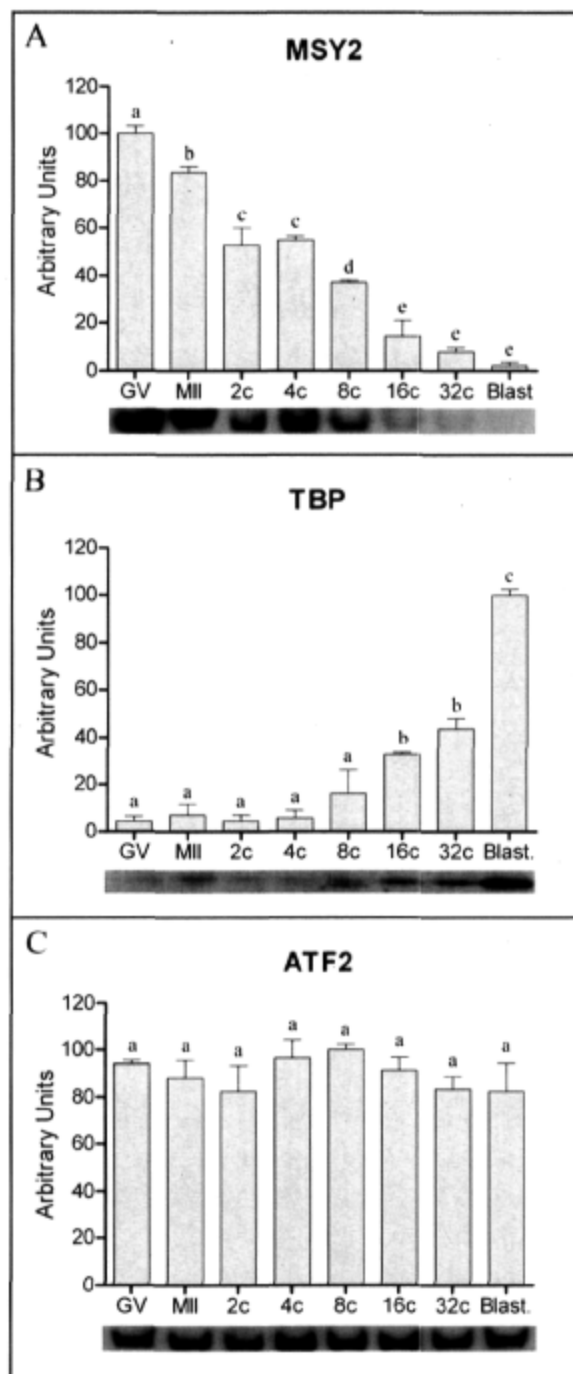


Figure 3.3. Immunoblotting showing protein expression throughout development. A, B and C illustrate developmental expression of MSY2, TBP and ATF2 in bovine oocytes and early embryos. Protein content of 50 (or 75, see materials and methods) oocytes and embryos of each stage were loaded in each lane. Abbreviations for the developmental stages are: GV= GV oocytes, MII = MII oocytes, 2C = 2-cell stage embryos, 4C = 4-cell stage embryos, 8C = 8-cell stage embryos, 16C = 16-cell stage embryos, 32C = 32-cell stages embryos and Bl. = Blastocysts. Blots were repeated three times and representative blots are displayed. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

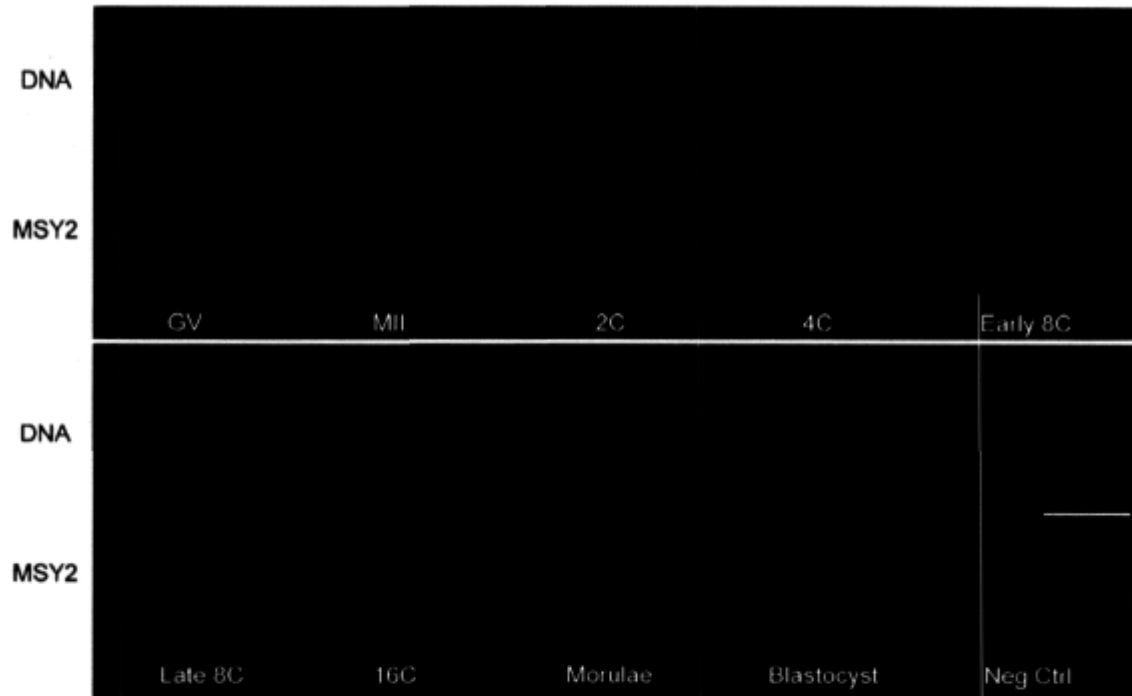


Figure 3.4. Immunolocalization of MSY2 in the oocyte and during early embryo development. Confocal images of oocytes (GV and MII) and embryos (2-, 4-, early 8-, late 8-, 16-cell, morulae and blastocyst) stained in green with anti-MSY2 antibody and in red with propidium iodide to visualize the DNA. Magnification x600. Scale bar = 100 μ M.

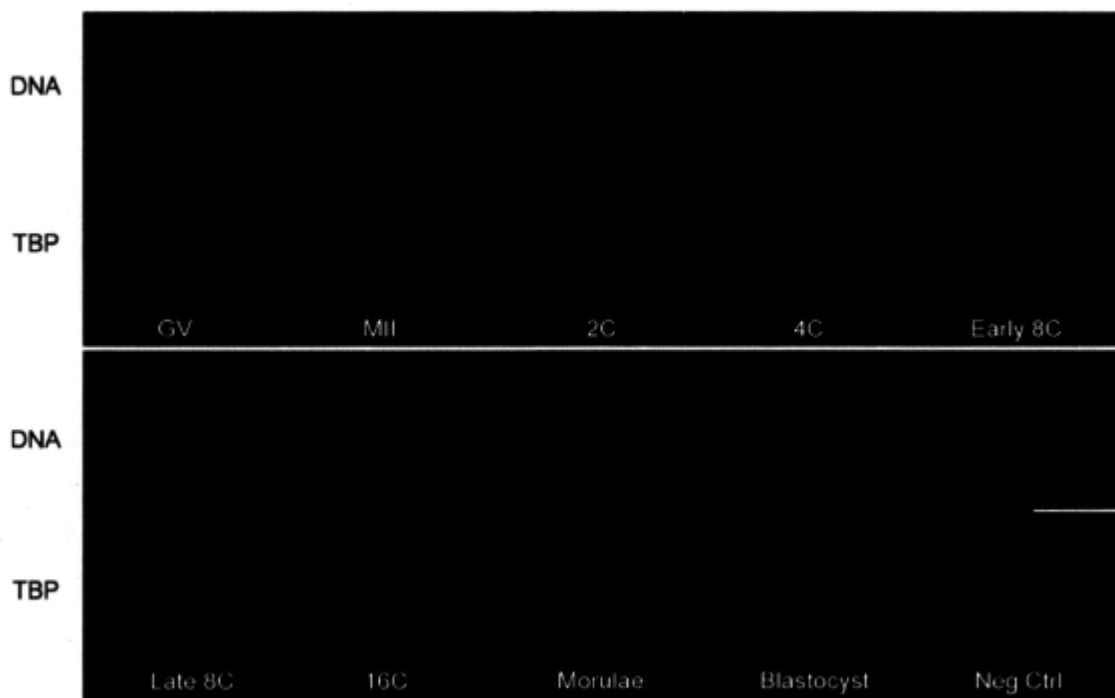


Figure 3.5. Immunolocalization of TBP in the oocyte and during early embryo development. Confocal images of oocytes (GV and MII) and embryos (2-, 4-, early 8-, late 8-, 16-cell, morulae and blastocyst) stained in green with anti-TBP antibody and in red with propidium iodide to visualize the DNA. Magnification x600. Scale bar = 100 μ M.

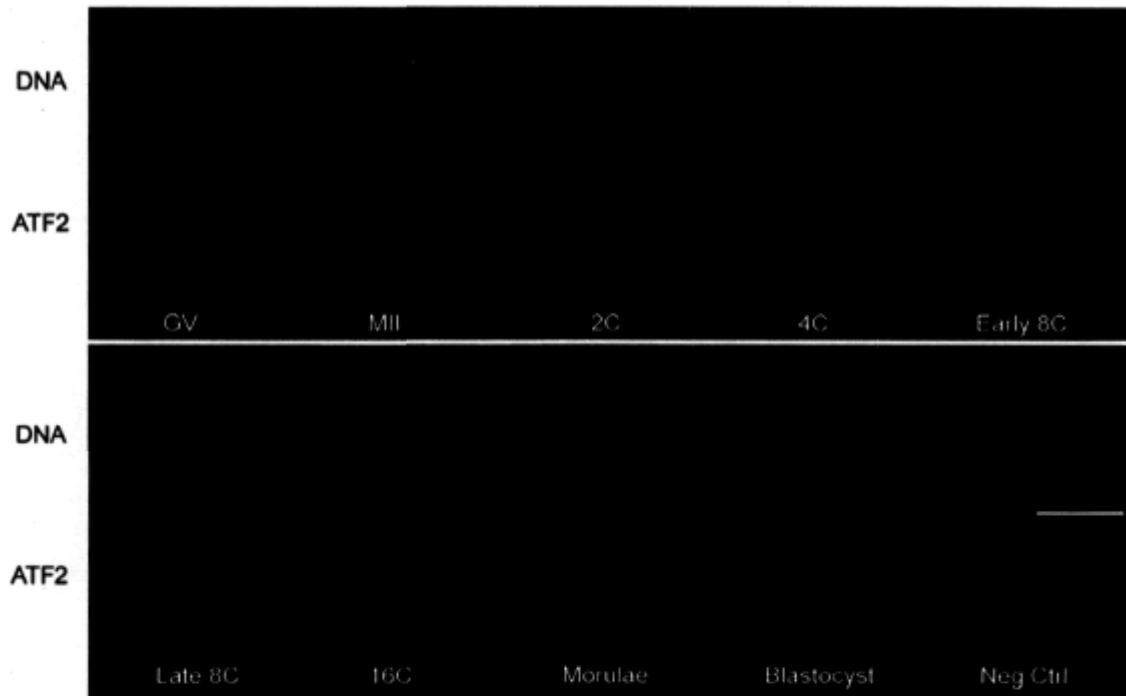


Figure 3.6. Immunolocalization of ATF2 in the oocyte and during early embryo development. Confocal images of oocytes (GV and MII) and embryos (2-, 4-, early 8-, late 8-, 16-cell, morulae and blastocyst) stained in green with anti-ATF2 antibody and in red with propidium iodide to visualize the DNA. Magnification x600. Scale bar = 100 μ M.

**CHAPITRE IV : DÉVOILEMENT DU TRANSCRIPTOME À LA
TRANSITION MATERNELLE EMBRYONNAIRE CHEZ
L'EMBRYON BOVIN**

**CHAPTER IV : UNVEILING THE BOVINE EMBRYO
TRANSCRIPTOME DURING THE MATERNAL TO EMBRYONIC
TRANSITION**

Christian Vigneault, Catherine Gravel, Maud Vallée, Serge McGraw
et Marc-André Sirard

Ce chapitre a été accepté pour publication dans la revue « Reproduction »

4.1 RÉSUMÉ

Le jeune embryon bovin est transcriptionnellement inactif et subsiste grâce aux réserves maternelles d'ARNm et de protéines entreposées dans l'ovocyte. Chez le bovin, l'initiation de la transcription se produit aux stades 8- à 16-cellules et cette substitution de l'origine des ARNm contenus dans l'embryon se nomme la transition maternelle embryonnaire (MET). Bien que cette étape est extrêmement importante étant donné que son inhibition provoque un arrêt du développement embryonnaire, très peu d'information est disponible à ce jour quant à la nature des transcrits nouvellement exprimés à la MET chez le bovin. Dans cette étude, nous décrivons la construction d'une librairie d'ADN complémentaire enrichie en transcrits embryonnaires exprimés dans l'embryon bovin 8-cellules. Grâce à l'application de la technique d'hybridation soustractive sélective (SSH), nous avons isolé plus de 300 transcrits uniques surexprimés dans les embryons 8-cellules par rapport aux embryons 8-cellules dans lesquels la transcription avait été inhibée par l' α -amanitine. La liste des transcrits obtenue est très intéressante quant à la fonction des gènes qui s'y retrouvent puisque la majorité sont impliqués soit dans la transcription, la manipulation des ARNm ou la synthèse protéique, ce qui correspond à l'activité prévue des embryons à la MET. Nous illustrons finalement en quoi cette collection de gènes pourrait servir d'outil moléculaire pour étudier l'amélioration des milieux de culture embryonnaire ou la reprogrammation cellulaire lors du clonage.

4.2 ABSTRACT

Bovine early embryos are transcriptionally inactive and subsist through the initial developmental stages by the consumption of the maternal supplies provided by the oocyte until its own genome activation. In bovine, activation of transcription occurs during the 8- to 16-cell stages and is associated with a phase called the maternal to embryonic transition (MET) where maternal mRNA are replaced by embryonic ones. Although the importance of the MET is well accepted (its inhibition blocks embryonic development), very little is known about the transcripts expressed at this crucial step in embryogenesis. In this study, we generated and characterized a cDNA library enriched in embryonic transcripts expressed at MET in the bovine. Subtractive suppressive hybridization followed by microarray hybridization was used to isolate more than 300 different transcripts overexpressed in untreated late 8-cell embryos compared to those treated with the transcriptional inhibitor, α -amanitin. Quantitative RT-PCR of fifteen genes from this library was used to validate the microarray data. The transcripts isolated in this cDNA library have an interesting composition in terms of molecular functions; the majority is involved in gene transcription, RNA processing or protein biosynthesis and many are potentially involved in the maintenance of pluripotency observed in embryos. This collection of genes associated with MET is a novel and important tool that will be helpful in the understanding of particular events such as the reprogramming of somatic cells by nuclear transfer or for the improvement of embryonic culture conditions.

4.3 INTRODUCTION

Early mammalian embryos exhibit very special features. They are produced by the fusion of two differentiated cells, the oocyte and the spermatozoa, to form a zygote, which then cleaves into an embryo composed of undifferentiated cells that are transcriptionally silent. This transcriptionally-quiescent embryo divides under maternal control until major genomic activation, a process which occurs at the 8- to 16-cell stage in bovine embryos (Camous *et al.*, 1986, Frei *et al.*, 1989, King *et al.*, 1988, Kopecny *et al.*, 1989, Telford *et al.*, 1990). The substitution of maternally-derived mRNA by the embryonic mRNA is called the maternal to embryonic transition (MET). This step in embryogenesis is crucial; inhibition of newly synthesized mRNA transcripts with α -amanitin was shown to induce a developmental block in these embryos at the 16-cell stage (Plante *et al.*, 1994, Liu & Foote, 1997, Memili & First, 1998).

Although the major transcriptional burst occurs in 8- to 16-cell stage embryos, minor transcriptional events have been reported at earlier stages (Barnes & First, 1991, Plante *et al.*, 1994, Hyttel *et al.*, 1996, Viuff *et al.*, 1996, Lavoit *et al.*, 1997, Memili *et al.*, 1998a, Natale *et al.*, 2000b). Despite the fact that few transcripts are expressed at these initial embryonic stages, significant transcriptional activity and dramatic changes in mRNA composition have been observed in 6- to early 8-cell embryos (Natale *et al.*, 2000b). Furthermore, there is a striking distinction in the mRNA composition between pre- and post-MET embryos. Whereas pre-MET embryos possess an mRNA population very similar to that of the oocyte, early 8-cell embryos already display an mRNA profile comparable to that found in the blastocyst (Natale *et al.*, 2000b). This suggests that as soon as the embryo reaches the MET, the embryonic program designed to bring it to the blastocyst stage is launched. This process includes an uncommon event called nuclear reprogramming, which is vital in establishing the fully pluripotent state found in embryos. The maintenance of pluripotency in early embryos is complex and not entirely understood yet. Some key genes, including POU class 5 homeobox 1 (*OCT-4*), Nanog homeobox (*NANOG*), signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT3*) and SRY-box containing gene 2 (*SOX-2*), are required to establish and maintain this event in embryos and

embryonic stem cells, although the mechanisms involved in their activation and the identification of their downstream targets have not been fully elucidated (reviewed in Johnson *et al.*, 2006).

Several studies have described global mRNA expression patterns associated with the MET in mouse embryos (Sharov *et al.*, 2003, Hamatani *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004, Zeng *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2006, Cui *et al.*, 2007). It is apparent, however, that these patterns may differ from species to species. Recently, a global representation of the transcriptome found in bovine 8-cell embryos was obtained by probing microarray slides with amplified mRNA from 8-cell stage embryos treated or untreated with the transcriptional inhibitor α -amanitin (Misirlioglu *et al.*, 2006). Although this study contributed valuable information about transcription in bovine embryos at the MET, the commercial chip used was not enriched with embryonic transcripts, and therefore only provided a partial picture of genes expressed at that period. Previous studies using differential display RT-PCR (DDRT-PCR) also revealed the presence of transcripts differentially overexpressed in 8-cell stage bovine embryos compared to previous or subsequent stages of development (Natale *et al.*, 2000b, Ponsuksili *et al.*, 2002, Tesfaye *et al.*, 2003). Despite the success obtained with this PCR-based technique, the low sensitivity and poor efficiency in recovery of the identified differentially expressed genes has limited this method's use.

In the current study, we used a subtractive suppressive hybridization (SSH) technique to produce a library of newly transcribed genes in bovine 8-cell stage embryos. This sensitive approach allowed us to identify more than 300 unique embryonic transcripts expressed at the MET. The high proportion of true positive clones in our library was confirmed by real-time RT-PCR. This library reveals that there is an unusually high representation of genes associated with transcription, RNA processing and protein biosynthesis expressed at the bovine MET. The gene collection provided by this library offers a very useful tool for monitoring the onset of transcription in early embryos produced under different culture conditions or in cell reprogramming occurring in embryos produced by somatic cell nuclear transfer.

4.4 MATERIALS AND METHODS

All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, On, Canada) unless otherwise stated.

4.4.1 Oocyte collection and embryo production

Bovine ovaries were collected at a commercial slaughterhouse and transported in a 0.9% NaCl aqueous solution containing antimycotic agent. Cumulus-oocyte complexes (COCs) from 3- to 6-mm follicles were collected and only healthy COCs with at least 5 layers of cumulus cells were conserved for embryo production (Blondin & Sirard, 1995).

COCs were put through *in vitro* maturation after three washes in HEPES-buffered Tyrode lactate medium (TLH) supplemented with 0.3% fatty acid free bovine serum albumin (FAF-BSA) (Lifeblood Medical, Adelphia, NJ, USA), 0.2 mM pyruvic acid and 50 µg/mL gentamicin. Groups of 10 COCs were placed in droplets of media under mineral oil. Each droplet consisted of 50 µL of maturation medium composed of modified synthetic oviductal fluid (SOF) (Holm *et al.*, 1999) supplemented with 0.8% FAF-BSA, 1X MEM essential and nonessential amino acids (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada), 1mM glutamine, 50 µg/mL gentamicin, 0.5 µg/mL FSH and 1 µg/mL 17β-estradiol. The droplets containing COCs were incubated in a humidified atmosphere for 24h at 38.5°C with 5% CO₂.

For *in vitro* fertilization, 5 matured COCs were added to 48 µL droplets under mineral oil. These droplets were composed of modified Tyrode lactate medium, supplemented with 0.6% FAF-BSA, 0.2 mM pyruvic acid, 10 µg/mL heparin and 50 µg/mL gentamycin. Prior to transfer, the COCs were washed twice in TLH containing 0.3% FAF-BSA, 0.2 mM pyruvic acid and 50 µg/mL gentamicin. Once transferred, 2 µL of PHE (1 mM hypotaurine, 2 mM penicillamine, 250 mM epinephrine) was added to each droplet 10 min before the addition of semen. The semen consisted of a cryopreserved mixture of ejaculates from three bulls (Centre d'Insémination Artificielle du Québec; CIAQ, St-

Hyacinthe, Qc, Canada). The semen was thawed in 37°C water for 1 min, 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 pellet was washed and centrifuged at 250 ×g for 5 min at room temperature. The supernatant was discarded and the spermatozoa were counted on a hemocytometer to obtain a final concentration of 1 x 10⁶ cells/mL and resuspended in IVF medium. Finally, 2 µl of the sperm suspension was added to each droplet and the incubation took place in a humidified atmosphere at 38.5°C, in 5% CO₂ for 18h.

Following fertilization, presumed zygotes were mechanically denuded by repetitive pipetting, washed in PBS containing 0.3% FAF-BSA for complete removal of spermatozoa and cumulus cells and then transferred to culture droplets (50 µL) in groups of 20-30 embryos. Embryo culture was performed in modified SOF1 medium under mineral oil at 38.5°C in 5% CO₂ in a reduced oxygen atmosphere (7%) with high humidity.

In the α -amanitin treatment groups, embryos were cultured with 25 ug/ml α -amanitin (added to the culture medium) from the zygote stage until embryo recovery. SOF1 medium (0.8% FAF-BSA, MEM nonessential amino acids, 1 mM glutamine, 1.5 mM glucose, 10 µM EDTA and 50 µg/mL gentamicin) was replaced after 72 h of culture with SOF2 medium (0.8% FAF-BSA, MEM essential and nonessential amino acids, 1 mM glutamine, 1.5 mM glucose and 50µg/mL gentamicin). The effectiveness of the defined SOF system for bovine *in vitro* embryos development has already been shown (Ali & Sirard, 2002).

4.4.2 Oocyte and embryo collection

The 2-, 4-, 6- to 8- (early 8-cell), 8-to 12-cell (late 8-cell) and blastocyst stage embryos were collected 32 h, 44 h, 55 h, 90 h and 8 days post fertilization, respectively. For cDNA library construction, pools of 60 late 8-cell embryos cultured in the presence or absence of α -amanitin were obtained. For microarray analyses, pools of 10 embryos of 2-, 4- and late 8-cell stage were gathered. Immature GV oocytes were collected for real-time

PCR analysis after selection and mechanical cumulus cell removal. Denuded oocytes were washed in RNase-free PBS to ensure elimination of all cumulus cells and frozen in three pools of 20 oocytes at -80°C until RNA extraction. Additionally, three pools of 20 embryos of 2-, early 8-, late 8- and blastocyst stages were collected for real-time RT-PCR experiments. All embryos were washed 3 times in RNase-free PBS, frozen and stored at -80°C until RNA extraction.

4.4.3 RNA extraction

RNA extraction was achieved using the Picopure RNA isolation kit (Arcturus Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA was eluted in 10 µl of elution buffer and frozen at -80°C until use. For real-time RT-PCR, 1 pg of exogenous *GFP* poly(A) RNA was added to each sample at the beginning of extraction as a technical exogenous control for RNA extraction and reverse transcription steps (Vigneault *et al.*, 2004).

4.4.4 cDNA preparation and suppressive subtractive hybridization (SSH)

Total RNA from 60 α -amanitin-treated and 60 untreated late 8-cell embryos was reverse-transcribed and amplified using the Super SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) according to the manufacturer's instructions for PCR-select cDNA subtraction applications. RNA integrity was monitored with the Bioanalyzer (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada) before SMART amplification. Following the cDNA amplification optimization step, 21 PCR cycles for both samples provided satisfactory amplification yields without reaching a plateau. To avoid overcycling, both samples were removed after 19 cycles of amplification. Amplified double-stranded cDNA was then purified on a NucleoSpin Extract II column as recommended in the SuperSMART instructions, and fractionated on a CHROMA Spin-1000 column before being subjected to *RsaI* digestion. *RsaI*-digested cDNA was purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and precipitated using sodium acetate as recommended. *RsaI*-digested cDNA was then

dissolved in TNE buffer and concentrations were determined using the Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop technologies, Wilmington, DE, USA).

Suppressive subtractive hybridization (SSH) was performed using the Clontech PCR-Select cDNA subtraction kit (Clontech) according to the manufacturer's recommendations. *RsaI*-digested cDNA from α -amanitin-treated 8-cell embryos was the *driver*, and that of the untreated controls was the *tester*. Differentially expressed cDNA obtained from the SSH experiment was then cloned into the TOPO Cloning 5-minute PCR Cloning Kit (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and transformed into One Shot MAX Efficiency DH5 α -T1 Competent Cells (Invitrogen).

4.4.5 Libraries production and cDNA slides preparation

Transformed bacteria were selected on LB/ampicillin/X-Gal agar plates. More than 1000 white colonies were picked and resuspended in 200 μ l LB + ampicillin (50 μ g/ml) and grown for 6 h at 37°C with shaking. PCR amplifications were carried out from 2 μ l of bacterial suspension with the HotMaster Taq DNA polymerase (Eppendorf, Mississauga, ON, Canada) using the nested PCR Primer 1 (5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3') and 2R (5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3') (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). The remaining bacterial suspension was kept in 20% glycerol at -80°C. A 3 μ l aliquot of each PCR reaction was analysed by electrophoresis on a 2% agarose gel to visualize single insert-containing clones.

The remaining PCR products were purified using Unifilter 384-well purification plates (Whatman, Toronto, ON, Canada). Aliquots from positive clones were retained for the sequencing reaction and clone identification. Purified PCR products were dried and resuspended in H₂O/DMSO (1:1) before being spotted at three different locations on GAPS II glass slides (Corning, Lowell, MA, USA) using a VersArray ChipWriter Pro robot (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Slides were then cross-linked with UV rays according to the manufacturer's instructions.

4.4.6 mRNA amplification

Confirmation of the positives clones obtained from the SSH was performed by a single microarray hybridization done in dye swap (see below in section 4.4.8) with amplified RNA (aRNA) probes produced from new pools of 10 late 8-cell stage embryos treated and untreated with α -amanitin. Amplified RNA was produced using the Riboamp HS RNA amplification kit (Arcturus Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). This kit facilitates the production of approximately 50 μ g of RNA from very small samples by two successive rounds of *in vitro* T7 RNA transcription. In the second round of transcription, amino allyl UTPs (Arcturus) were substituted with regular UTPs to allow subsequent labelling of the aRNA.

4.4.7 Labelling of aRNA

An aliquot of 2.5 μ g of aRNA from each sample (α -amanitin-treated and untreated) was used for labelling. Probes were labelled with Alexa Fluor 555 and 647 reactive dye packs (Molecular Probes, subdivision of Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Alexa-coupled aRNA was purified with Picopure RNA isolation kit (Arcturus) to remove uncoupled dyes.

4.4.8 Microarray hybridization

Hybridization was performed at 50°C for 18 h in SlideHyb Glass Array Hybridization Buffer #1 (Ambion, Austin, Tx, USA) using a Slide Booster apparatus (Advalytix, Concord, MA, USA). To remove unhybridized probes, slides were washed twice in 1X SSC/0.2% SDS for 15 min at 50°C and twice in 0.1X SSC/0.2% SDS for 15 min at 50°C. Slides were then scanned using the VersArray ChipReader System (Bio-Rad Laboratories) and analyzed with the ArrayPro Analyzer software (Media Cybernetics, San Diego, CA, USA). A dye swap experiment was conducted to reduce the negative effects resulting from differences in dye incorporation and slide reading.

4.4.9 Microarray analysis

Microarray data analysis was performed using the NIA Array Analysis software, a web-based tool accessible at this address: <http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/> (Sharov *et al.*, 2005). Only clones with a significant signal and with at least a 2-fold change (FDR < 0.05) in the untreated versus α -amanitin-treated sample were considered to be positive and subsequently sequenced.

Additional experiments were carried out with untreated and α -amanitin-treated 2-cell and 4-cell stage embryos. All procedures, from RNA extraction to microarray hybridization and data analysis, were identical to those described for the 8-cell embryos.

4.4.10 Sequencing and clone identification

DNA sequencing was performed using an automated ABI 3730 DNA sequencer (PE Applied BioSystems, Streetsville, ON, Canada). Sequencing reactions were carried out with the ABI Prism BigDyeTM terminator cycle sequencing ready reactions kits (PE Applied BioSystems) and nested PCR primer 1 (5'-TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3') (BD Biosciences). Sequence traces were visualized with the freeware Chromas 1.45 (Technelysium Pty Ltd) and uploaded into a cDNA Library Manager (program written by Genome Canada Bioinformatics Help Desk according to our needs) (Vallee *et al.*, 2005). The cDNA Library Manager automates and facilitates the sequence trace analysis and clone identification. Briefly, sequence traces were uploaded into the cDNA Library Manager under a particular library name and clone number. The sequences were then trimmed (Phred software) and compared against a locally installed GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>). BLAST results, including GeneBank accession number, UniGene number, score, e-value, % homology, number of nucleotides aligned, position of alignment, etc. were compiled in a report.

4.4.11 cDNA preparation and real-time RT-PCR

mRNA from pools of 20 oocytes and embryos of 2-cell, 6-8-cell, 8-12-cell and blastocyst stages was reverse transcribed using oligo(dT)₁₈ primers (1 μ M) (or random nanomers (10 μ M) in a confirmation experiment) and Sensiscript RT kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations with the addition of 10 units of recombinant RNasin (Promega, Madison, WI, USA). The primers used for real-time RT-PCR are listed in Table 4.1 and were designed using the Primer3 web interface (Rozen & Skaletsky, 2000) from sequences obtained from the sequencing of the positives clones obtained by microarray analysis. For each gene examined, a standard curve consisting of PCR products purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and quantified by Nanodrop was included. Real-time PCR was performed on a Lightcycler apparatus (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) using SYBR green incorporation. Each reaction contained the cDNA corresponding to half of an oocyte or embryo and a mixture containing 0.5 μ L of each primer (10 μ M), 1.6 μ L of 25mM MgCl₂ (final concentration of 3 mM), 2 μ L of the SYBR green mix containing dNTPs, FastStart DNA polymerase enzyme and buffer (Roche). The PCR conditions used for all genes were as follows: denaturing cycle of 10 min at 95°C; 45 PCR cycles (denaturing: 95°C for 1 sec, annealing: 58°C for 5 sec, extension: 72°C for 10 sec); a melting cycle consisting of 95°C for 1 sec, 70°C for 30 sec and of a step cycle starting at 70°C up to 95°C with a 0.2°C/sec transition rate; a final cooling cycle of 40°C for 30 sec. The cDNA quantification was performed using Lightcycler Software Version 3.5 (Roche) with comparison to the standard curve. PCR specificity was confirmed by melting curve analysis and sequencing of the PCR product.

4.4.12 Statistical analysis of the real-time PCR results

Messenger RNA measurements were normalized to the external control *GFP* as described previously (Vigneault *et al.*, 2004, McGraw *et al.*, 2006a.). Statistically significant differences in mRNA levels between developmental stages were calculated by ANOVA followed by a Newman-Keuls test. Replicates were included in the statistical

model. Differences were considered statistically significant at the 95% confidence level ($P < 0.05$). Data are presented as mean \pm SEM.

4.5 RESULTS

4.5.1 Suppressive subtractive hybridization and microarray hybridizations

Using SMART amplifications and the SSH technology, we produced a library of more than a thousand clones overexpressed in control 8-cell embryos compared with α -amanitin-treated 8-cell embryos. Spotting of the clones onto glass slides and hybridization of this microarray chip with probes produced from untreated and α -amanitin-treated late 8-cell embryos revealed that 626 clones showed an expression increase that was 2-fold or greater in the untreated group.

Similar hybridizations were carried out with untreated and α -amanitin-treated 2-cell and 4-cell embryos (data not shown). None of the 626 clones were demonstrated to be differentially expressed between the untreated and α -amanitin-treated groups, signifying that in our library, there are no differentially expressed genes at either of these embryonic stages.

Sequence analysis of the hybridized clones corresponding to embryonically-expressed transcripts established that the 626 clones corresponded to 311 distinct genes. Closer examination of these 311 transcripts revealed the presence of 25 novel transcripts, 77 known but uncharacterized transcripts and 209 known cDNAs with established function (Figure 4.1). The classification of the known cDNAs according to their primary molecular function created an interesting blueprint of the early bovine embryo transcriptome at MET. Indeed, 38% of the known cDNAs correspond to genes involved in transcriptional regulation and RNA processing and an additional 18% correspond to genes involved in protein biosynthesis. A description of these 311 transcripts, categorized according to their molecular function and ranked by their overexpression, is displayed in Table 4.2.

4.5.2 SSH Validation by quantitative RT-PCR

To validate the content of our library, quantitative RT-PCR experiments were conducted on 15 of the transcripts, which ranged in mRNA fold increase from 2.13 to 44.25 in late 8-cell bovine embryos following microarray hybridization and data analysis. Every gene examined showed a significant increase in expression in control late 8-cell embryos compared to embryos treated with the transcription inhibitor (Figure 4.2). Moreover, these experiments illustrated that 9 out of the 15 genes (60%) were expressed as early as the 6- to 8-cell stage (55 hpf). The genes were: dead box polypeptide 5 (*DDX5*), dead box polypeptide 39 (*DDX39*), prion protein (*PRNP*), spermatidal transition protein 3 (*TP3*), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G (*HNRPG*), kruppel-like factor 10 (*KLF10*), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (*HNRPA2B1*), beclin 1 (*BECN1*) and zinc finger protein 41 (*ZNF41*).

Distinct patterns of mRNA expression were obtained for the 15 genes examined. Indeed, while transcripts were present in the GV oocyte for the majority (11 out of 15) of the genes, four of them (*ZNF41*, *HNRPA2B1*, *BECN1* and zinc finger protein 42 (*ZFP42*)), displayed an exclusively mRNA embryonic presence. Additionally, even if a maternal presence for some transcripts (tumor protein translationally-controlled 1 (*TPT1*), transketolase (*TKT*), *HNRPG* and *KLF10*) was detected, the amount measured in pre-MET embryos was very low compared to post-MET levels. Finally, *TP3*, *ZNF41*, *HNRPA2B1* and *BCN1* were the only genes that demonstrated decreased expression in the blastocyst, in contrast to the rest which tended to increase at that stage. Finally, none of the 15 genes we examined was expressed as early as the 2-cell stage (Figure 4.2), corroborating the results obtained in our 2-cell embryo microarray hybridizations (data not shown).

To establish that our pools were not positively biased toward control embryos, the mRNA levels of two ubiquitous genes were measured (Figure 4.3). conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase (*CHUK*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) mRNA levels were identical in control and α -amanitin groups confirming that the amount of maternal mRNA was unaffected by treatment with the inhibitor.

Furthermore, to confirm that the low levels of transcripts detected in the α -amanitin-treated embryos was not due to deadenylation as an indirect result of this inhibitor, total RNA instead of poly (A) mRNA was reverse-transcribed using random nanomers as an alternative to oligo(dT)₁₈. Quantitative RT-PCR analyses verified that the two methods produced similar differential expression patterns between control and α -amanitin-treated 8-cell embryos (data not shown).

4.6 DISCUSSION

In this report, we describe the construction of a subtracted library consisting of the bovine embryo transcriptome during the MET. SSH technology permitted the isolation of exclusively *de novo*-expressed genes in late 8- to 12-cell embryos. Similar to the DDRT-PCR procedure, this technique detects differentially expressed genes between two groups, but with the advantages of significantly higher sensitivity and efficiency (Diatchenko *et al.*, 1996). In our study, we identified 311 unique transcripts expressed *do novo* in the late 8-cell embryos. Our results also demonstrated the high specificity of our microarray studies, since the values obtained by quantitative RT-PCR for all the candidates screened were consistent with those generated through the microarray data analysis. Furthermore, these validated genes demonstrated a wide range of overexpression by microarray, from low to high differential expression, providing high confidence for true positive transcripts in the remaining transcripts present in the SSH. We feel certain that few false positive clones will be discovered in the list generated by microarray analysis. For the SSH validation, we used probes produced from a distinct pool of embryos and amplified by a different method (*in vitro* T7 transcription) and not the same material used in the construction of the library. Although this approach decreased the absolute discovery rate, it ensured low false positive yields as it kept only the clones amplified differentially between the two treatments (α -amanitin-treated versus untreated 8-cell embryos) by the two techniques (T7 and SMART PCR amplification) and thus, reduced the bias caused by both methods.

The characterization of our library in terms of gene function was unexpected, as a very high proportion (56 %) of our library was related to genes involved in transcription, RNA processing and protein biosynthesis. These findings support the prediction of elevated gene activity at the MET, and are consistent with a study in mouse which reported a similar overrepresentation of transcripts coding for transcription factors and RNA processing factors at the MET (Zeng *et al.*, 2004). One strength of SSH is the amplification of rare transcripts which often encode transcription factors and other regulatory proteins (Diatchenko *et al.*, 1996). It is therefore not surprising that our procedure isolated a large number of transcriptional regulators compared to other techniques like DDRT-PCR that preferentially isolate highly expressed genes (Natale *et al.*, 2000b, Ponsuksili *et al.*, 2002, Tesfaye *et al.*, 2003).

Among the transcripts isolated in our library, only 6 genes out of 311 (nuclear transcription factor Y alpha (*NFYA*), histone H2a member Z (*H2AFZ*), acetyl-coenzyme A synthetase 2 like (*ACSSI* or *ACAS2L*), adenosylmethionine decarboxylase 1 (*AMD1*), ATP synthase H⁺ transporting mitochondrial F1 complex beta (*ATP5B*) and nucleoside phosphorylase (*NP*)) were previously identified in a study comparing similar tissues through hybridization on commercial microarray chips (Affymetrix) (Misirlioglu *et al.*, 2006). This discrepancy may be attributed to the fact that many of our clones are not found in the Affymetrix GeneChip bovine genome array gene annotation list, or not yet assigned. Also, since only a fraction of the embryonic transcripts identified by Misirlioglu *et al.* was published, some of our clones may be present in the list of unpublished transcripts (Misirlioglu *et al.*, 2006). Finally, differences between the embryo production systems and the precision in the developmental timing of the 8-cell embryos may explain the variability between the two studies.

Interestingly, a significant proportion of the genes validated in the real-time RT-PCR experiment (60%) were transcribed as early as 55 hpf, which corresponds to the 6- and very early 8-cell stage embryos in our culture system. This early transcriptional activation is consistent with previous publications that have described the α -amanitin-sensitive synthesis of proteins and the appearance of mRNA in this period of bovine

embryogenesis (Barnes & First, 1991, Natale *et al.*, 2000b). Several authors have speculated that a number of these early transcripts may play a key role in the activation of the major transcriptional burst detected at the 8- to 16-cell stage (Camous *et al.*, 1986, King *et al.*, 1988, Frei *et al.*, 1989, Kopecny *et al.*, 1989, Telford *et al.*, 1990, Hyttel *et al.*, 2000, Laurincik *et al.*, 2003). This is likely to be the case for genes such as *HNRPA2B1*, *HNRPG*, *KLF10*, *ZNF41*, *DDX5* and *DDX39* which are related to transcription, either directly by binding to DNA or indirectly through RNA processing (Franze *et al.*, 1991, Venables *et al.*, 2000, Carson *et al.*, 2001, Rossow & Janknecht, 2003, Kapadia *et al.*, 2006, Subramaniam *et al.*, 2007). To our knowledge, our study is the first to identify such a high proportion of transcripts expressed at the 6- to early 8-cell embryos in bovine embryogenesis. If the results from these 15 profiles can be extrapolated to the remainder of the library, there may be many more genes expressed at the 6-cell stage than previously imagined. This observation, combined with the presence of a relatively large number of transcriptional regulators and RNA processing factors in our library, suggests that many of these genes may play a role in the onset of the major transcriptional activation that occurs in late 8-cell embryos.

Interestingly, our RT-PCR validation revealed a sudden and transitory expression at the 6- or 8-cell stage for some genes (*TP3*, *HNRPA2B1*, *BECN1* and *ZNF41*). The transient expression of these genes suggests a temporal role for these factors in early embryonic development during MET. To our knowledge, only one gene, *EIF1A*, has been identified to have a similar transitory expression pattern in bovine embryos (De Sousa *et al.*, 1998). *EIF1A* was absent from our library although many eukaryotic translation initiation factors were detected, including *EIF3A*, *EIF3H*, *EIF4G2* and *EIF5*. Its absence is most likely attributable to the fact that *EIF1A* is only present in bovine early 8-cell embryos (De Sousa *et al.*, 1998) and late 8-cell embryos were used for the construction of our library. In the case of *ZNF41*, given its putative role in transcription (Franze *et al.*, 1991), its transitory expression in 6- to 8-cell stage embryos implies a role in gene transcription activation at MET. Furthermore, its early transcription in the 6-cell stage embryo indicates that it could act as a precursor to the major burst of transcription detected in late 8- and 16-cell stage embryos. The sudden expression of the RNA binding protein *HNRPA2B1*, which is

implicated in the trafficking and processing of mRNA (Landsberg *et al.*, 2006) suggests that it may be involved in mRNA processing during embryonic genome activation.

Many unknown or poorly characterized genes in early embryogenesis were identified in our library. A large number of our clones demonstrated extremely high homology to these genes, such as one coding for a putative spermatid transition protein 3 (*TP3*) isolated from ram spermatids (Chevaillier *et al.*, 1998). Transition nuclear proteins are known to replace somatic histones prior to their substitution by protamines during chromatin condensation in spermatogenesis (Meistrich *et al.*, 2003). The presence of *TP3* mRNA in oocytes, and its and transitory expression in the 6-cell stage bovine embryos is quite fascinating, but also puzzling. Because these proteins have not been associated with histone disruption during oocyte or embryo development, further studies are required to determine its function and to establish its involvement in events such as nuclear reprogramming in early embryos.

Unlike *ZNF41* and *HNRPA2B1*, the molecular function of *BECN1*, also known as *ATG6*, is not related to transcription. *BECN1* is implicated in the autophagy process used by cells to survive various stresses such as growth factors starvation or oxidative damage (Baehrecke, 2005, Ferraro & Cecconi, 2007). The autophagic process includes cytoplasmic degradation of cellular elements to eliminate affected constituents or to derive metabolites or energy from these degraded components. The short and sudden upsurge of *BECN1* in 8-cell embryos indicates that the culture medium may not have provided an optimal environment for embryonic growth. Some essential elements, such as growth factors, may have been excluded from the defined SOF culture system (without serum) and caused the embryo to exploit its available resources to survive. However, these speculations require further examination to be confirmed. Nevertheless, profiles for these genes illustrate the high potential of this library for the study and optimization of embryo culture systems, especially given the high sensitivity of embryos at MET to suboptimal culture conditions (Camous *et al.*, 1984a). We believe that our spotted library of the MET transcriptome provides a novel and high-quality tool to monitor the health status of the early bovine embryo.

Several clones isolated from our library enhanced our understanding of the key regulators involved in the maintenance of pluripotency in early embryos. In stem cells, the expression of *ZFP42*, also known as *REX-1*, is tightly regulated by *NANOG*, *SOX-2* and *OCT-4*, genes that are directly implicated in the maintenance of pluripotency in stem cells and embryos (Ben-Shushan *et al.*, 1998, Du *et al.*, 2001, Pelton *et al.*, 2002, Hough *et al.*, 2006, Shi *et al.*, 2006, Masui *et al.*, 2007). When *ZFP42* activity is reduced in mouse embryonic stem cells by RNAi knockdown, *OCT-4* expression is perturbed and immediate differentiation of the cells is induced (kZhang *et al.*, 2006). Our clone homologous to *ZFP42*, is completely absent from pre-MET bovine embryos, while post-MET embryos exhibited an increased expression. The simultaneous presence of *ZFP42* and Oct-4 transcripts in bovine embryos (Kurosaka *et al.*, 2004) suggests a role for *ZFP42* in the conservation of pluripotency observed in bovine embryonic cells. Two other genes from our library have also been identified as regulators of *OCT-4* and/or *NANOG* expression in embryonic stem cells: *TPT1* and the GA binding protein transcription factor alpha (*GABPA*) (Kinoshita *et al.*, 2007, Koziol *et al.*, 2007). Similar to our observations for *ZFP42*, the mRNA expression profile in bovine embryos of *TPT1* is parallel to that of *OCT-4* (Kurosaka *et al.*, 2004). Finally, another transcript isolated by our SSH, the kruppel-like factor 4 (*KLF4*), has been shown to act synergistically with *OCT-4* in the transcription of genes in embryonic stem cells (Nakatake *et al.*, 2006). Together these results illustrate the depth of our library with respect to regulators involved in cell pluripotency and provide useful information for further studies of reprogramming in early embryos. Recent studies in mice have shown that aberrant gene expression is detectable as early as the 2-cell stage in cloned embryos resulting from somatic cell nuclear transfer (SCNT), alluding to inadequate reprogramming of somatic cells during embryonic genome activation (Vassena *et al.*, 2007). The bovine embryo represents a good model to study the consequences of SCNT because of its higher success rate compared to mouse (Yang *et al.*, 2007b). Moreover, the longer time interval between nuclear transfer and genome activation permits a better cell reprogramming and a longer observation window. Therefore, the use of our library for microarray analysis represents a very powerful tool to study SCNT and to monitor cellular reprogramming in cloned embryos compared to normally developing ones.

4.7 CONCLUSION

Our cDNA library provides an exceptional profile of the transcriptome at MET in bovine embryos. More than 300 genes expressed in late 8-cell stage embryos cultured *in vitro* were isolated. A very high proportion of these genes have a demonstrated involvement in gene transcription or RNA processing. These findings are consistent with the high transcriptional activity presumed of MET embryos. Since many of these transcripts were shown to be expressed in the 6- and very early 8-cell stage embryos, it is possible that some of these factors may act as precursors to the major transcriptional burst which occurs in late 8- and 16-cell stages embryos. In addition, since many regulators of cell pluripotency were also isolated in our library, this novel tool may be invaluable in the monitoring of nuclear reprogramming in somatic cell nuclear transfer experiments. Furthermore, the nature and composition of our library presents a very powerful instrument for the study and development of new culture media for bovine embryos.

4.8 ACKNOWLEDGMENTS

We thank Isabelle Laflamme for her technical assistance in embryos production and Dr Isabelle Dufort for her assistance with microarray hybridizations. We also thank Dr Serge McGraw and Dr Andrea K. Lawrance for manuscript revision and correction Canadian Natural Sciences and Engineering Research Council and the Canada Research Chair for their financial support..

4.9 REFERENCES

- Ali A & Sirard MA 2002 Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 66 901-905.
- Baehrecke EH 2005 Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 505-510.
- Barnes FL & First NL 1991 Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 29 117-123.
- Ben-Shushan E, Thompson JR, Gudas LJ & Bergman Y 1998 Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol* 18 1866-1878.
- Blondin P & Sirard MA 1995 Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 41 54-62.
- Camous S, Heyman Y, Meziou W & Menezo Y 1984 Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J Reprod Fertil* 72 479-485.
- Camous S, Kopecny V & Flechon JE 1986 Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo. *Biol Cell* 58 195-200.
- Carson JH, Cui H, Krueger W, Schlepchenko B, Brumwell C & Barbarese E 2001 RNA trafficking in oligodendrocytes. *Results Probl Cell Differ* 34 69-81.
- Chevallier P, Chirat F & Sautiere P 1998 The amino acid sequence of the ram spermatidal protein 3--a transition protein TP3 or TP4? *Eur J Biochem* 258 460-464.
- Cui XS, Li XY, Shen XH, Bae YJ, Kang JJ & Kim NH 2007 Transcription profile in mouse four-cell, morula, and blastocyst: Genes implicated in compaction and blastocoel formation. *Mol Reprod Dev* 74 133-143.
- De Sousa PA, Watson AJ & Schultz RM 1998 Transient expression of a translation initiation factor is conservatively associated with embryonic gene activation in murine and bovine embryos. *Biol Reprod* 59 969-977.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED et al. 1996 Suppression subtractive hybridization: a

method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 6025-6030.

Du Z, Cong H & Yao Z 2001 Identification of putative downstream genes of Oct-4 by suppression-subtractive hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 282 701-706.

Ferraro E & Cecconi F 2007 Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 462 210-219.

Franze A, Archidiacono N, Rocchi M, Marino M & Grimaldi G 1991 Isolation and expression analysis of a human zinc finger gene (ZNF41) located on the short arm of the X chromosome. *Genomics* 9 728-736.

Frei RE, Schultz GA & Church RB 1989 Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J Reprod Fertil* 86 637-641.

Hamatani T, Carter MG, Sharov AA & Ko MS 2004 Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell* 6 117-131.

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.

Hough SR, Clements I, Welch PJ & Wiederholt KA 2006 Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of OCT4 and Nanog. *Stem Cells* 24 1467-1475.

Hyttel P, Viuff D, Avery B, Laurincik J & Greve T 1996 Transcription and cell cycle-dependent development of intranuclear bodies and granules in two-cell bovine embryos. *J Reprod Fertil* 108 263-270.

Hyttel P, Laurincik J, Viuff D, Fair T, Zakhartchenko V, Rosenkranz C, Avery B, Rath D, Niemann H, Thomsen PD et al. 2000 Activation of ribosomal RNA genes in preimplantation cattle and swine embryos. *Anim Reprod Sci* 60-61 49-60.

Johnson BV, Rathjen J & Rathjen PD 2006 Transcriptional control of pluripotency: decisions in early development. *Curr Opin Genet Dev* 16 447-454.

Kapadia F, Pryor A, Chang TH & Johnson LF 2006 Nuclear localization of poly(A)+ mRNA following siRNA reduction of expression of the mammalian RNA helicases UAP56 and URH49. *Gene* 384 37-44.

King WA, Niar A, Chartrain I, Betteridge KJ & Guay P 1988 Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos. *J Reprod Fertil* 82 87-95.

- Kinoshita K, Ura H, Akagi T, Usuda M, Koide H & Yokota T 2007 GABPalpha regulates Oct-3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 353 686-691.
- Kopecny V, Flechon JE, Camous S & Fulka J, Jr. 1989 Nucleologenesis and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. *Mol Reprod Dev* 1 79-90.
- Koziol MJ, Garrett N & Gurdon JB 2007 Tpt1 activates transcription of oct4 and nanog in transplanted somatic nuclei. *Curr Biol* 17 801-807.
- Kurosaka S, Eckardt S & McLaughlin KJ 2004 Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct4 transcript localization. *Biol Reprod* 71 1578-1582.
- kZhang JZ, Gao W, Yang HB, Zhang B, Zhu ZY & Xue YF 2006 Screening for genes essential for mouse embryonic stem cell self-renewal using a subtractive RNA interference library. *Stem Cells* 24 2661-2668.
- Landsberg MJ, Moran-Jones K & Smith R 2006 Molecular recognition of an RNA trafficking element by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2. *Biochemistry* 45 3943-3951.
- Laurincik J, Schmoll F, Mahabir E, Schneider H, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Prella K, Hendrixen PJ, Voss PL, Moeszlacher GG et al. 2003 Nucleolar proteins and ultrastructure in bovine in vivo developed, in vitro produced, and parthenogenetic cleavage-stage embryos. *Mol Reprod Dev* 65 73-85.
- Lavoie MC, Kelk D, Rumph N, Barnes F, Betteridge KJ & King WA 1997 Transcription and translation in bovine nuclear transfer embryos. *Biol Reprod* 57 204-213.
- Li XY, Cui XS & Kim NH 2006 Transcription profile during maternal to zygotic transition in the mouse embryo. *Reprod Fertil Dev* 18 635-645.
- Liu Z & Foote RH 1997 Effects of amino acids and alpha-amanitin on bovine embryo development in a simple protein-free medium. *Mol Reprod Dev* 46 278-285.
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA et al. 2007 Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9 625-635.
- McGraw S, Vigneault C, Tremblay K & Sirard MA 2006 Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. *Mol Reprod Dev* 73 692-699.
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR & Zhao M 2003 Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111 483-488.

Memili E, Dominko T & First NL 1998 Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 51 36-41.

Memili E & First NL 1998 Developmental changes in RNA polymerase II in bovine oocytes, early embryos, and effect of alpha-amanitin on embryo development. *Mol Reprod Dev* 51 381-389.

Misirlioglu M, Page GP, Sagirkaya H, Kaya A, Parrish JJ, First NL & Memili E 2006 Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 18905-18910.

Nakatake Y, Fukui N, Iwamatsu Y, Masui S, Takahashi K, Yagi R, Yagi K, Miyazaki J, Matoba R, Ko MS et al. 2006 Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 26 7772-7782.

Natale DR, Kidder GM, Westhusin ME & Watson AJ 2000 Assessment by differential display-RT-PCR of mRNA transcript transitions and alpha-amanitin sensitivity during bovine preattachment development. *Mol Reprod Dev* 55 152-163.

Pelton TA, Sharma S, Schulz TC, Rathjen J & Rathjen PD 2002 Transient pluripotent cell populations during primitive ectoderm formation: correlation of in vivo and in vitro pluripotent cell development. *J Cell Sci* 115 329-339.

Plante L, Plante C, Shepherd DL & King WA 1994 Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. *Mol Reprod Dev* 39 375-383.

Ponsuksili S, Tesfaye D, El-Halawany N, Schellander K & Wimmers K 2002 Stage-specific expressed sequence tags obtained during preimplantation bovine development by differential display RT-PCR and suppression subtractive hybridization. *Prenat Diagn* 22 1135-1142.

Rosow KL & Janknecht R 2003 Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300. *Oncogene* 22 151-156.

Rozen S & Skaletsky HJ 2000 Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386 (Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).

Sharov AA, Piao Y, Matoba R, Dudekula DB, Qian Y, VanBuren V, Falco G, Martin PR, Stagg CA, Bassey UC et al. 2003 Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos. *PLoS Biol* 1 E74.

Sharov AA, Dudekula DB & Ko MS 2005 A web-based tool for principal component and significance analysis of microarray data. *Bioinformatics* 21 2548-2549.

- Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y & Pei D 2006 Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem* 281 23319-23325.
- Subramaniam M, Hawse JR, Johnsen SA & Spelsberg TC 2007 Role of TIEG1 in biological processes and disease states. *J Cell Biochem* 102 539-548.
- Telford NA, Watson AJ & Schultz GA 1990 Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26 90-100.
- Tesfaye D, Ponsuksili S, Wimmers K, Gilles M & Schellander K 2003 Identification and quantification of differentially expressed transcripts in in vitro-produced bovine preimplantation stage embryos. *Mol Reprod Dev* 66 105-114.
- Vallee M, Gravel C, Palin MF, Reghenas H, Stothard P, Wishart DS & Sirard MA 2005 Identification of novel and known oocyte-specific genes using complementary DNA subtraction and microarray analysis in three different species. *Biol Reprod* 73 63-71.
- Vassena R, Han Z, Gao S, Baldwin DA, Schultz RM & Latham KE 2007 Tough beginnings: alterations in the transcriptome of cloned embryos during the first two cell cycles. *Dev Biol* 304 75-89.
- Venables JP, Elliott DJ, Makarova OV, Makarov EM, Cooke HJ & Eperon IC 2000 RBMY, a probable human spermatogenesis factor, and other hnRNP G proteins interact with Tra2beta and affect splicing. *Hum Mol Genet* 9 685-694.
- 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.
- Viuff D, Avery B, Greve T, King WA & Hyttel P 1996 Transcriptional activity in in vitro produced bovine two- and four-cell embryos. *Mol Reprod Dev* 43 171-179.
- Wang QT, Piotrowska K, Ciemerych MA, Milenkovic L, Scott MP, Davis RW & Zernicka-Goetz M 2004 A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Dev Cell* 6 133-144.
- Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP & Wakayama T 2007 Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet* 39 295-302.
- Zeng F, Baldwin DA & Schultz RM 2004 Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev Biol* 272 483-496.

4.10 TABLES

Table 4.1. Primers used for real-time RT-PCR validations

Gene	Primer sequence (5'-3')	Gene	Primer sequence (5'-3')
<i>CHUK</i>	Up - TGATGGAATCTCTGGAACAGCG	<i>KLF10</i>	Up - GGAAAGACACAGCGACAGTTTCAC
	Low - TGCTTACAGCCCAACAACCTTGC		Low - GGGAGAATGTGGAACAAGATAGGTAGA
<i>PRNP</i>	Up - AGCATGGCTGAGAGTTCTGATTCAC	<i>TKT</i>	Up - ACAAGCCAAGGTGGTCTGAAGAA
	Low - CCAGATGCACCTTACAATCTTCCAGGG		Low - TAGCACGGGCACGTCAAGAATGA
<i>SKPIA</i>	Up - GCAAGTTGCTTTATTTACAACGCC	<i>DDX39</i>	Up - GAACAGATTGGTGGCGACAAGGAT
	Low - GTGGGTTCCCTATAGAAAGTGGCA		Low - TCAAGGACAGTGAGAAGAACCACA
<i>HNRP-A2B1</i>	Up - GATGGAGTCCGAGATTGAGCAAGGTT	<i>DDX5</i>	Up - GCTGCAAATTACACCAATGGGAGC
	Low - TGCATGGTCCCTTATGATCTCACAGC		Low - TGAGAATATCCTGTTGGCATCGG
<i>BECN1</i>	Up - TGTGCCGAGTTGCCATTGTTCTCT	<i>DHX29</i>	Up - AGATAAGGCGTCCCGATGCTGAA
	Low - AGTCCAGGAAAGCCATCATAGCCTGA		Low - ACCAGGAGAAGATACGATATGCCC
<i>HNRPG</i>	Up - TTGACGGGCTCTTCCAATCACAGA	<i>TP3</i>	Up - TCCCAACGTATGAGGCGGAATCAA
	Low - TCTGCTGGGTCAGTGAATAATTTGCC		Low - CGATTGAGTTACTGGCTGCCCA
<i>EIF3A</i>	Up - TGATCTAAGGGACAGACGGGATGACA	<i>GAPDH</i>	Up - ATGCTGGTCTGAGTATGTAGTGG
	Low - TCTTGAAAGAGCTGCGGGAGGAA		Low - AGAAGCAGGGATGATATTCTGGGC
<i>ZFP42</i>	Up - GGCTGCCGCAAGAAGTTTATTTCAG	<i>TPT1</i>	Up - TGTCGTCATAACTGGCTGGCTACT
	Low - TGCTGTCTCTGTTTGTGATTACT		Low - GCCTCCGCTCCAAATAAATCAACG
<i>ZNF41</i>	Up - TGACCTCTGGTTTGGGAACTTGGT	<i>GFP</i>	Up - CCACAAGTTCAGCGTGTCC
	Low - CAAGAAGAGCAGCGTTGTGAGCAA		Low - GTGCTGCTTCATGTGGTGGG

Table 4.2. List of genes expressed *de novo* in bovine late 8-cell embryos produced *in vitro*

Fold Change	Official gene name and symbol	Accession Number
Transcription regulation		
25.99	Double homeobox A (DUXA)	XM_603012
23.62	Zinc finger protein 215 (ZNF215)	NM_001076882
20.04	Arginine-fifty homeobox (ARGFX)	XM_001252222
17.55	Kruppel-like factor 10 (KLF10)	AF050110
16.33	p300/CBP-associated factor (PCAF)	XM_613744
15.36	Similar to human zinc finger protein 42 homolog (ZFP42)	NM_174900
15.06	Similar to human zinc finger protein 41 (ZNF41)	NM_007130
12.71	Proline-rich nuclear receptor coactivator 1 (PNRC1)	NM_001034308
11.78	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein (ID2)	NM_001034231
8.20	CCR4 carbon catabolite repression 4-like (CCR4L)	NM_001082454
8.09	Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2)	XM_611661
7.21	Nucleolin, transcript variant 1 (NCL)	XM_614626
7.01	Methyl-CpG binding domain protein 3-like 2 (MDB3L2)	XM_596973
6.54	Activity-dependent neuroprotector homeobox (ADNP)	XM_613264
5.69	Activating transcription factor 7 interacting protein (ATF7IP)	NM_018179
5.59	Telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1 (TERF1)	NM_001076865
5.23	Kruppel-like factor 4 (KLF4)	XM_876350
4.98	Nuclear transcription factor Y alpha (NFYA)	BC116040
4.93	Zinc finger and BTB domain containing 10 (ZBTB10)	NM_023929
4.51	YY1 transcription factor (YY1)	NM_001098081
4.17	Matrin 3 (MATR3)	XM_001252396
4.04	Zinc finger, imprinted 3 (ZIM3)	BC114446
3.29	Activating transcription factor 1 (ATF1)	NM_001075289
3.21	Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 (TCEB2)	NM_001034800
3.20	Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (TCEB1)	NM_001046493
3.09	Suppressor of Ty 4 homolog 1 (SUPT4H1)	NM_001034792
3.02	Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3 (TCEB3)	NM_001075581
2.89	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 50kDa (TAF7L)	NM_001046028
2.89	Tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1)	BC104562
2.82	Zinc finger protein 281 (ZNF281)	NM_012482
2.69	Nuclear DNA-binding protein (C1D)	NM_001037448
2.67	Sin3A-associated protein, 18kDa (SAP18)	NM_001035467
2.56	Polymerase (RNA) I polypeptide D, 16kDa (POLR1D)	NM_001076144
2.55	Activating transcription factor 4 (ATF4)	NM_001034342
2.54	Transcription factor AP-2 gamma (TFAP2C)	NM_001075509
2.51	General transcription factor IIF, polypeptide 2, 30kDa (GTF2F2)	XM_001250530
2.50	GA binding protein transcription factor, alpha subunit (GABPA)	NM_001075437
2.38	Zinc finger protein 28 (ZNF28)	XM_001251441
RNA processing		
44.25	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (HNRPA2B1)	XM_580324
21.72	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G (HNRPG)	XM_876108
20.53	Splicing factor, arginine/serine-rich 3 (SFRS3)	NM_001034700
17.73	Syncrip protein (SYNCRIP)	XM_589161
17.11	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein AB (HNRPAB)	NM_001040522
16.78	Splicing factor 3B, subunit 1, 155kDa (SF3B1)	XM_865029
15.16	Splicing factor p54 (MGC139252), mRNA	NM_001075621

14.61	Splicing factor, arginine/serine-rich 10 (SFRS10)	NM_001034776
9.38	PHD finger protein 5A (PHF5A)	NM_001083382
8.41	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (HNRPH1)	XM_876757
7.80	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (HNRPA1)	XM_001251081
5.90	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5 (DDX5)	XM_613184
5.01	Small nuclear ribonucleoprotein D2 (SNRPD2)	NM_001034476
4.92	Cisplatin resistance-associated overexpressed protein (CROP)	NM_001034684
4.90	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked (DDX3X)	NM_001356
4.57	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (HNRPU)	NM_001076920
4.57	Zinc finger, RAN-binding domain containing 2 (ZRANB2)	NM_005455
4.51	Nucleolar protein family 6 (RNA-associated) (NOL6)	NM_022917
4.50	PAP associated domain containing 4 (PAPD4)	BT025394
4.39	Splicing factor 3B, 14 kDa subunit (SF3B14)	NM_001046017
4.28	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (HNRPDL)	NM_001083725
4.27	Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1 (PABPC1)	NM_174568
4.13	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (HNRPF)	NM_001014860
4.12	Pre-mRNA processing factor 8 (PRPF8)	XR_027872
4.05	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1 (SNRPB)	BC112634
3.91	Nucleolar protein family A, member 2 (NOLA2)	BC103161
3.70	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39 (DDX39)	NM_001034752
3.38	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21 (DDX21)	NM_004728
3.32	PI-3-kinase-related kinase SMG-1 (SMG1)	XM_603490
3.09	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 P130 (NOLC1)	NM_001075608
3.07	Breast carcinoma amplified sequence 2 (BCAS2)	BC102652
3.05	Zinc finger protein 638 (ZNF638)	XM_595843
3.02	Ribosome biogenesis protein NEP1 (EMG1)	NM_001046197
2.99	Splicing factor 3B, subunit 3, 130kDa (SF3B3)	NM_001077851
2.88	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2 (U2AF2)	NM_001075336
2.83	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18 (DDX18)	XM_597469
2.69	Nucleolar protein 5A (56kDa with KKE/D repeat) (NOL5A)	NM_001033622
2.64	Ras-GTPase-activating protein (SH3-domain) binding protein 1 (G3BP1)	NM_001037611
2.41	U2-associated SR140 protein (SR140)	XM_871967
2.22	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C (SNRPC)	NM_001076334
2.13	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 29 (DHX29)	XM_864360
2.09	Complement component 1, q subcomponent binding protein (C1QBP)	NM_001034527
Protein biosynthesis		
18.96	Ribosomal protein L26 (RPL26)	BC141993
17.18	Ribosomal protein S25 (RPS25)	BC102560
17.04	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A (EIF3A)	XM_879302
11.74	Ribosomal protein S29 (RPS29)	XM_001249580
10.64	Myotrophin (MTPN)	NM_145808
10.16	Ribosomal protein S27 (RPS27)	NM_001098135
10.09	Ribosomal protein S23 (RPS23)	NM_001034690
9.91	Ribosomal protein S3A (RPS3A)	BC102789
9.42	Basic leucine zipper and W2 domains 1 (BZW1)	XM_876130
8.31	Ribosomal protein L22 (RPL22)	BC102871
8.30	Ribosomal protein L10a (RPL10A)	BC102653
8.19	Pumilio homolog 1 (PUM1)	XM_001254484
8.05	Ribosomal protein L6 (RPL6)	BC133430
7.99	Ribosomal protein L7 (RPL7)	XR_027744
7.99	Eukaryotic translation initiation factor 5 (EIF5)	XM_864703
7.01	Ribosomal protein L17 (RPL17)	NM_001034459
5.96	Ribosomal protein L18 (RPL18)	NM_001015556
5.82	Ribosomal protein S13 (RPS13)	NM_001025342
5.06	Density-regulated protein (DENR)	XM_001252165
4.63	Ribosomal protein L24 (RPL24)	BC102108

4.58	Ribosomal protein S26-2	XM_001249789
4.19	Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 (EEF1B2)	NM_001014936
3.86	Ribosomal protein L37a (RPL37A)	NM_001035008
3.83	Ribosomal protein S27a (RPS27A)	BC102491
3.27	Ribosomal protein S19 (RPS19)	XM_602832
3.27	Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1 (EEF1E1)	NM_001040599
3.14	Ribosomal protein S10 (RPS10)	NM_001034716
3.13	Eukaryotic translation termination factor 1 (ETF1)	NM_001076254
3.11	Ribosomal protein L3 (RPL3)	BC102253
3.09	Ribosomal protein S18 (RPS18)	NM_001033614
3.01	S30 ribosomal/ubiquitin-like fusion protein (RPS30)	AF520959
2.90	Ribosomal protein S4 Y-linked 1 (RPS4Y1)	NM_001035445
2.64	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2 (EIF4G2)	XM_582600
2.19	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 gamma, 40kDa (EIF3H)	BC102096
2.18	Ribosomal protein L35 (RPL35)	XM_870798
2.16	Ribosomal protein L27 (RPL27)	NM_001034051
2.13	Ribosomal protein S12 (RPS12)	NM_001014387
DNA replication / Chromatin assembly		
36.76	H2A histone family, member Z (H2AFZ)	BC109743
11.18	Activator of S phase kinase (DBF4)	NM_001075476
5.71	SET translocation (myeloid leukemia-associated) (SET)	NM_003011
2.79	H3 histone, family 3B (H3F3B)	BT025472
2.32	H3 histone, family 3A (H3F3A)	NM_001014389
2.17	H2A histone family, member Y (H2AFY)	NM_001046340
2.07	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51)	NM_001046179
2.05	PAP-associated domain-containing 5 (PAPD5)	XM_001256515
2.01	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	NM_001034494
Nucleotide biosynthesis		
8.37	Phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase (PPAT)	NM_001102375
5.07	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase (GART)	NM_001040473
3.71	Nucleoside phosphorylase (NP)	BC103291
3.63	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1-like 1 (PRPS1L1)	BC142427
2.88	Phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase (PAICS)	BT030591
Protein degradation / Ubiquitin cycle		
26.28	S-phase kinase-associated protein 1A (p19A) (SKP1A)	NM_001034781
24.95	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2 (PSMA2)	NM_001034662
7.81	Fused toes homolog (FTS)	XM_879760
6.11	Ubiquitin 1 (UBQLN1)	XR_027839
3.72	Ubiquitin-like 5 (UBL5)	NM_001037710
3.10	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4 (PSME4)	XM_606554
2.62	SUMO1 activating enzyme subunit 2 (SAE2)	NM_001083381
2.49	F-box protein 33 (FBXO33)	XM_590774
2.45	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3 (PSMA3)	NM_001034235
2.11	F-box protein 27 (FBXO27)	XM_001256097
2.05	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 6 (PSMA6)	NM_001045962
Protein modification / transport		
12.96	Solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2 (SLC15A2)	NM_001079582
12.58	RAN binding protein 5 (RANBP5)	NM_002271
12.10	Glycophorin C (GYPC)	BC114794
8.46	FK506 binding protein 3, 25kDa (FKBP3)	BC109932
7.32	Kinesin family member 20A (KIF20A)	NM_001046288

6.17	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 7 (SPINK7)	NM_032566
6.17	Karyopherin alpha 4 (importin alpha 3) (KPNA4)	BC016754
5.66	Cathepsin C (CTSC)	NM_001033617
3.46	Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 3 (CLN3)	NM_001075174
3.40	Zinc metalloproteinase, STE24 homolog (ZMPSTE24)	XM_618298
3.29	Synaptotagmin-like 2 (SYTL2)	XM_865860
2.98	DC2 protein (DC2)	NM_001077092
2.94	Heat shock 70kDa protein 8 (HSPA8)	BT030487
2.84	Transmembrane emp24 domain trafficking protein 2 (TMED2)	NM_006815
Regulation of apoptosis		
36.56	Beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2-interacting protein) (BECN1)	XM_870616
4.97	Serum/glucocorticoid regulated kinase (SGK)	XM_864644
Cell cycle		
10.46	Retinoblastoma binding protein 6 (RBBP6)	XM_001254122
6.09	Cell division cycle and apoptosis regulator 1 (CCAR1)	NM_001076532
4.81	Centromere protein E (CENPE)	XR_027308
4.65	CDC-like kinase 1 (CLK1)	XM_875205
3.84	Retinoblastoma binding protein 8 (RBBP8)	XM_590590
2.41	Synaptonemal complex protein 3 (SYCP3)	NM_001040588
2.40	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast) (MAD2L1)	AB098952
2.17	Cullin 3 (CUL3)	XM_614056
Cytoskeleton activity		
15.02	Thymosin, beta 4, X-linked (TMSB4X)	BC133478
6.85	Tubulin alpha 1a (TUBA1A)	NM_006009
6.69	GABA(A) receptor-associated protein like 1 (GABARAPL1)	NM_001033616
3.90	CD2-associated protein (CD2ap)	XM_612512
Ion transporter activity		
14.47	High-affinity copper uptake protein 1 (CTR1)	XM_597183
10.66	MRS2-like, magnesium homeostasis factor (MRS2L)	NM_020662
4.48	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (TNFAIP1)	XM_588697
3.30	ATPase, H+ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G1 (ATP6V1G1)	BC110010
Mitochondrial activity		
20.04	Cytochrome c oxidase subunit VIIc (COX7C)	NM_175831
14.04	Cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (COX7A2)	NM_175807
9.56	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide (ATP5B)	BC116099
8.91	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase epsilon (AGPAT5)	NM_001075932
8.10	Cytochrome c oxidase subunit VIIb (COX7B)	BC103174
7.62	Single-stranded DNA binding protein 1 (SSBP1)	NM_001037466
7.10	Ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein (UQCRB)	NM_001034797
6.07	Cytochrome c, somatic (CYCS)	NM_001046061
4.64	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit (ATP5E)	XM_001250628
3.19	Acetyl-Coenzyme A synthetase 2 (AMP forming)-like (ACSS1)	BC114698
2.94	Leucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (LARS2)	NM_015340
2.79	Ornithine aminotransferase (OAT)	NM_001034240
2.49	Mitochondrial carrier protein MGC4399 (MGC139420),	NM_001076002
2.45	Threonyl-tRNA synthetase-like 1 (TARS2)	XM_866940
2.02	Mitochondrial ribosomal protein L1 (L1mt)	XM_581016
Other functions		

30.90	Prion protein (PRNP)	NM_181015
24.56	Transketolase (TKT)	BC141998
14.22	Williams Beuren syndrome chromosome region 22 (WBSCR22)	BT021557
13.79	Adhesion molecule with Ig-like domain 2 (AMIGO2)	XM_592100
13.22	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like (MTHFD1L)	NM_001076018
10.68	Phosphatidylinositol transfer protein beta (PITPNB)	XM_001251426
8.54	MAP3K12 binding inhibitory protein 1 (MBIP)	NM_001077518
6.01	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3 (SLC2A3)	NM_174603
5.56	Ornithine decarboxylase antizyme 1 (OAZ1)	NM_001025323
5.34	Adenosylmethionine decarboxylase 1 (AMD1)	NM_173990
3.99	Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1)	NM_004417
3.89	Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1 (NMNAT1)	NM_001075834
3.49	Zinc finger, DHHC-type containing 4 (ZDHHC4)	NM_001035292
3.35	Selenoprotein K (SELK)	NM_001037489
3.29	N-acetyltransferase 12 (NAT12)	XM_001252473
3.27	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10 (GNG10)	XM_864733
2.36	Glyoxalase 1 (GLO1)	NM_001083496
2.22	2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain containing 1 (OGFOD1)	NM_018233
2.08	Transforming growth factor beta-induced protein 68kDa (TGFB1)	XR_028016
2.03	Pseudouridylate synthase 7 homolog (PUS7)	NM_001076939

Unknown function

16.83	Bos taurus hypothetical LOC514954 (LOC514954)	XM_611557
15.52	Bos taurus hypothetical LOC513209	XM_865128
13.45	Bos taurus hypothetical protein LOC789882 (LOC789882),	XM_001256505
12.57	Bos taurus clone NG010008B10C11 mRNA	AY563893
12.11	AU234242 Bovine placenta cDNA Bos taurus cDNA clone Cln878 3'	AU234242
10.70	Bos taurus hypothetical protein LOC785019 (LOC785019),	XM_001253161
10.30	Bos taurus cDNA clone MGC:159662 IMAGE:8577196	BC142021
9.95	Bos taurus hypothetical LOC512635 (LOC512635)	XM_590182
9.23	Bos taurus cDNA clone BE04010B2H03 5'	CN436908
9.10	Bos taurus hypothetical protein LOC784730 (LOC784730),	XM_001252951
8.40	MARC 6BOV Bos taurus cDNA 3'	CB421642
7.79	Bos taurus cDNA clone IMAGE:7944277	BC134702
7.59	YTH domain family, member 2 (YTHDF2)	NM_016258
7.49	Bos taurus UPF0364 protein C6orf211 homolog	NM_001083499
7.28	Bos taurus F32D8.4 (MGC142550)	NM_001075395
7.20	Bos taurus Chromosome 10 open reading frame 119 (LOC514863)	XM_592775
6.80	Bos taurus hypothetical protein MGC127598 mRNA	NM_001076995
6.66	Bos taurus hypothetical protein MGC128614 mRNA	BC103275
6.65	Bos taurus hypothetical protein LOC787354 (LOC787354),	XM_001252985
6.64	Bos taurus family with sequence similarity 54, member A (FAM54A)	BT021886
6.39	Bos taurus clone NG010006B11A03 mRNA	AY563864
6.25	KECB24-228.g-T7 NVH bovine early embryo cDNA library 3'	DN845695
5.82	4112640 BARC 9BOV Bos taurus cDNA clone 9BOV41_N23 5'	CK980748
5.71	Bos taurus cDNA clone IMAGE:8068425	BC149689
5.62	Bos taurus hypothetical LOC508086 (LOC508086), mRNA	XM_584814
5.59	Bos taurus hypothetical protein LOC782230 (LOC782230),	XM_001250659
5.55	Bos taurus Zcwpw2 protein (ZCWPW2)	XM_867807
5.32	LB01742.CR_F20 GC_BGC-17 Bos taurus cDNA clone IMAGE:8565718 5'	EH177248
5.16	Soares normalized bovine placenta Bos taurus cDNA clone BP230015A20F2 5'	AW464287
5.13	1605214 MARC 11BOV Bos taurus cDNA 5'	DY464884
4.96	Bos taurus clone NG010008B10A02 mRNA	AY563835
4.92	Bos taurus hypothetical LOC517884 (LOC517884)	XM_596063
4.87	1183930 MARC 7BOV Bos taurus cDNA 5'	DN283709
4.86	Bos taurus TM2 domain containing 3 (TM2D3)	NM_001040518

4.76	Bos taurus hypothetical LOC512949 (LOC512949)	XM_611463
4.68	KECB20-124.g-T7 NVH bovine early embryo cDNA library KECB Bos taurus	DN844666
4.46	LB02111.CR_O11 GC_BGC-21 Bos taurus cDNA clone IMAGE:8299621	EE231858
4.29	Bos taurus hypothetical LOC512688	XM_590248
4.27	001016BEMN049415HT BEMN Bos taurus cDNA	DY059030
4.14	4112640 BARC 9BOV Bos taurus cDNA clone 9BOV41_N23 5'	CK980748
4.11	Bos taurus hypothetical protein HH114, mRNA (cDNA clone MGC:159660)	BC142022
4.05	1391780 MARC 7BOV Bos taurus cDNA 5'	DN542985
3.95	Bos taurus cDNA clone IMAGE:8068425	BC149689
3.84	Cancer susceptibility candidate 5 (CASC5)	XR_028586
3.81	Bos taurus Chromosome 14 open reading frame 24 (LOC509155)	XM_586057
3.77	Bos taurus Cyclin-dependent kinase 2-interacting protein (CINP)	XM_865098
3.74	UMC-bof_0B02-001-g10 Ovarian follicle recruited bof Bos taurus cDNA 3'	CV983857
3.61	1602013 MARC 11BOV Bos taurus cDNA 3'	DY463247
3.50	Bos taurus hypothetical protein MGC127980 (MGC127980),	XM_001255268
3.48	Bos taurus family with sequence similarity 60, member A (FAM60A)	NM_001076116
3.43	Bos taurus G patch domain containing 8 (GPATCH8)	XM_866439
3.42	Bos taurus similar to spermatidal transition protein 3 (TP3)	XM_001250599
3.33	Bos taurus Chromosome 2 open reading frame 49 (MGC142879)	NM_001081539
3.27	1270785 MARC 7BOV Bos taurus cDNA 5'	DN526058
3.25	Bos taurus hypothetical LOC510613 (LOC510613)	XM_587775
3.24	Enterocytin	XM_867016
3.21	1592130 MARC 11BOV Bos taurus cDNA 3'	DY460163
2.90	Bos taurus hypothetical protein LOC783493 (LOC783493),	XR_027927
2.85	Bos taurus preferentially expressed antigen of melanoma (LOC522065)	XM_600338
2.79	Bos taurus hypothetical LOC510651 (LOC510651), mRNA	XM_587818
2.76	UMC-bemiv_0B01-030-a02 Nuclear-transfer derived blastocysts D8 bemiv Bos taurus	DN984908
2.65	Bos taurus hypothetical protein FLJ38968 (FLJ38968), mRNA, complete	BT020677
2.64	000410BTYA005162HT BTYA Bos taurus cDNA	DY129580
2.63	Bos taurus hypothetical LOC534252	XM_865780
2.58	HW_liver_54_050811_G04 Bos taurus CF-24-HW liver cDNA library	DV782716
2.56	CES047512 Bovine PBL subtracted library Bos taurus cDNA clone CCL022307	EW740279
2.55	Bos taurus MST101 protein (LOC540114)	XM_591573
2.51	Bos taurus preferentially expressed antigen of melanoma (LOC789197)	XM_001256020
2.38	1455467 MARC 7BOV Bos taurus cDNA 3'	DT886366
2.34	965524 MARC 3BOV Bos taurus cDNA 3'	CK778364
2.24	Bos taurus hypothetical LOC508617 (MGC127874)	NM_001034325
2.14	4084205 BARC 9BOV Bos taurus cDNA clone 9BOV27_N06 5'	CK968794
2.13	Bos taurus cDNA clone MGC:159967 IMAGE:8473295	BC146073
2.09	CR552099 Bos taurus cDNA clone bcaz0007.o.16 5'	CR552099
2.08	4066818 BARC 10BOV Bos taurus cDNA clone 10BOV14_A19 3'	CK943169
2.02	LB02350.CR_M08 GC_BGC-23 Bos taurus cDNA clone IMAGE:8608882 5'	EW683991
2.00	Bos taurus hypothetical LOC613372 (LOC613372)	XM_864089

Novel transcript

16.42	-
15.84	-
15.23	-
13.44	-
11.58	-
10.90	-
9.44	-
5.99	-
5.91	-
4.77	-
4.77	-

4.54	-
3.96	-
3.90	-
3.79	-
3.34	-
3.06	-
3.02	-
2.54	-
2.52	-
2.22	-
2.13	-
2.09	-
2.05	-
2.05	-

4.11 FIGURES

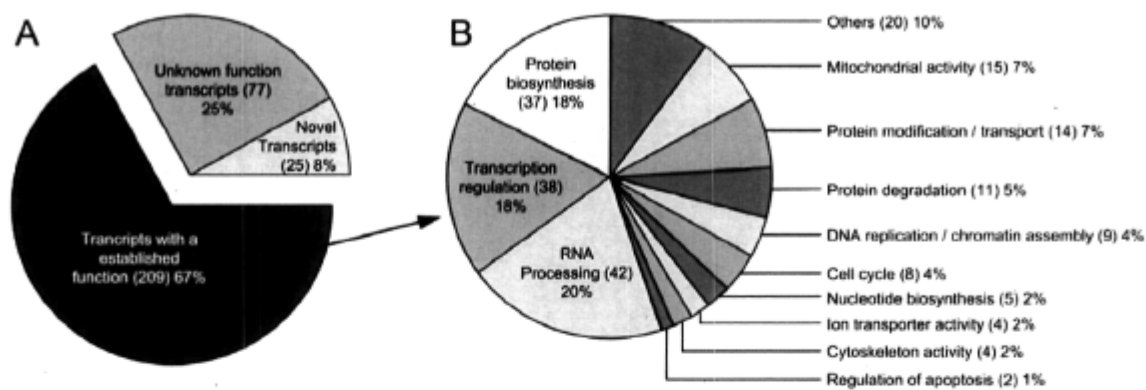


Figure 4.1. Schematic representation of the 311 unique cDNA clones obtained following SSH and microarray hybridization accordingly to their molecular function. The absolute numbers of clones are indicated between brackets.

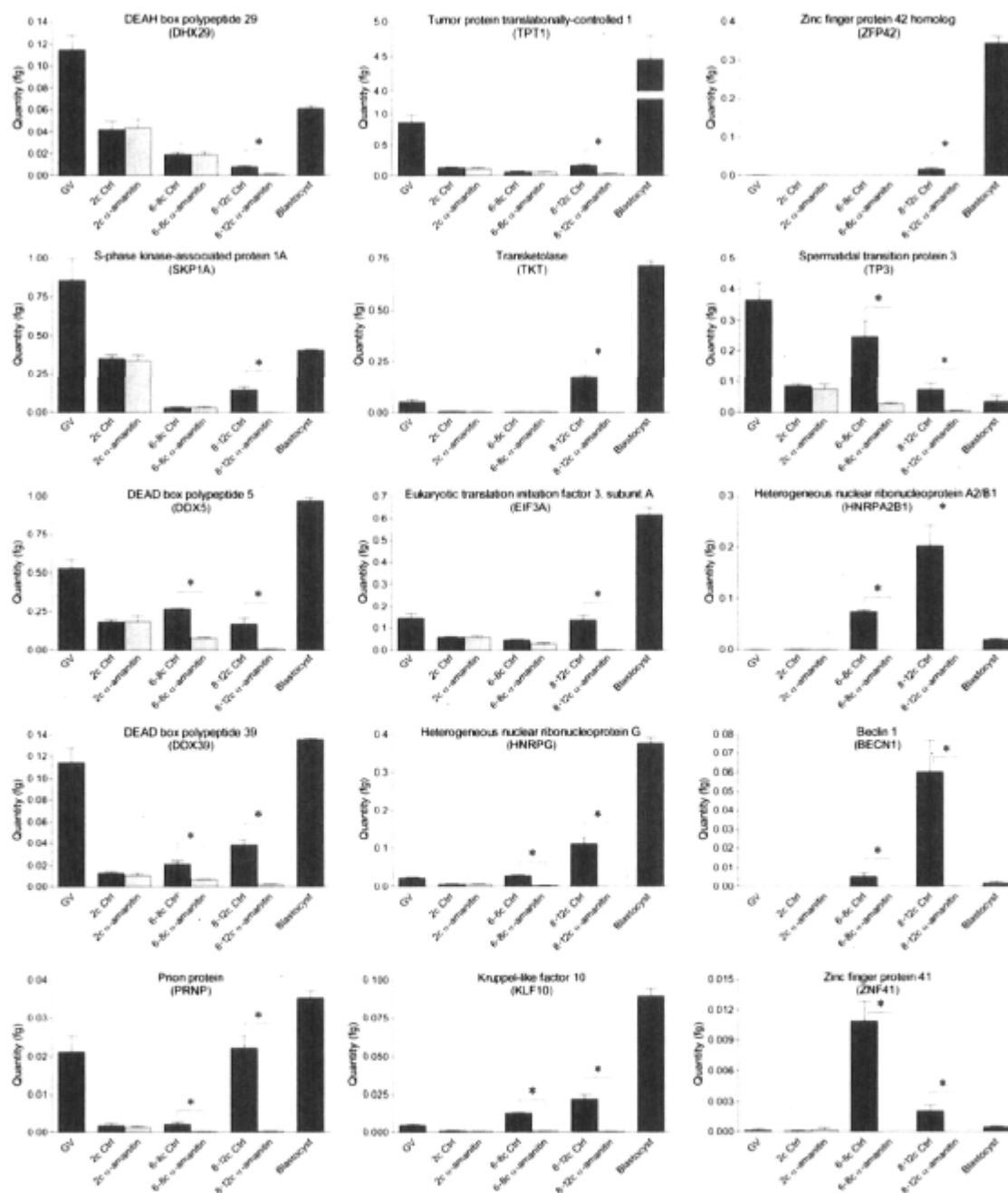


Figure 4.2. Quantification by real-time RT-PCR of the mRNA profile throughout bovine early development of 15 genes selected from our cDNA library. Stages are represented below histograms: GV = GV oocytes; 2c, 6-8c and 8-12c represent embryos collected 32, 55 and 90 hpf respectively. Dark histograms represent control embryos while light grey histograms correspond to α -amanitin treated embryos. Each developmental stage was done in triplicate and the amounts of mRNA shown represent the mean \pm SEM of each transcript corrected with the *GFP* value obtained for each pool. An asterisk (*) indicates a significant difference ($P < 0.05$).

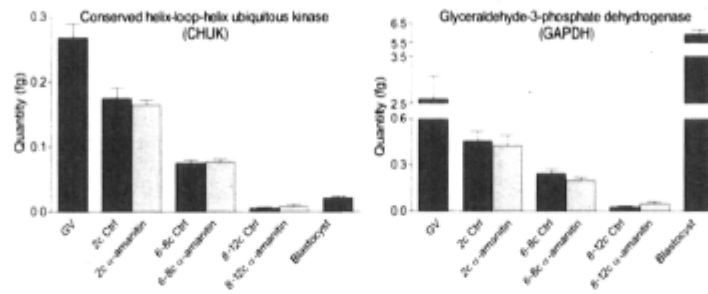


Figure 4.3. Quantification by real-time RT-PCR of housekeeping genes transcript levels throughout bovine early development. Stages are represented below histograms: GV=GV oocytes; 2c, 6-8c and 8-12c represent embryos collected at 32, 55 and 90 hpf respectively. Dark histograms represent control embryos while light grey histograms correspond to α -amanitin treated embryos. Each developmental stage was done in triplicate and the amounts of mRNA shown represent the mean \pm SEM of each transcript corrected with the *GFP* value obtained for each pool.

**CHAPITRE V : DÉGRADATION EFFICACE ET SPÉCIFIQUE
D'ARN_m MATERNELS PAR MICRO-INJECTION DE siRNA DANS
L'OVOCYTE BOVIN IMMATURE AVEC CELLULES DE CUMULUS**

**CHAPTER V : SPECIFIC AND EFFICIENT KNOCKDOWN OF
MATERNAL mRNA BY siRNA MICROINJECTION IN IMMATURE
BOVINE OOCYTES ENCLOSED IN THEIR CUMULUS CELLS**

**Christian Vigneault, Isabelle Gilbert, Serge McGraw, François Paradis
et Marc-André Sirard**

Le contenu de ce chapitre n'a pas encore été soumis pour publication

5.1 RÉSUMÉ

La découverte d'un nouveau mécanisme de défense anti-viral chez les plantes, utilisant les ARN interférentiels (RNAi), a provoqué un très grand enthousiasme pour le développement de nouveaux outils innovateurs facilitant l'étude de la fonction des gènes. La première application des RNAi pour inhiber l'expression d'un gène « knockdown » a été réalisée chez *C. elegans* et depuis, la technique a été utilisée avec succès chez les mammifères. Étant donné que la technique du « knockout » est difficilement applicable chez les espèces domestiques, les RNAi rendent désormais possible et beaucoup moins fastidieuse l'étude de la fonction des gènes chez les espèces comme le bovin. Ce chapitre démontre l'efficacité des RNAi pour le « knockdown » de gènes d'intérêts dans des ovocytes immatures bovins. Une caractéristique très intéressante de la méthode utilisée est la mise au point d'une technique de micro-injection de RNAi dans des ovocytes immatures non dénudés de leurs cellules de cumulus afin de limiter les effets néfastes non spécifiques attribuables à la procédure de micro-injection. Les résultats obtenus démontrent la très grande efficacité et spécificité des petits RNAi (siRNAs) pour induire la dégradation d'un ARNm visé. Aussi, la très grande vitesse d'action de ces siRNAs a été démontrée ce qui permet l'utilisation des siRNAs dans les ovocytes pour cibler la dégradation d'une grande variété de transcrits maternels avant leur traduction en protéines. Finalement, la possibilité d'effectuer deux « knockdown » simultanés induits par la co-injection de deux siRNAs ciblant deux transcrits différents est aussi illustrée. Les régulateurs de transcription *HMGNI* et *HMGN2* ont été utilisés pour valider notre procédure et pour évaluer l'efficacité des siRNAs dans le modèle embryonnaire bovin. Cependant, comme cela se produit dans plusieurs des cas de « knockout », même avec une dégradation substantielle des deux HMGNs, aucun phénotype marqué ne fut détecté tant au niveau de l'expression génique que de la compétence au développement. En conclusion, cette étude détaille les points importants à considérer pour la conception de siRNAs efficaces ainsi que la méthodologie complète à suivre pour permettre une micro-injection efficace de siRNAs sans induire d'effets collatéraux néfastes aux ovocytes et embryons.

5.2 ABSTRACT

Recently discovered as a viral defence mechanism in plants, RNA interference (RNAi) brought new hope to the development of innovative biological tools for studying gene function. The first gene knockdown using RNAi was performed in *C. elegans* and since that time, the technique has been successfully applied to mammals. The study of gene function in domestic animals remains limited due to the inability to perform knockout experiments; RNAi removes many of these limitations. This paper demonstrates the successful usage of RNAi for gene knockdown in bovine cumulus cell-enclosed immature oocytes. An innovative feature of this method is that the refined microinjection procedure is performed in immature oocytes surrounded by their cumulus cell layers and hence, allows RNAi knockdown very early in development without impairing subsequent development. Small interfering RNAs (siRNAs) were extremely effective at inducing mRNA degradation in bovine oocytes but this efficiency was shown to be dose-dependent and variable amongst different siRNAs. Additionally, rapid RNAi kinetics following siRNAs microinjection was demonstrated suggesting the possibility of siRNA microinjection in immature oocytes to knockdown maternal mRNAs before translation. Finally, simultaneous and specific RNAi knockdown of two targets by co-injection of two siRNAs was demonstrated. As a model, *HMGNI* and *HMGN2* were targeted and although we observed an efficient knockdown of both *HMGNI* and *HMGN2* mRNA and HMGN2 protein, no phenotypic differences were detected in the developing embryo in terms of gene expression through microarray analysis or in developmental competence. This paper includes a detailed protocol including siRNAs design guidelines and the siRNA microinjection procedure in cumulus-enclosed immature bovine oocytes. These results prove the feasibility and efficiency of gene specific knockdown by siRNA microinjection in cumulus-cell enclosed immature bovine oocytes. Finally, our findings demonstrate the opportunity of using siRNA microinjection to study the function of specific maternal mRNA in early embryogenesis in domestic species.

5.3 INTRODUCTION

An efficient way to study a gene's function is to disrupt its expression. While knockout models exist in the mouse, they have not been successfully applied to farm animals since it is a time-consuming and expensive process. Fortunately, the discovery of an endogenous viral defence mechanism in plants regulating post-transcriptional gene expression involving an RNA-based mechanism has brought new genetic tools for the study of gene function (Ratcliff *et al.*, 1997). The first laboratory application derived from this phenomenon is called RNA interference (RNAi) and was achieved by injecting double-stranded RNA (dsRNA) in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) to reduce the presence of endogenous mRNA (Fire *et al.*, 1998). Moreover, this study also showed that dsRNA was much more efficient than antisense RNA (asRNA) for mRNA disruption and degradation.

Nevertheless, the effectiveness of RNAi in mammals was uncertain since the presence of dsRNA in mammalian somatic cells results in an interferon response that activates the dsRNA specific Protein Kinase R (PKR) and RNaseL pathways and induces cell apoptosis (reviewed in Gil & Esteban, 2000). However, several groups have reported successful mRNA degradation by RNAi in mouse oocytes and embryos without activation of the PKR pathways (Svoboda *et al.*, 2000, Wianny & Zernicka-Goetz, 2000). These RNAi experiments were successful because oocytes and early embryos seem to lack interferon defence mechanisms (Stein *et al.*, 2003). These studies confirmed that the components implicated in the RNAi pathways have been conserved in mammals throughout evolution. It was also established that the RNAi process involves a complex called the RNA-induced silencing complex (RISC), which is activated by the presence of short dsRNA of approximately 25 nucleotides (Hammond *et al.*, 2000). These findings were corroborated by another study showing that dsRNAs are cleaved into 21 to 23 dsRNA nucleotides called small interfering RNAs (siRNAs) during the RNAi process (Zamore *et al.*, 2000). This report suggested that siRNAs could be used in a specific manner in the *in vitro* induction of RNA degradation. It was shown that these siRNAs efficiently degraded targeted mRNA in mammalian somatic cells cultured *in vitro*, and that they also did not activate the PKR pathways (Elbashir *et al.*, 2001). These findings have drastically increased

the number of studies using siRNA in mammals for gene expression knockdown. However, although RNAi procedures have become very important tools in gene function studies, their usefulness in domestic animal studies were not as evident (Cabot & Prather, 2003b, Anger *et al.*, 2004, Paradis *et al.*, 2005, Nganvongpanit *et al.*, 2006a, Nganvongpanit *et al.*, 2006, Favetta *et al.*, 2007, Park *et al.*, 2007, Tesfaye *et al.*, 2007).

By having refined and improved current methods of RNAi microinjection, this study reports that siRNAs can be extremely efficient and specific in cumulus-enclosed bovine immature oocytes. Successful microinjection in intact cumulus-oocytes complexes (COCs) is technically challenging but also essential, as the presence of cumulus cells during maturation is required for adequate oocyte maturation, fertilization and subsequent embryo development (Fukui & Sakuma, 1980, Yamazaki *et al.*, 2001, Luciano *et al.*, 2005). The design of siRNAs and the complete methodology for their microinjection in germinal vesicle (GV) oocytes enclosed in cumulus cells without impairing developmental competence are thus explored in the current study.

Two former members of the high mobility group N (*HMGN*) protein family, *HMGN1* and *HMGN2*, were knocked down by simultaneously microinjecting siRNAs against their respective transcripts in GV bovine oocytes. This demonstrates the possibility of simultaneous knockdown of the expression of more than one gene in the same embryo. *HMGNs* stimulate transcription by decompacting the chromatin and promoting its access to transcription factors (reviewed in West, 2004). The presence of large amounts of *HMGN1* and *HMGN2* maternal mRNA in GV oocytes suggested a possible role for these proteins in chromatin processing and the transcription activation in early bovine embryos (Vigneault *et al.*, 2004). This transcriptional activation also known as the maternal to embryonic transition (MET) occurs at the 8- to 16-cell stages in bovine embryos (Camous *et al.*, 1986, Frei *et al.*, 1989, King *et al.*, 1988, Kopečný *et al.*, 1989, Telford *et al.*, 1990). This phase is predominantly characterized by a sudden and strong activation of the embryonic genome in comparison to the pre-MET embryos, in which transcription is barely detectable and the embryo relies on the maternal mRNA stockpile for its development. This gene expression activation is crucial in bovine embryogenesis, since inhibition of transcription in the early

embryos with α -amanitin induces a developmental block at the 16-cell stage (Plante *et al.*, 1994, Liu & Foote, 1997, Memili & First, 1998). Thus, our hypothesis was that the elimination of *HMGNI* and *HMGN2* in bovine embryos would significantly impair gene expression in the late 8-cell embryo and consequently interrupt its development. Interestingly, in the *HMGNI* and *HMGN2* knockeddown embryos, neither the developmental competence nor gene expression were altered. This suggests that neither factors is essential for bovine early embryogenesis or that their actions are compensated by other proteins.

5.4 MATERIALS AND METHODS

All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, On, Canada) unless otherwise stated.

5.4.1 Oocyte recovery and embryo production

Oocytes were aspirated from healthy follicles of 3 to 6 mm in diameter from slaughterhouse ovaries. Only oocytes with a uniform cytoplasm and at least 5 layers of cumulus cells were conserved for microinjection and embryo production. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were washed in bovine follicular fluid (BFF) for selection and kept in BFF until microinjection or oocyte maturation. Oocyte maturation, fertilization and embryo development were performed as described in detail in Chapter 4 of this thesis with the exception of using 10 % fetal calf serum (Medicorp, Montreal, QC, Canada) instead of fatty acid free bovine serum albumin (FAF-BSA) in SOF medium during maturation and embryo culture. One-cell embryos were collected at 42 h for all real-time RT-PCR experiments except for the study of the kinetics of the RNAi process where oocytes were also collected at 0, 8, 16 and 24 h of maturation. For immunofluorescence experiments, GV oocytes were collected immediately after recovery from ovaries and MII oocytes were collected following the *in vitro* 24 h maturation. Embryos were collected at 30, 42, 90 and 105 h post-fertilization for two, four, late eight and 16-cell stage embryos respectively. Morulae

and blastocysts were collected at day 6 and 8 post-fertilization respectively. Assessment of blastocyst developmental rates was done at day 8 post-fertilization.

5.4.2 Design of siRNAs

siRNAs were designed accordingly to the design guidelines established in previous studies (Mittal, 2004, Ui-Tei *et al.*, 2004, Jagla *et al.*, 2005). Sequences were then compared with NCBI genbank sequences to ensure they do not showed any sequence homology to other genes than our targets.

5.4.3 *In vitro* synthesis of siRNAs

All siRNAs were produced with the Silencer siRNAs construction kit from Ambion (Ambion, Austin, Tx, USA) following the manufacturer's recommendations. Oligos used for template construction for T7 *in vitro* transcription are listed in Table 1. Purified double-stranded siRNAs were eluted in water and frozen as stock solutions at a concentration of 50 μ M at -80°C. The siRNAs were diluted in water to the desired concentration prior to use. Silencer negative control #4 siRNA, #cat AM4641 (Ambion), used as a non-targeting siRNA control was purified on columns supplied in the siRNA construction kit (Ambion) and eluted in water to remove any salts contained in the initial buffer. Concentration measurements were done on a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

5.4.4 Cumulus enclosed oocyte microinjection

Intact COCs of high developmental capacity characterized by at least 5 layers of cumulus cells and an oocyte with a relatively uniform and dark cytoplasm were used for siRNA microinjection. Microinjection was done under a Nikon Eclipse TE 300 microscope system (Nikon, Mississauga, ON, Canada) in Hepes buffered Tyrode's medium (TLH) droplets of 150 μ l under mineral oil. Groups of 30 oocytes were injected at the same time to reduce the exposure period of COCs to suboptimal culture conditions before maturation.

Microinjection pipettes were produced in-house with a P-87 Flaming/Brown micropipette puller (Sutter instrument, Novato, CA, USA) using the box filament FB255B (Sutter instrument) and thin wall borosilicate capillaries (#BF100-78-10) (Sutter instrument). The following program on the micropipette puller was used to produce very long and thin injection pipettes (outer diameter of ~ 1 to $2 \mu\text{m}$): Heat = 675, Pull = 30, Vel = 55, Time = 10 with pressure adjusted to 200. Microinjection pipettes were then bent at an angle of ~ 30 degrees with a microforge (Narishige, East Meadow, NY, USA). Microinjection pipettes were loaded with the siRNA solution by capillarity and the tip of the injection pipette was broken by hitting it with the holding pipette. The holding pipette used had an inner diameter of ~ 110 - $120 \mu\text{m}$. An illustration of our microinjection setup showing typical holding and microinjection pipettes used in our procedures is shown in Figure 5.1. Oocytes from the COCs were lightly held in the holding pipette by gentle aspiration and the COCs were brought to the bottom of the Petri dish to transiently displace the cumulus cells under the oocyte and to get a clearer view of the oocyte for the injection. Approximately 1 pL of siRNA solution was injected in each oocyte and successful injection was monitored by very discrete cytoplasm movement during the injection. Solution containing $20 \mu\text{M}$ of each siRNA was injected in oocytes in all experiments except for the first experiment where 5 and $10 \mu\text{M}$ solutions were also used and for the silencer negative control #4 siRNA where a $40 \mu\text{M}$ solution was used. In the cases where both *HMGNI* siRNA B and *HMGN2* siRNA C were injected simultaneously, a solution containing $20 \mu\text{M}$ of both siRNAs was used, giving a final siRNAs concentration of $40 \mu\text{M}$. Following microinjection, COCs were washed briefly in TLH medium and placed in maturation medium droplets for 24h maturation as described previously in this section.

5.4.5 RNA Extraction

All RNA extractions were done with the Picopure RNA isolation kit (Arcturus Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. RNA was eluted in $10 \mu\text{l}$ of elution buffer and frozen at -80°C until use. In all real-time RT-PCR quantification experiments, single oocytes or embryos were collected and used for mRNA extraction. Before RNA extraction for real-time RT-PCR, 1 pg of exogenous *GFP*

poly (A) RNA was added to each sample at the beginning of extraction as an exogenous control for RNA extraction and reverse transcription steps (Vigneault *et al.*, 2004, McGraw *et al.*, 2006a). For microarray analysis, three groups of ten late 8-cell embryos produced following each siRNA treatment were collected (non-injected, injected with 40 μ M negative control siRNA #4 solution or co-injected with 20 μ M *HMGNI* and 20 μ M *HMGN2* siRNAs solution).

5.4.6 Preparation of cDNAs and real-time RT-PCR

Messenger RNA from oocytes and embryos was reverse transcribed using oligo dT(18) primers (1 μ M) and random nanomers (5 μ M) and Sensiscript RT kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) following the manufacturer's recommendations with addition of 10 units of recombinant RNasin (Promega, Madison, WI, USA). The primers used for real-time RT-PCR are listed in Table 1 and were designed using Primer3 web interface (Rozen & Skaletsky, 2000). For each gene examined, a standard curve, consisting of PCR products purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and quantified with a Nanodrop was included. Real-time PCR was carried out using a LightCycler apparatus (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) and SYBR green incorporation. Each reaction contained the cDNA corresponding to 0.1 oocyte or embryo and a mixture containing 0.5 μ L of each primer (10 μ M), 1.6 μ L of 25 mM MgCl₂ (final concentration of 3 mM), 2 μ L of the SYBR green mix containing dNTPs, FastStart DNA polymerase enzyme and buffer (Roche). The PCR conditions used for all genes were as follows: denaturing cycle of 10 min at 95°C; 45 PCR cycles (denaturing: 95°C for 1 sec, annealing: 58°C for 5 sec, extension: 72°C for 10 sec); a melting cycle consisting of 95°C for 1 sec, 70°C for 30 sec and a step cycle starting at 70°C up to 95°C with a 0.2°C/sec transition rate; a final cooling cycle of 40°C for 30 sec. The cDNA quantification was performed using LightCycler Software Version 3.5 (Roche) with comparison to the standard curve. PCR specificity was confirmed by analysis of the melting curve and sequencing of PCR product.

5.4.7 Statistical analysis of the real-time PCR results

Measured levels of mRNA were normalized using *GFP* levels as external control as described previously (Vigneault *et al.*, 2004, McGraw *et al.*, 2006a). Histone H2a.1 (*H2A.1*) (Vigneault *et al.*, 2007) was also used for endogenous gene normalization in the experiment studying the efficiency and specificity of siRNA injection (Figure 5.5). Statistically significant differences in mRNA levels between developmental stages were calculated by ANOVA followed by a Newman-Keuls test. Replicates were included in the statistical model. Differences were considered statistically significant at the 95% confidence level ($P < 0.05$). Data are presented as mean \pm SEM.

5.4.8 Immunofluorescence

GV and MII stage oocytes, two-, four-, eight-, and sixteen-cell embryos, morulae and blastocysts, were attached onto poly-L-lysine coated coverslips. Fixation and incubations were done as described in Chapter III of this thesis. In brief, samples were fixed in 2% fresh paraformaldehyde solution for 30 min and permeabilized in 0.4% Triton X-100 for another 30 min. After being blocked 1 h in 3% non-fat dry milk and 5% goat serum in TBS-Tween 20, oocytes and embryos were incubated for 3h at room temperature with the HMGN2 antibody diluted 1:100 in blocking solution. HMGN2 antibody (#cat 10953-1-AP) was purchased from Proteintech (Proteintech PTGLAB, Chicago, IL, USA). Subsequent incubations were done as described in Chapter III of this thesis. The samples were incubated 45 min in secondary antibody solution containing Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1:1000 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) in a solution of TBS-Tween 20 containing 2% non-fat dry milk. DNA was stained with a 10 min incubation in propidium iodide (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in PBS. Negative controls were prepared without primary antibody and were used for background settings in confocal analysis on a TE-2000 confocal microscope (Nikon). Experiments were done in duplicate and at least 5 oocytes or embryos of each stage were observed.

5.4.9 Messenger RNA amplification

Amplified RNA (aRNA) probes produced from three pools of ten late 8-cell stage embryos of each treatment (non-injected, injected with both *HMGNI* and *HMGN2* siRNAs or negative control siRNA) were produced with the Riboamp HS RNA amplification kit (Arcturus Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). This kit allows production of approximately 50 ug of RNA from very small samples by two successive rounds of *in vitro* T7 RNA transcription. In the second round of transcription, amino allyl UTPs (Arcturus) were used instead of the regular UTPs to allow subsequent labelling of the aRNA.

5.4.10 Labelling of aRNA

2.5 µg of aRNA of each treatment was used for labelling. Because dye swap experiments were done, each treatment was labelled with both dyes in separate tubes. Probes were thus labelled with Alexa Fluor 555 and 647 reactive dye packs (Molecular Probes, subdivision of Invitrogen) accordingly to the manufacturer's protocol. Fluorescent probes were purified with Picopure RNA isolation kit (Arcturus) to removed uncoupled dyes. This resulted in 18 different probes; three biological replicates from each treatment were labelled with 555 dyes in one tube and 647 dyes in another tube.

5.4.11 Microarray hybridization and analysis

A loop design was used for the microarray hybridizations. Each treatment was hybridized with both of the other treatments on different cDNA slide (Ex: Non-injected (Dye 555) vs Neg Ctrl siRNA (Dye 647), (Non-injected (Dye 647) vs *HMGNI* & *N2* siRNAs (Dye 555) ...). Nine hybridizations were needed. Hybridizations and scanning of the cDNA slides were performed as described in Chapter IV of this thesis. Microarray data analysis was performed using the NIA Array Analysis software, a web-based tool accessible at this address: <http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/> (Sharov *et al.*, 2005).

5.5 RESULTS

5.5.1 Effect of siRNA concentration on knockdown efficiency

The first observations made were that knockdown efficiency in bovine oocytes was closely related to the amount of siRNA injected. As shown in Figure 5.2, the injection of the same siRNA reduced the amount of the targeted mRNA at different levels depending of the concentration of the siRNA injected. In the example displayed in Figure 5.2, the injection of a 20 μ M solution of *HMGNI* and *HMGN2* siRNA reduced the levels of the targeted mRNA with a greater efficiency than did 5 μ M (*HMGN2* siRNAs) and 10 μ M (*HMGNI* siRNAs) solutions of the same siRNA in unchanged microinjection conditions.

5.5.2 Significant differences of efficiency amongst different siRNAs

Another interesting finding from our experiments is that large differences in efficiency were observed among different siRNAs used against the same mRNA target. Although all suggested recommendations for the design of siRNA (Mittal, 2004, Ui-Tei *et al.*, 2004, Jagla *et al.*, 2005,) could not be precisely followed for each siRNA, we designed 4 different siRNAs for each gene; *HMGNI* and *HMGN2*. Following their microinjection in GV oocytes, zygote stage embryos were collected and monitored by quantitative RT-PCR for reduction of *HMGNI* transcript levels. Significant variations in efficiency between each siRNA were observed. Figure 5.3 shows an example of remaining targeted mRNA 42 h post-microinjection of siRNAs designed against *HMGNI*. While only 45 % degradation was observed with the siRNA A, siRNA B showed almost total degradation of *HMGNI* mRNA with only 1% of the initial mRNA level remaining. The siRNAs C and D showed an intermediary knockdown efficiency of 89 % and 83 %, respectively. Following these preliminary experiments, the most efficient siRNAs targeting the *HMGNI* (siRNA B, 99 %) and *HMGN2* (siRNA C, 99 %) transcripts were used in subsequent experiments.

5.5.3 Kinetics of the RNAi process in bovine oocytes

The kinetics of the RNAi process in the bovine oocytes was also examined, i.e., the time necessary to process the siRNAs and to break the targeted mRNA. A siRNA that resulted in a knockdown efficiency of around 90 % at the zygotic stage of the *MATRIN 3* gene transcript was used for this experiment. As demonstrated in Figure 5.4, the level of mRNA coding for *MATRIN 3* is maintained in non-injected maturing oocytes (0, 8, 16 and 24 h) and 1-cell embryos (42 h). The knockdown of the targeted transcript was investigated every 8 h during oocyte maturation. Our findings showed that maximal degradation of the targeted mRNA was achieved as early as 8 h post-injection (Figure 5.4).

5.5.4 Co-injection efficiency and specificity of siRNAs

After demonstrating successful mRNA knockdown in the first microinjection experiments, the possibility of co-injecting two different siRNAs targeting two different targets simultaneously in the same oocyte was investigated. The most efficient siRNAs against *HMGNI* siRNA B and *HMGN2* siRNA C, that showed a degradation efficiency of 99 % (Figures 5.2 and 5.3), were selected for this experiment and both siRNAs were injected at a concentration of 20 μ M each, which resulted in a final siRNAs concentration of 40 μ M. When both siRNAs were co-injected, both targets were efficiently knocked-down (99 % and 97 % for *HMGNI* and *HMGN2*, respectively) (Figure 5.5).

To confirm that *HMGNI* and *HMGN2* mediated knockdown was specific, a non-targeting siRNA (negative control #4 siRNA, Ambion) showing no significant homology to any bovine transcripts was microinjected in GV oocytes at a concentration of 40 μ M. The injection of the negative control siRNA had no effect on *HMGNI* and *HMGN2* mRNA transcript levels (Figure 5.5). Furthermore, preliminary experiments showed that microinjection of the siRNA directed against *HMGN2* had no effect on the levels of *HMGNI* mRNA, which shows a ~60 % homology with the coding sequence of the *HMGN2* transcript (data not shown). Finally, the injection of *HMGNI* and *HMGN2* siRNAs had no

significant influence on the transcript levels of two housekeeping genes; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and β -*ACTIN* (Figure 5.5).

5.5.5 Localisation of HMGN2 proteins throughout embryogenesis and consequences of its knockdown on its protein expression.

Immunofluorescence was used to examine the localisation pattern of the HMGN2 proteins in bovine oocytes and early embryos. In the control embryos produced from non-injected GV oocytes, HMGN2 was localized exclusively to the nucleus in all stages observed except in the MII oocytes where DNA is condensed and HMGN2 was undetectable (Figure 5.6A). A HMGN2 signal comparable to the non-injected embryos was detected in the nucleus of the 8-cell embryos injected with the negative control siRNAs (Figure 5.6B). Finally, in the 8-cell embryos produced from GV oocytes co-injected with both siRNAs against *HMGN1* and *HMGN2*, a barely detectable or absent signal (depending of the embryos) was detected (Figure 5.6C). HMGN1 protein localization was not investigated because of the lack of a suitable HMGN1 antibody.

5.5.6 Oocyte and embryo mortality following siRNA microinjection

GV oocytes are very sensitive to the volume of siRNA or water introduced during the microinjection procedures. Injection of excessive volumes would rapidly result in very high rate of oocyte death. Only ~1 pL of siRNA solution was injected per oocyte in this study. A very thin and long pipette was also designed to reduce the damage to the oocyte membrane and resulted in a lower mortality rate. However, even with these precautions, the mortality rate was 18 ± 5 % following microinjection (n=1177). The dead zygotes were distinguished by a light or shrunken cytoplasm when denuded of their cumulus cells following fertilization and thus, only zygotes that survived the manipulations were conserved for subsequent experiments. When embryos that survived microinjection of negative control siRNA were cultured to the blastocyst stage (n=247), no significant difference in blastocyst development was observed in comparison to the non-injected controls (n=293) (Figure 5.7A). Control experiments where water was injected instead of

siRNA in GV oocytes also produced survival and developmental rates comparable to those obtained with the injection of negative control siRNA (data not shown). Finally, embryo developmental rates were not different following microinjection of both siRNAs against *HMGNI* and *HMGN2* (n=103) (Figure 5.7A). Examples of culture droplets at day 8 post fertilization for the different treatments carried out in this study are shown in Figure 5.7B.

5.5.7 Gene expression at MET following *HMGNI* and *HMGN2* siRNAs microinjection

Microarray hybridizations were used to investigate the possible negative effects of *HMGNI* and *HMGN2* knockdown on gene expression at MET in bovine embryos. The cDNA slides (BlueChip V1.3) consisted of oocyte- and blastocyst-specific transcripts (Sirard *et al.*, 2005) as well as more than 300 transcripts specifically expressed at MET in bovine late 8-cell embryos (Chapter IV of this thesis). Three pools of 10 late 8-cell embryos produced from each of the different treatments (i.e.: non-injected, injected with negative control siRNA or co-injected with *HMGNI* & *HMGN2* siRNAs) were collected for microarray experiments. Microarray data analysis done with the NIA array analysis tool showed no mRNA expression differences following microinjection of both siRNA solutions: Neg Ctrl siRNA and *HMGNI* & *N2* siRNAs.

5.6 DISCUSSION

This paper demonstrates the feasibility and the efficiency of gene expression knockdown in bovine oocytes and early embryos by siRNAs microinjection in cumulus cell-enclosed immature GV oocytes. Our lab was the first to use RNAi to knockdown gene expression in bovine oocytes (Paradis *et al.*, 2005), however, microinjection was performed in denuded oocytes, which is not optimal for proper maturation and development in a healthy embryo (Fukui & Sakuma, 1980, Luciano *et al.*, 2005). Therefore, the main challenge of this study was to find a reliable and efficient method to microinject siRNA

solutions into cumulus cell-enclosed immature bovine oocytes without compromising the COC integrity and impairing embryonic development.

It was evident from this study that high variations in knockdown efficiency exist between different siRNAs, which is supported by previous studies (Kumar *et al.*, 2003). However, the selected siRNAs used in the present study produced an almost complete knockdown of the targeted mRNA. In addition, it was noted that the amount of siRNA injected into the oocyte had a great influence on the knockdown efficiency, which was recently shown in bovine oocytes (Favetta *et al.*, 2007). It is thus important to test different siRNAs to establish the ideal conditions for optimal inhibition of gene expression. However, since very high siRNA concentrations can become toxic, injection of non-specific siRNAs should be used as a control.

Successful delivery of gene knockdown material has been achieved in the mouse embryo by transfection of morpholinos (Siddall *et al.*, 2002) and electroporation of dsRNA (Grabarek *et al.*, 2002). However, these techniques are not possible with GV oocytes enclosed in intact cumulus cell layers. Moreover, the microinjection technique allows better control of the siRNA molecules injected into each oocyte. GV oocytes are very sensitive to microinjection procedures and cytochalasin B, a microfilament disrupting agent, has been used to increase the survival rate of injected oocytes (Tesarik *et al.*, 2003, Paradis *et al.*, 2005). However, it has been shown that microfilaments are involved in mRNA storage by binding messenger ribonucleoprotein complexes (mRNPs) (Ruzanov *et al.*, 1999). Because mammalian GV oocytes contain large amounts of stored maternal mRNA and masking proteins like *MSY2* which is associated with the cytoskeleton (CHAPTER III, (Yu *et al.*, 2001)), we believe that cytoskeleton disruption with cytochalasin B or similar agents could induce premature release of some maternal stored mRNA and provoke undesired negative effects caused by early translation or degradation of these mRNAs. By improving our microinjection conditions, we avoid the use of cytoskeleton disrupting agents with excellent survival rates. A critical issue that had to be overcome was to minimize the damage to the oocyte membrane during the microinjection procedures. While many researchers tend to use commercial pipettes designed for intra-cytoplasmic sperm injection

(ICSI), in our hands these pipettes caused a lot of damage and provoked very high mortality rates, likely due to their large diameter. In the present study, pipettes were designed with a small outer diameter (~1 to 2 μm) with a bend in the microinjection pipette in an elbow shape of about 30 degrees to allow for a perpendicular penetration of the oocyte membrane and significant reduction of oocyte damage. Also, a holding pipette was created with a very large diameter to stably hold the cumulus cell-enclosed oocyte and decrease membrane damage by minimizing movement. One of the major problems with cumulus cell layers is that the micropipette tip becomes clogged. Instead of having to change tips, our pipettes were designed with elongated tips that can simply be broken against the holding pipette once clogged with cumulus cells without altering the diameter of the pipette nor the tip itself. Lastly, a high rate of embryo survival was achieved by injecting the smallest volume possible while maintaining efficient knockdown of the target mRNA. We and others observed that microinjection of large volumes resulted in very high mortality rates due to oocyte lysis (Favetta *et al.*, 2007). Because RNAi efficiency in oocytes is seriously influenced by the dose injected, the injection of a smaller volume from a highly concentrated solution is recommended versus increasing the amount of siRNAs delivered by injecting more solution.

The injection of siRNAs in cumulus-enclosed GV oocytes, even if it offers some challenges, has a major advantage compared to injecting denuded zygotes. While some maternal mRNAs are translated in the first hours of oocyte maturation, many other transcripts are translated later in maturation or in the first embryonic stages (Coenen *et al.*, 2004, Massicotte *et al.*, 2006). These later transcripts are very good candidates for siRNA knockdown to study their role in bovine oocyte maturation or early embryo development. This study showed that complete RNAi degradation of a targeted mRNA is achieved 8 h following microinjection. This indicates that siRNA injection in GV oocytes can be used to knockdown the maternal mRNA stores of several genes before their translation into proteins. On the other hand, GV oocytes contain large stores of maternal proteins, which may interfere with siRNAs studies as they could be present and functional despite knockdown of maternal mRNA. However, typical protein half-life in mouse early embryos is below 18 h (Merz *et al.*, 1981). Accordingly, it could be expected that in many cases, the

maternal protein could be degraded soon in embryogenesis and if its related maternal mRNA is degraded by siRNA knockdown, the expected phenotype caused by the loss of function of the targeted gene should be observed.

Our results clearly demonstrated the high specificity of siRNA action in bovine oocytes and embryos. First, injection of negative control siRNA or *HMGNI* and *HMGN2* siRNAs had no effect on housekeeping gene mRNA expression measured 42 h post-injection. Microarray analysis also showed that siRNA microinjection did not alter expression levels of the large population of maternal genes represented on the DNA chip. Although long dsRNA does not induce interferon pathways in mouse oocytes and off-target mRNA degradation (Stein *et al.*, 2005), it is possible that long dsRNA could provoke non-specific mRNA degradation. The DICER complex, enclosing a ribonuclease in the RNase III family, digests dsRNA into many siRNAs molecules 21-23 nt in length (Ketting *et al.*, 2001), and some of these siRNAs could be homologous to a non-targeted gene. Another advantage of siRNAs over long dsRNA is the higher concentration of functional molecules per μg of RNA. There are more efficient targeting molecules than in the same amount of long dsRNA, in which only a portion of DICER-produced siRNAs will generate an efficient interference.

By following the specific guidelines recently established to improve the RNA interference mediated by siRNAs (Mittal, 2004, Ui-Tei *et al.*, 2004, Jagla *et al.*, 2005), we obtained very effective siRNAs. Since it is difficult to adhere to all of the specifications required to produce the perfect siRNA, it is recommended to follow as much as possible these general guidelines: (1) U/A at the position 1 of the antisense strand (AS), i.e. the strand complementary to the mRNA sequence of the target; (2) G/C at position 19 of the AS; (3) 30 to 52% G + C content; (4) High A/U concentration at the 5' end of the AS. Other features improving siRNAs efficiency like C, A and U at positions 7, 10 and 17 respectively of the AS can be added whenever the mRNA sequence allows it. Nevertheless, it is extremely difficult to regroup all these characteristics, especially when the mRNA coding sequence is very short as it was in our case for the *HMGNI* and *HMGN2* mRNA. In this situation, one major aspect of the RNAi process must be taken in account to obtain

successful results: the RISC incorporates preferentially the strand of the siRNA duplex with the lower 5' stability (Khvorova *et al.*, 2003, Schwarz *et al.*, 2003). In order to attain an efficient knockdown, the AS needs to be incorporated into RISC, thus its complementarity to the mRNA will provoke the digestion of the targeted mRNA by the RISC (Filipowicz, 2005). Accordingly, an AS with an A/U rich 5' end as well as a G/C rich 3' end is probably the most important rule to follow during the siRNA design that will guarantee that most of the molecules incorporated into RISC will target the mRNA. Lastly, although efficient gene expression knockdown by siRNAs by targeting untranslated regions (UTRs) is possible (McManus *et al.*, 2002), it is difficult in oocytes and embryos where UTRs can vary considerably in length and composition (Tremblay *et al.*, 2005). However, targeting UTRs could be useful to study the function of a specific splicing variant.

Interestingly, our results showed that multiple gene targets could be simultaneously knocked-down using more than one siRNA. This approach is useful for the study of genes with overlapping functions. Since the *HMGN1* and *HMGN2* genes are involved in chromatin remodelling and transcription stimulation (reviewed in West, 2004), we hypothesized that the knockdown of these two proteins would impair the activation of transcription in 8-cell embryos at MET. However, the simultaneous knockdown of *HMGN1* and *HMGN2* did not cause any developmental defects at a molecular level. Our principal hypothesis for the lack of an observable molecular phenotype following simultaneous *HMGN1/2* knockdown is the possibility of compensation by *HMGN3*, a new member of the *HMGN* family present in mouse embryos (West *et al.*, 2001). It would not be the first event of redundancy in the *HMGN* family as the amount of HMGN2 proteins bound to promoters of genes normally regulated by *HMGN1*, increases in *HMGN1*^{-/-} cells (Furusawa *et al.*, 2006). Another newly discovered *HMGN* member, *HMGN4*, which is an expressed retroposed intronless copy of the *HMGN2* gene, could have *HMGN2* redundant action and compensate for the absence of *HMGN2* (Birger *et al.*, 2001). Although *HMGN2* and *HMGN4* have very similar sequences, our siRNA used against *HMGN2* had three mismatches with the bovine *HMGN4* mRNA sequence which would be enough to impair its degradation. Future knockdown of all four *HMGN* mRNA would be needed to determine whether *HMGN3* and *HMGN4* could compensate for *HMGN1* and *HMGN2*.

However, several retroposed copies of *HMGN* were found in the human genomes, hence other unknown members of this family involved in reduction of chromatin compactness may still exist. Thus, it could be difficult to totally knockdown the *HMGN* proteins activity (Strichman-Almashanu *et al.*, 2003). Knockdown of *HMGN1* and *HMGN2* in mouse by asRNA microinjection in zygotes slightly delayed transcription at MET and transiently slowed development (Mohamed *et al.*, 2001). However, because of the heterogeneity in terms of developmental timing among bovine embryos, it is impossible to exclude a similar delayed development or transcriptional activation in our knockdown embryos.

5.7 CONCLUSION

By improving current methods of RNAi microinjection, a significant reduction of targeted maternal mRNA transcripts in bovine immature oocytes was obtained. This innovative procedure was performed in cumulus cell-enclosed oocytes, which allows the oocyte to mature properly and produce a healthy embryo. RNAi is an advantageous alternative for gene studies in domestic animals where knockout is impractical. In conclusion, our methodology allows for the study of maternal gene function and their roles in fertilization, early embryo development or genome activation.

5.8 ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to sincerely thank Isabelle Laflamme for her helpful assistance with embryo production and Dr Susan Novak for manuscript corrections and the Canadian Natural Sciences and Engineering Research Council, the Fonds Quebecois de Recherche sur la Nature et les technologies and the Canada Research Chair for their financial support.

5.9 REFERENCES

Anger M, Klima J, Kubelka M, Prochazka R, Motlik J & Schultz RM 2004 Timing of Plk1 and MPF activation during porcine oocyte maturation. *Mol Reprod Dev* 69 11-16.

Birger Y, Ito Y, West KL, Landsman D & Bustin M 2001 HMGN4, a newly discovered nucleosome-binding protein encoded by an intronless gene. *DNA Cell Biol* 20 257-264.

Cabot RA & Prather RS 2003 Cleavage stage porcine embryos may have differing developmental requirements for karyopherins alpha2 and alpha3. *Mol Reprod Dev* 64 292-301.

Camous S, Kopecny V & Flechon JE 1986 Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo. *Biol Cell* 58 195-200.

Coenen K, Massicotte L & Sirard MA 2004 Study of newly synthesized proteins during bovine oocyte maturation in vitro using image analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Mol Reprod Dev* 67 313-322.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K & Tuschl T 2001 Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 494-498.

Favetta LA, Madan P, Mastromonaco GF, St John EJ, King WA & Betts DH 2007 The oxidative stress adaptor p66shc is required for permanent embryo arrest in vitro. *BMC Dev Biol* 7 132.

Filipowicz W 2005 RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* 122 17-20.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE & Mello CC 1998 Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 806-811.

Frei RE, Schultz GA & Church RB 1989 Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J Reprod Fertil* 86 637-641.

Fukui Y & Sakuma Y 1980 Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol Reprod* 22 669-673.

Furusawa T, Lim JH, Catez F, Birger Y, Mackem S & Bustin M 2006 Down-regulation of nucleosomal binding protein HMGN1 expression during embryogenesis modulates Sox9 expression in chondrocytes. *Mol Cell Biol* 26 592-604.

- Gil J & Esteban M 2000 Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* 5 107-114.
- Grabarek JB, Plusa B, Glover DM & Zernicka-Goetz M 2002 Efficient delivery of dsRNA into zona-enclosed mouse oocytes and preimplantation embryos by electroporation. *Genesis* 32 269-276.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D & Hannon GJ 2000 An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404 293-296.
- Jagla B, Aulner N, Kelly PD, Song D, Volchuk A, Zatorski A, Shum D, Mayer T, De Angelis DA, Ouerfelli O et al. 2005 Sequence characteristics of functional siRNAs. *Rna* 11 864-872.
- Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ & Plasterk RH 2001 Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15 2654-2659.
- Khvorova A, Reynolds A & Jayasena SD 2003 Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115 209-216.
- King WA, Niar A, Chartrain I, Betteridge KJ & Guay P 1988 Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos. *J Reprod Fertil* 82 87-95.
- Kopecny V, Flechon JE, Camous S & Fulka J, Jr. 1989 Nucleologenesi and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. *Mol Reprod Dev* 1 79-90.
- Kumar R, Conklin DS & Mittal V 2003 High-throughput selection of effective RNAi probes for gene silencing. *Genome Res* 13 2333-2340.
- Liu Z & Foote RH 1997 Effects of amino acids and alpha-amanitin on bovine embryo development in a simple protein-free medium. *Mol Reprod Dev* 46 278-285.
- Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A & Modena S 2005 Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. *Mol Reprod Dev* 71 389-397.
- Massicotte L, Coenen K, Mourot M & Sirard MA 2006 Maternal housekeeping proteins translated during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Proteomics* 6 3811-3820.
- McGraw S, Vigneault C, Tremblay K & Sirard MA 2006 Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. *Mol Reprod Dev* 73 692-699.

- McManus MT, Haines BB, Dillon CP, Whitehurst CE, van Parijs L, Chen J & Sharp PA 2002 Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. *J Immunol* 169 5754-5760.
- Memili E & First NL 1998 Developmental changes in RNA polymerase II in bovine oocytes, early embryos, and effect of alpha-amanitin on embryo development. *Mol Reprod Dev* 51 381-389.
- Merz EA, Brinster RL, Brunner S & Chen HY 1981 Protein degradation during preimplantation development of the mouse. *J Reprod Fertil* 61 415-418.
- Mittal V 2004 Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet* 5 355-365.
- Mohamed OA, Bustin M & Clarke HJ 2001 High-mobility group proteins 14 and 17 maintain the timing of early embryonic development in the mouse. *Dev Biol* 229 237-249.
- Nganvongpanit K, Muller H, Rings F, Gilles M, Jennen D, Holker M, Tholen E, Schellander K & Tesfaye D 2006a Targeted suppression of E-cadherin gene expression in bovine preimplantation embryo by RNA interference technology using double-stranded RNA. *Mol Reprod Dev* 73 153-163.
- Nganvongpanit K, Muller H, Rings F, Hoelker M, Jennen D, Tholen E, Havlicek V, Besenfelder U, Schellander K & Tesfaye D 2006b Selective degradation of maternal and embryonic transcripts in in vitro produced bovine oocytes and embryos using sequence specific double-stranded RNA. *Reproduction* 131 861-874.
- Paradis F, Vigneault C, Robert C & Sirard MA 2005 RNA interference as a tool to study gene function in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 70 111-121.
- Park SY, Kim EY, Jeon K, Cui XS, Lee WD, Kim NH, Park SP & Lim JH 2007 Survivin acts as anti-apoptotic factor during the development of bovine pre-implantation embryos. *Mol Reprod Dev* 74 582-590.
- Plante L, Plante C, Shepherd DL & King WA 1994 Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. *Mol Reprod Dev* 39 375-383.
- Ratcliff F, Harrison BD & Baulcombe DC 1997 A Similarity Between Viral Defense and Gene Silencing in Plants *Science* 279 1558-1560.
- Rozen S & Skaletsky HJ 2000 Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386 (Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).

Ruzanov PV, Evdokimova VM, Korneeva NL, Hershey JW & Ovchinnikov LP 1999 Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *J Cell Sci* 112 (Pt 20) 3487-3496.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N & Zamore PD 2003 Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115 199-208.

Sharov AA, Dudekula DB & Ko MS 2005 A web-based tool for principal component and significance analysis of microarray data. *Bioinformatics* 21 2548-2549.

Siddall LS, Barcroft LC & Watson AJ 2002 Targeting gene expression in the preimplantation mouse embryo using morpholino antisense oligonucleotides. *Mol Reprod Dev* 63 413-421.

Sirard MA, Dufort I, Vallee M, Massicotte L, Gravel C, Reghenas H, Watson AJ, King WA & Robert C 2005 Potential and limitations of bovine-specific arrays for the analysis of mRNA levels in early development: preliminary analysis using a bovine embryonic array. *Reprod Fertil Dev* 17 47-57.

Stein P, Svoboda P & Schultz RM 2003 Transgenic RNAi in mouse oocytes: a simple and fast approach to study gene function. *Dev Biol* 256 187-193.

Stein P, Zeng F, Pan H & Schultz RM 2005 Absence of non-specific effects of RNA interference triggered by long double-stranded RNA in mouse oocytes. *Dev Biol* 286 464-471.

Strichman-Almashanu LZ, Bustin M & Landsman D 2003 Retroposed copies of the HMG genes: a window to genome dynamics. *Genome Res* 13 800-812.

Svoboda P, Stein P, Hayashi H & Schultz RM 2000 Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 127 4147-4156.

Telford NA, Watson AJ & Schultz GA 1990 Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26 90-100.

Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Mendoza C & Greco E 2003 Microfilament disruption is required for enucleation and nuclear transfer in germinal vesicle but not metaphase II human oocytes. *Fertil Steril* 79 Suppl 1 677-681.

Tesfaye D, Lonergan P, Hoelker M, Rings F, Nganvongpanit K, Havlicek V, Besenfelder U, Jennen D, Tholen E & Schellander K 2007 Suppression of connexin 43 and E-cadherin transcripts in in vitro derived bovine embryos following culture in vitro or in vivo in the homologous bovine oviduct. *Mol Reprod Dev* 74 978-988.

- Tremblay K, Vigneault C, McGraw S & Sirard MA 2005 Expression of cyclin B1 messenger RNA isoforms and initiation of cytoplasmic polyadenylation in the bovine oocyte. *Biol Reprod* 72 1037-1044.
- Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R & Saigo K 2004 Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* 32 936-948.
- 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.
- Vigneault C, Gilbert I, Sirard MA & Robert C 2007 Using the histone H2a transcript as an endogenous standard to study relative transcript abundance during bovine early development. *Mol Reprod Dev* 74 703-715.
- West KL, Ito Y, Birger Y, Postnikov Y, Shirakawa H & Bustin M 2001 HMGN3a and HMGN3b, two protein isoforms with a tissue-specific expression pattern, expand the cellular repertoire of nucleosome-binding proteins. *J Biol Chem* 276 25959-25969.
- West KL 2004 HMGN proteins play roles in DNA repair and gene expression in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 32 918-919.
- Wianny F & Zernicka-Goetz M 2000 Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* 2 70-75.
- Yamazaki Y, Wakayama T & Yanagimachi R 2001 Contribution of cumulus cells and serum to the maturation of oocyte cytoplasm as revealed by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Zygote* 9 277-282.
- Yu J, Hecht NB & Schultz RM 2001 Expression of MSY2 in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol Reprod* 65 1260-1270.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA & Bartel DP 2000 RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101 25-33.

5.10 TABLES

Table 5.1. List of oligos used for real-time PCR and siRNA production

PCR Primers		Sequences (5'-3')
<i>HMGNI</i>	Forward	GTCTCCTGGTTGGCCACTTC
	Reverse	GTCAGCTAAACCGGCTCCTG
<i>HMGN2</i>	Forward	CCAAGAGAAAGGCTGAAGG
	Reverse	ACTTGGCATCTCCAGCAC
<i>MATRIN3</i>	Forward	AAAGTGGCAGTTCAGTGGGAGA
	Reverse	TCTTTGCAGCTCCAGAAGCACT
β - <i>ACTIN</i>	Forward	CGTGACATTAAGGAGAAGCTGTGC
	Reverse	CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT
<i>GAPDH</i>	Forward	ATGCTGGTCTGAGTATGTAGTGG
	Reverse	AGAAGCAGGGATGATATCTGGGG
<i>H2A.1</i>	Forward	GCGACAACAAGAAGACCCGTATCA
	Reverse	GCCTTATGGTGA CTCTCGGTTT
<i>GFP</i>	Forward	CCACAAGTTCAGCGTGTCC
	Reverse	GTGCTGCTTCATGTGGTGGG
siRNA oligo templates		
<i>HMGNI</i> siRNA A	Antisense	AAGGCGAGGTTGTCAGCTAAACCTGTCTC
	Sense	AATTTAGCTGACAACCTCGCCCCTGTCTC
<i>HMGNI</i> siRNA B	Antisense	GGGAAAGGATAAATCTTCAGACCTGTCTC
	Sense	AATCTGAAGATTTATCCTTTCCCTGTCTC
<i>HMGNI</i> siRNA C	Antisense	GGCCAACCAGGAGACTAAAGACCTGTCTC
	Sense	AATCTTTAGTCTCCTGGTTGGCCTGTCTC
<i>HMGNI</i> siRNA D	Antisense	AAAGGAGACTAAAGAAGACTTCCTGTCTC
	Sense	AAAAGTCTTCTTTAGTCTCCTCCTGTCTC
<i>HMGN2</i> siRNA A	Antisense	AAGGACGAACCACAGAGAAGACCTGTCTC
	Sense	AATCTTCTCTGTGGTTCGTCCCCTGTCTC
<i>HMGN2</i> siRNA B	Antisense	AAGCCAGAACCCAAGCCTAAACCTGTCTC
	Sense	AATTTAGGCTTGGGTTCGGCCCTGTCTC
<i>HMGN2</i> siRNA C	Antisense	AAGGCACAGAAAGCTGAAGGTCTGTCTC
	Sense	AAACCTTCAGCTTTCTGTGCCCTGTCTC
<i>HMGN2</i> siRNA D	Antisense	AAGTGAAGTGTGTGCATTTTCTGTCTC
	Sense	AAAAAATGCACACACTTCACCCTGTCTC
<i>MATRIN 3</i> siRNA	Antisense	AACCATGGAAGTCGTTCTCAACCTGTCTC
	Sense	AATTGAGAACGACTTCCATGGCCTGTCTC

Table 5.1. Nucleotide sequences underlined correspond to the priming site of the T7 promoter oligos used to produce the template in the siRNA construction kit. The antisense and sense annotations correspond to the siRNA strand produced with this oligo.

5.11 FIGURES

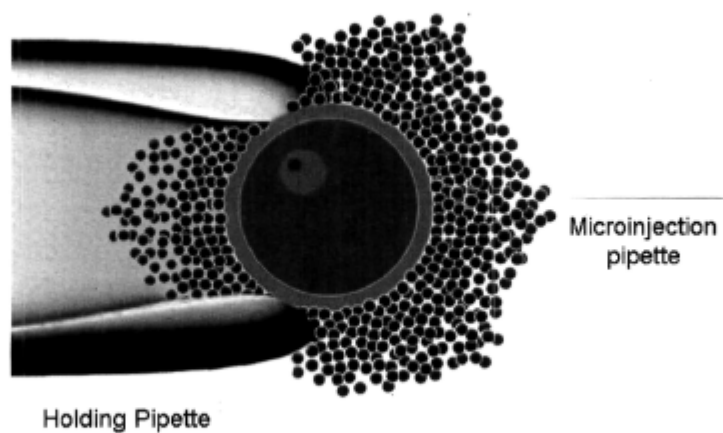


Figure 5.1. Graphical representation of the microinjection setup. Representation of the typical holding and microinjection pipettes used in our siRNAs microinjection procedure in immature cumulus-oocyte complexes.

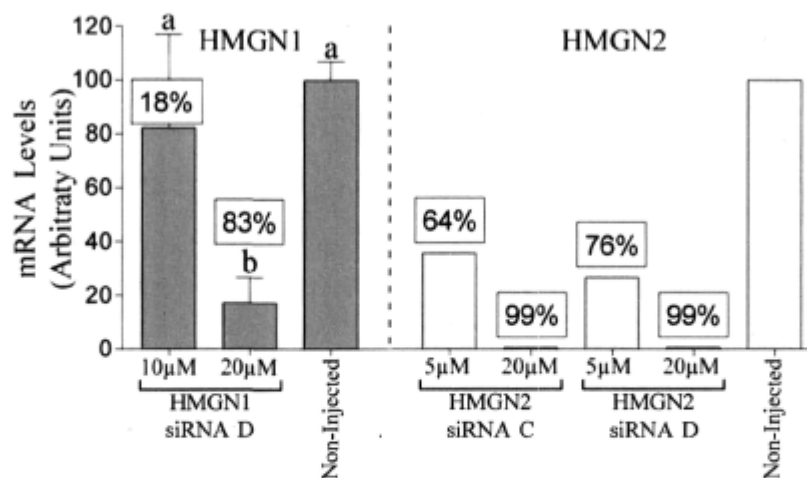


Figure 5.2. Dose-dependent action of siRNAs. The siRNA concentration injected into oocytes influences knockdown efficiency as determined by mRNA transcript abundance in 1-cell embryos. The remaining mRNA expression level in 1-cell embryos is shown for each siRNA concentration. Knockdown efficiencies are displayed as percentages (%) in boxes. *HMGN1* quantifications were done in duplicate from two different microinjected embryos while *HMGN2* quantifications were accomplished on one embryo only. The amounts of mRNA shown represent the quantity of transcript corrected to the *GFP* value measured in each sample. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

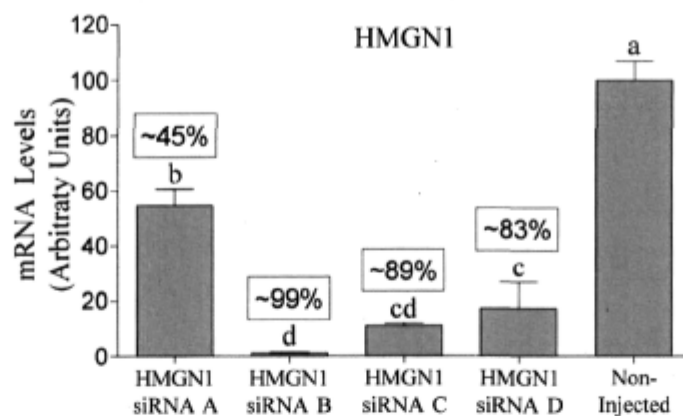


Figure 5.3. Variable knockdown efficiency among different siRNAs. Variations in knockdown efficiency are detected between different siRNAs. *HMGNI* mRNA levels measured 42h post-microinjection of four different siRNAs targeting *HMGNI* are displayed as histogram bars. Knockdown efficiency is displayed as percentages (%) of the amount measured in controls (non-injected). Quantifications were done on three different embryos and corrected with the *GFP* value measured from each sample. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

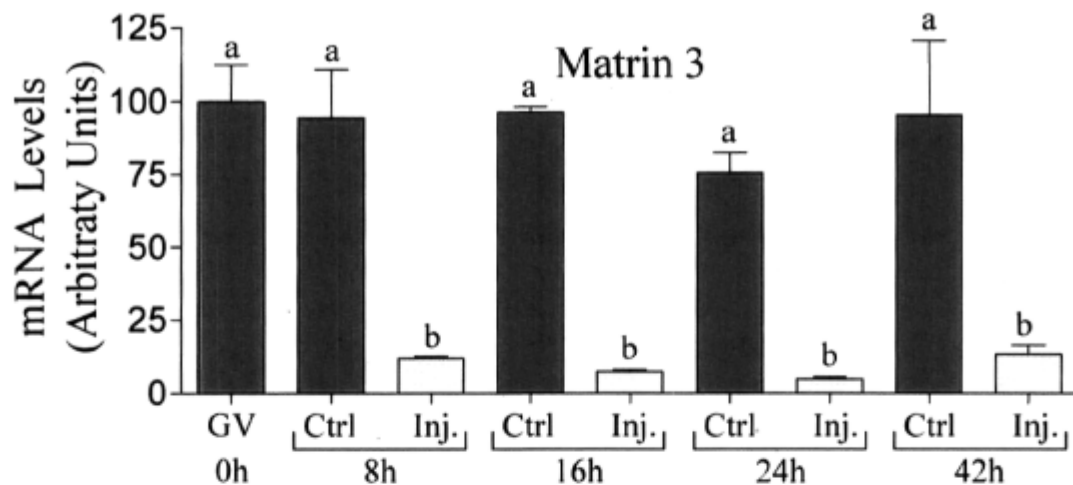


Figure 5.4. Kinetics of RNAi process in bovine GV oocytes. *MATRIN 3* mRNA levels in microinjected oocytes and zygotes (light grey) in comparison to mRNA levels measured in non-injected controls (dark grey) at different times following microinjection. 0h, 8h, 16h and 24h are corresponding to oocyte stages and 42h represents 1-cell embryos. Quantifications were done on three different oocytes or embryos and corrected with the *GFP* value measured from each sample. Different letters indicate significant differences ($p < 0.01$).

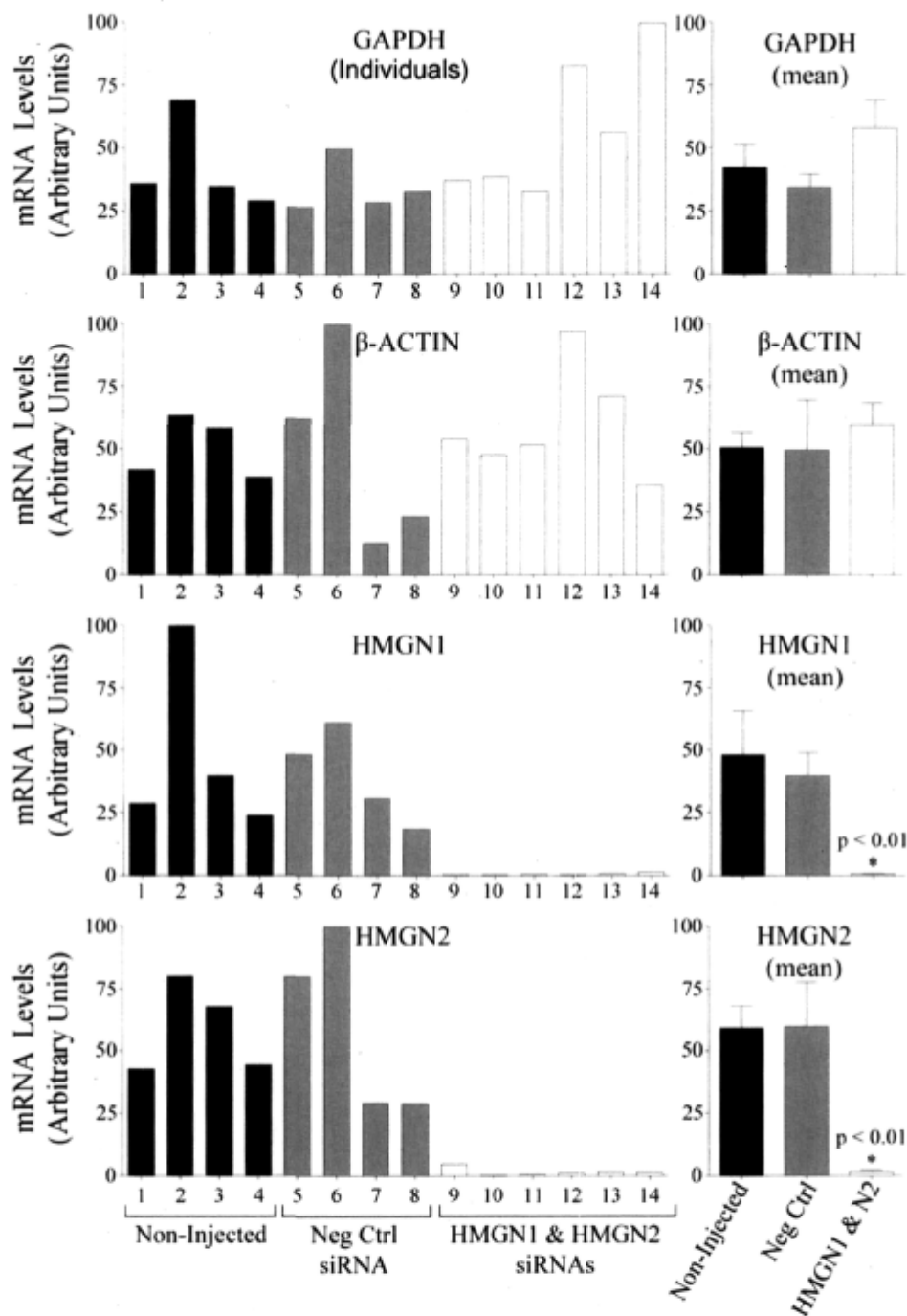


Figure 5.5. Efficiency and specificity of *HMGNI* & *HMGN2* siRNA co-injection. Quantification of *GAPDH*, *β-ACTIN*, *HMGNI* and *HMGN2* mRNA levels in 1-cell embryos produced from GV oocytes non-injected (black bars), injected with negative control siRNA #4 (light grey bars) or injected with *HMGNI* & *HMGN2* siRNAs (white bars). Messenger RNA levels corresponding to individual embryos (1 to 14) are shown on the left and means on the right. The mRNA levels reported represent the quantity of transcript corrected with the *GFP* and *H2A.1* values measured from each sample. * indicates a significant difference ($p < 0.01$) versus non-injected controls.

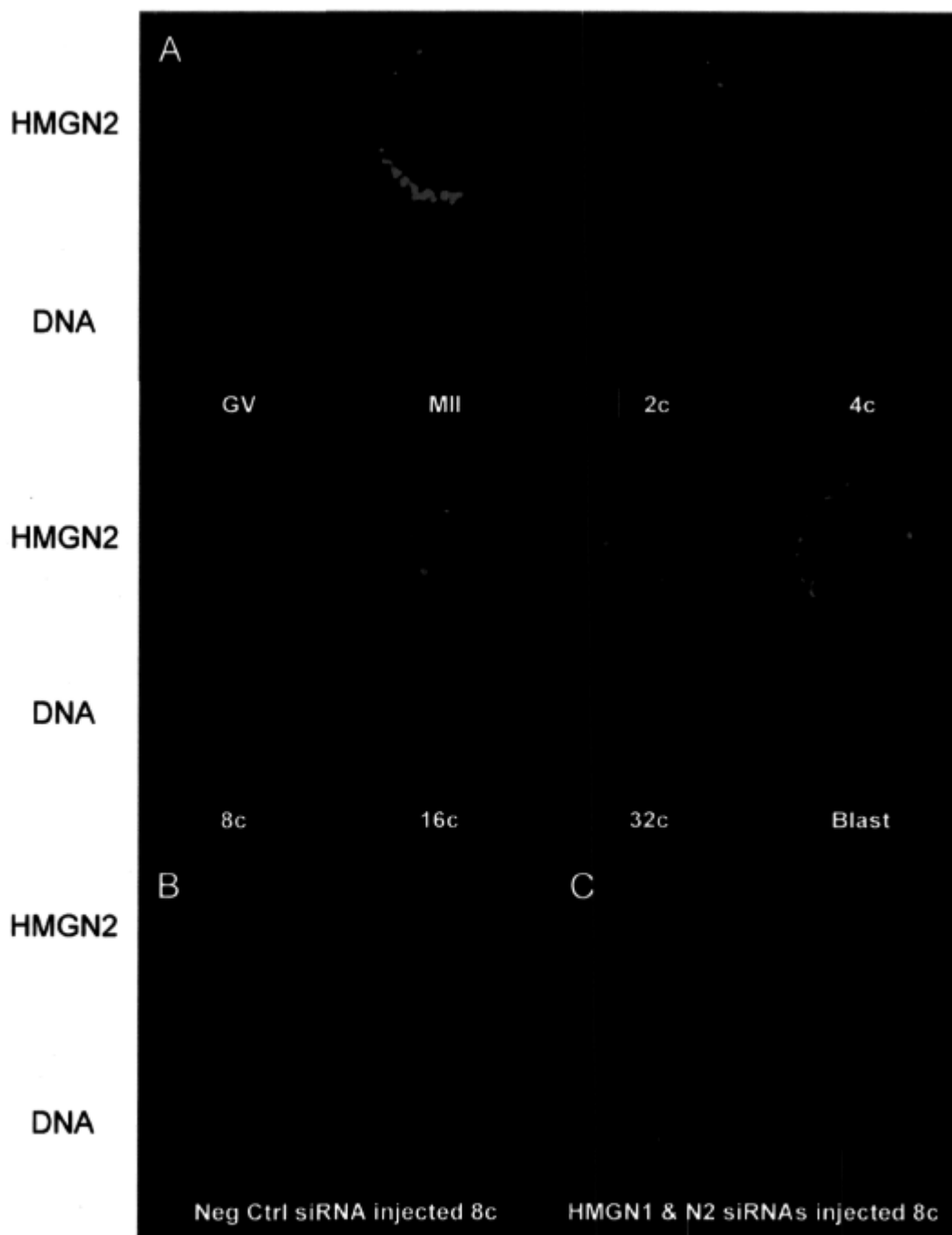


Figure 5.6. Immunofluorescence showing localization of the HMGN2 proteins in embryos following siRNA injection. Presence of HMGN2 proteins throughout bovine early embryogenesis in non-injected oocytes and embryos (A). HMGN2 expression in 8-cell embryos produced from GV oocytes injected with negative control siRNAs (B) or co-injected with *HMGN1* & *HMGN2* siRNAs (C). HMGN2 proteins detection is shown in green and DNA staining by propidium iodide is shown in red.

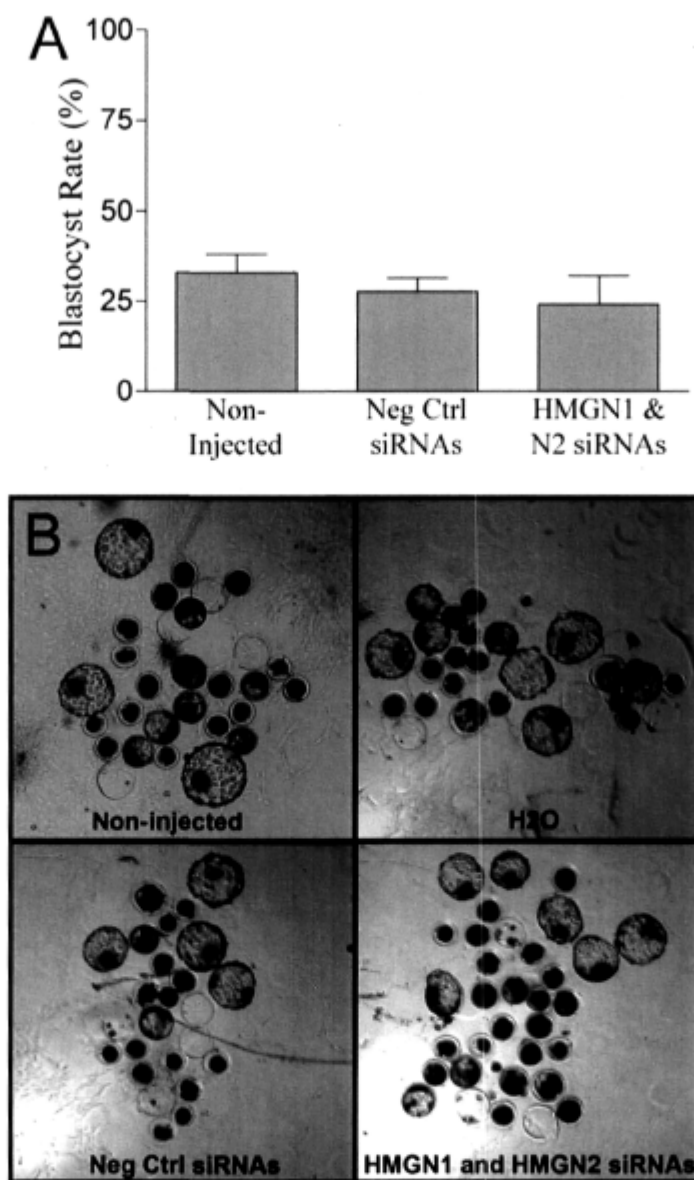


Figure 5.7. Developmental potential of microinjected oocytes. Blastocyst developmental rates of non-injected oocytes, oocytes microinjected with negative control siRNAs and oocytes microinjected with a mixture of *HMGN1* and *HMGN2* siRNAs (A). Only oocytes that survived the microinjection procedures were kept for the determination of blastocyst developmental rates. Illustration of representative embryo culture droplets of control embryos and embryos produced following microinjection of water, negative control siRNA or *HMGN1* & *HMGN2* siRNAs (B).

**CHAPITRE VI : *MATRIN 3*, UN CONSTITUANT DE LA MATRICE
NUCLÉAIRE ESSENTIEL AU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE**

**CHAPTER VI : *MATRIN 3*, A NUCLEAR MATRIX COMPONENT
ESSENTIAL TO EMBRYO DEVELOPMENT**

Christian Vigneault, Serge McGraw et Marc-André Sirard

Le contenu de ce chapitre n'a pas encore été soumis pour publication

6.1 RÉSUMÉ

Étant donné que la transcription du génome chez le très jeune embryon bovin est pratiquement éteinte, pour assurer sa subsistance, ce dernier doit faire appel aux réserves d'ARNm et de protéines légués par l'ovocyte. Ces ARNm et protéines assurent également à l'embryon un approvisionnement en divers régulateurs de transcription qui participent à l'éveil du noyau et de la transcription lors des stades 8- à 16-cellules chez le bovin. L'objectif de cette étude était d'investiguer la présence et l'impact sur le développement embryonnaire de *MATRIN 3*, une composante majeure de la matrice nucléaire pourvue d'une activité régulatrice de la transcription. La quantification du transcrit codant pour *MATRIN 3* a révélé que l'ARNm maternel présent dans l'ovocyte diminue graduellement au cours du développement pour atteindre son niveau le plus faible au stade 8-cellules. À partir de ce moment, le transcrit maternel de *MATRIN 3* est remplacé par son analogue d'origine embryonnaire. La localisation de la protéine dans l'embryon bovin par immunocytochimie a démontré que *MATRIN 3* est présent au niveau du noyau dans tous les stades embryonnaires examinés. La micro-injection d'un siRNA ciblant les ARNm maternels de *MATRIN 3* dans l'ovocyte bovin a permis de réduire substantiellement les niveaux de protéines *MATRIN 3* dans les embryons, provoquant ainsi une réduction dramatique du nombre de blastocystes produits. Ces résultats suggèrent que *MATRIN 3* joue un rôle essentiel dans le développement du jeune embryon bovin. Toutefois, les mécanismes derrière cet arrêt du développement induit par la perte de fonction de *MATRIN 3* demeurent obscurs mais suggèrent une activation déficiente du génome de l'embryon.

6.2 ABSTRACT

The genome of bovine early embryos is nearly transcriptionally silent until the 8- to 16-cell stage. The survival of the embryo throughout this quiescence period is assured by maternal stores of mRNA and proteins accumulated in the oocyte during its final growth. The major activation of the embryonic genome in 8- to 16-cell stage embryos is crucial for subsequent embryonic development and requires proper conditions and regulators provided by the oocyte. The objective of this study was to investigate the presence and impact in embryogenesis of *MATRIN 3*, a major component of the nuclear matrix that also possesses a putative transcriptional regulating function. Quantitative RT-PCR showed that immature oocytes contain high levels of maternal *MATRIN 3* mRNA, which decrease throughout early embryogenesis until the late 8-cell stage when the embryo begins its own transcription of the *MATRIN 3* gene. Immunofluorescence labelling revealed nuclear localization of MATRIN 3 protein in both immature oocytes and in embryos at later stages. Knockdown of maternal *MATRIN 3* mRNA in oocytes via siRNA dramatically decreased MATRIN 3 protein levels in early embryonic stages and strikingly inhibited the developmental competence of the embryos. This suggests a critical role for *MATRIN 3* in early bovine embryo development. Although the precise mechanisms underlying this developmental inhibition are still unclear, they may involve an ineffective activation of the transcriptional activity of the embryo's own genome.

6.3 INTRODUCTION

Transcriptional quiescence is a typical attribute of the first embryonic stages of many vertebrate and invertebrate species (reviewed in Zurita *et al.*, 2007). To support the final maturation, fertilization and the first embryonic cleavages stages, the oocyte must therefore store large amounts of maternal mRNA and proteins during its final growth. This dependence on maternal stores is transient and hence the embryo eventually needs to launch the transcription of its own genome. The maternal stockpiles of mRNA and proteins are most likely involved in the complex mechanisms underlying this transcriptional activation that occurs suddenly in the silent embryo. The crucial substitution of maternally-derived mRNA by embryonic mRNA is called the maternal to embryonic transition (MET), and the embryonic stage at which it is initiated is species-dependant (reviewed in Telford *et al.*, 1990, Memili & First, 2000), occurring at the 8- to 16-cell stage in bovine embryos (Camous *et al.*, 1986, King *et al.*, 1988, Frei *et al.*, 1989, Kopecny *et al.*, 1989, Telford *et al.*, 1990). The mechanisms triggering the embryonic major transcriptional activation remain largely obscure, though numerous studies have investigated the presence of transcription and chromatin regulating factors in early mammalian embryos around MET (Wang Q. & Latham, 2000, Segev *et al.*, 2001, McGraw *et al.*, 2003, Vigneault *et al.*, 2004, Zheng *et al.*, 2004, McGraw *et al.*, 2007, Ruddock-D'Cruz *et al.*, 2008 and Chapter III). However, very few studies have investigated the global chromatin and nuclear structures in early embryos in relation with transcription processes.

In the past decades, the classic transcriptional linear model has been challenged and compelling evidence now suggests that transcription is also regulated to some degree by a three dimensional chromatin conformation and nuclear compartmentalization (Davie, 1997, Gilbert *et al.*, 2005, Razin *et al.*, 2007). Chromatin positioning within the nucleus is mediated by the nuclear matrix (or nucleoskeleton), a meshwork of proteins covering the inner side of the nuclear membrane that bind special chromatin elements known as scaffold-attachment or matrix-associated regions (S/MARs) (reviewed in Bode *et al.*, 2003). The binding of S/MARs to the nuclear matrix forms chromatin loops and promotes the localisation and concentration of transcriptionally active domains and transcriptional

machinery at the same locus to enhance transcription. Moreover, the large quantity of RNA processing proteins in the composition of the nuclear matrix points to an involvement of the matrix in the processing of the mRNA as it is transcribed (Blencowe *et al.*, 1994, Bode *et al.*, 2003).

Ultrastructural studies of the nuclear matrix in mouse and bovine early embryos revealed no significant differences between pre- and post-MET embryos (Philimonenko *et al.*, 2001, Degrouard *et al.*, 2004). However, a study in *Xenopus* demonstrated that genomic domains of genes expressed at MET become specifically associated with the nuclear matrix during MET (Vassetzky *et al.*, 2000). This stands in contrast to pre-embryonic genome activation stages, when these domains, which are then associated to transcriptionally silent genes, do not exhibit any specific spatial organization (Vassetzky *et al.*, 2000). Immunocytochemical studies also revealed a plausible relationship between the presence of components of the nuclear matrix and the embryonic genome activation in bovine and mouse embryos (Prather & Schatten, 1992, Degrouard *et al.*, 2004). These studies demonstrated that the nuclear matrix composition changes at MET, as some nucleoskeleton markers are essentially absent in the nucleus of pre-MET embryos. Finally, by monitoring the localization of the heterochromatin protein 1 β (HP1 β) and centromere specific proteins (CENP A and B), a recent study exposed striking differences between the genome structures of pre- and post-MET stages in mouse and bovine embryos (Martin *et al.*, 2006). Indeed, whereas pre-MET HP1 β is randomly distributed in the nucleoplasm, during MET it becomes concentrated in punctuated locations of the nucleoplasm and colocalizes with CENP A and B, as also observed in embryonic stem (ES) or somatic transcriptionally active cells (Martin *et al.*, 2006).

These observations suggest that the structure of the nuclear matrix plays a prominent role in embryonic genome activation. *MATRIN 3*, a major component of this matrix that contains two DNA binding domains (Belgrader *et al.*, 1991, Nakayasu & Berezney, 1991), was isolated from a library enriched in transcripts expressed at MET in bovine embryos (Chapter IV). The objectives of the present study were first, to establish the mRNA and protein expression profiles of *MATRIN 3* during early bovine

embryogenesis and second, to investigate the consequences of *MATRIN3* knockdown on embryo development.

6.4 MATERIALS AND METHODS

All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, On, Canada) unless otherwise stated.

6.4.1 Oocyte recovery and embryo production

Oocytes were aspirated from healthy follicles of 3 to 6 mm in diameter obtained from slaughterhouse ovaries. Only oocytes with uniform cytoplasm and at least 5 layers of cumulus cells were conserved for microinjection and embryo production. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were washed in bovine follicular fluid (BFF) for selection and kept in BFF until microinjection or oocyte maturation. Oocyte maturation, fertilization and embryo development were done as described in details in Chapter IV with the exception of using 10% fetal calf serum (Medicorp, Montreal, QC, Canada) instead of fatty acid free bovine serum albumin (FAF-BSA) in SOF medium during maturation and embryo culture. For quantitative RT-PCR experiments, GV oocytes were collected immediately after recovery from ovary and denuded mechanically to remove all cumulus cells. Embryos were collected at 18, 30, 55 and 90 h post-fertilization for 1-, 2-, 6- to early 8- and late 8- to 12-cell stage embryos respectively. Blastocysts were collected at day 8 post-fertilization. For immunofluorescence experiments, the GV oocytes, 1- and 2-cell stage embryos and blastocysts were collected at the times mentioned above. Metaphase II (MII) oocytes were collected following a period of 24h *in vitro* maturation of the GV oocytes. Four-, mid eight- and sixteen-cell stage embryos and morula were gathered respectively 42, 72, 102 h and 6 days post-fertilization. Alpha-amanitin, an inhibitor of transcription, was added at 25 µg/ml in the culture medium of treated embryos from the 1-cell stage to the collection of these embryos for quantitative RT-PCR experiments. Mechanical complete removal of cumulus cells was done for all oocytes and embryos used in quantitative RT-PCR experiments.

Thereafter, the oocytes and embryos were washed in RNase-free PBS and frozen to -80°C until RNA extraction.

6.4.2 Design of siRNAs

All siRNAs were designed following design guidelines described in details in Chapter V. Sequences of the siRNA were compared with sequences of NCBI database to ensure they show no homology to other genes in order to prevent any non-specific mRNA targeting.

6.4.3 *In vitro* synthesis of siRNAs

All siRNAs were produced with the Silencer siRNAs Construction Kit from Ambion (Ambion, Austin, Tx, USA) following manufacturer recommendations. Template oligos used for the production of the *MATRIN 3* siRNA used in this study are shown in Table 6.1. Purified double-stranded siRNA was eluted in water and frozen as stock solutions at a concentration of $50\ \mu\text{M}$ at -80°C . Silencer negative control #4 siRNA (Neg Ctrl siRNA), #cat AM4641 (Ambion), used as non-targeting control siRNA was purified on columns supplied in the siRNA construction kit (Ambion) and eluted in water to remove any salts contained in the initial buffer. All concentration measurements were done on a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). siRNAs were diluted in water at $20\ \mu\text{M}$ prior microinjections.

6.4.4 Cumulus enclosed oocytes microinjection

Intact healthy COCs were used for siRNAs microinjections. Microinjections in GV oocytes cytoplasm without cumulus cells removal were performed as detailed in Chapter V using in house fabricated pipettes. The most efficient siRNA against *MATRIN 3* selected by preliminary experiments (data not shown) was used for microinjection experiments described in this study. Approximately $1\ \text{pl}$ of siRNA solution was injected in each oocyte and successful injection was monitored by very discrete cytoplasm movement during the injection. The two groups were microinjected with either *MATRIN 3* or Neg Ctrl siRNA

diluted at 20 μ M each. Following microinjection, COCs were washed briefly in TLH medium and matured 24h until fertilization.

6.4.5 RNA extraction

All RNA extractions were done with the Picopure RNA isolation kit (Arcturus Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. RNA was eluted in 10 μ l of elution buffer and frozen at -80°C until use. In quantitative RT-PCR experiments assessing the mRNA levels of *MATRIN 3* throughout development, three pools of 20 oocytes or embryos were collected and used for mRNA extraction. RNA was extracted separately from three single 1-cell embryos for each treatment following siRNA microinjection for the transcript quantification of *MATRIN 3*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and histone H2a.1 (*H2a.1*). Before RNA extraction, 1 pg of exogenous *GFP* poly (A) RNA was added to each sample at the beginning of extraction as an exogenous control for the RNA extraction and reverse transcription steps (Vigneault *et al.*, 2004).

6.4.6 Reverse transcriptase and real-time RT-PCR

RNA from oocytes and embryos was reverse transcribed using oligo dT(18) primers (1 μ M) with the Sensiscript RT kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) following the manufacturer's recommendations in the presence of 10 units of recombinant RNasin (Promega, Madison, WI, USA). Random nanomers (5 μ M) were added to the RT mix in the quantification experiments following siRNAs microinjection to ensure the measurement of all mRNAs and not only polyadenylated mRNAs. The primers used for real-time quantitative RT-PCR are listed in Table 6.1 and were designed using Primer3 web interface (Rozen & Skaletsky, 2000). For each gene examined, a standard curve, consisting of PCR products purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and quantified with a Nanodrop was included. Real-time PCR was executed on a Lightcycler apparatus (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) using SYBR green incorporation. Each reaction contained the cDNA corresponding to 0.5 oocyte or embryo and a mixture containing 0.5 μ L of each

primer (10 μ M), 1.6 μ L of 25mM MgCl₂ (final concentration of 3mM), 2 μ L of the SYBR green mix containing dNTPs, FastStart DNA polymerase enzyme and buffer (Roche). To assess the degradation efficiency and specificity of injected siRNAs, 0.1 embryos were used in each PCR reaction. The PCR conditions used for all genes were as follows: denaturing cycle of 10 min at 95°C; 45 PCR cycles (denaturing: 95°C for 1 sec, annealing: 58°C for 5 sec, extension: 72°C for 10 sec); a melting cycle consisting of 95°C for 1 sec, 70°C for 30 sec and of a step cycle starting at 70°C up to 95°C with a 0.2°C/sec transition rate; a final cooling cycle of 40°C for 30sec. The cDNA quantification was performed using Lightcycler Software Version 3.5 (Roche) with comparison to the standard curve. PCR specificity was confirmed by analysis of the melting curve and sequencing of PCR product.

6.4.7 Immunofluorescence

GV and MII stage oocytes, two-, four-, eight-, and sixteen-cell embryos, morulae and blastocysts, were attached onto poly-L-lysine coated coverslips. Fixation and incubations were done as described in Chapter III. In brief, samples were fixed in 2% fresh paraformaldehyde solution for 30 min and permeabilized in 0.4% Triton X-100 for 30 min. After being blocked 1h in 3% non-fat dry milk and 5% goat serum in TBS-Tween 20, oocytes and embryos were incubated 3h at room temperature with *MATRIN 3* antibody (#cat A300-591A, BETHYL LABORATORIES, Montgomery, TX, USA) diluted 1:500 in the blocking solution. Subsequent steps and washes were done as described in Chapter III. The samples were incubated 45 min with secondary antibody Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1:1000 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) in a solution of TBS-Tween 20 containing 2% non-fat dry milk. DNA was stained with 10 min incubation in propidium iodide (10 μ g/mL) in PBS. Negative controls were prepared without primary antibody and were used for background settings in confocal analysis on a TE-2000 confocal microscope (Nikon). Immunofluorescence was performed only once and at least 5 oocytes or embryos of each stage were observed. A second *MATRIN 3* antibody (#cat A300-590A, BETHYL LABORATORIES) was also used in the same conditions in a validation experiment.

6.4.8 Survival and developmental rate assessment of GV oocytes microinjected with *MATRIN 3* siRNAs

Following microinjection, GV oocytes were matured and fertilized. Eighteen hours post-fertilization, presumed zygotes were denuded. At this stage, survival rate was examined. Zygotes with light or shrunken cytoplasm were considered dead and removed as only live embryos were cultured until the blastocyst stage. Assessment of blastocyst developmental rates was done at day 8 post-fertilization on embryos that survived the microinjection procedure.

6.4.9 Statistical analysis

Measured levels of mRNA were normalized using *GFP* levels as external control as described previously (Vigneault *et al.*, 2004). Statistically significant differences in mRNA levels between developmental stages or treatments were calculated by ANOVA followed by a Newman-Keuls test. Replicates were included in the statistical model. Differences were considered statistically significant at the 95% confidence level or more ($p < 0.05$). Data are presented as mean \pm SEM. Survival and developmental rates were analysed merging data from four different microinjection experiments. Statistical differences ($p < 0.001$) were calculated by ANOVA followed by a Newman-Keuls test.

6.5 RESULTS AND DISCUSSION

6.5.1 *MATRIN 3* mRNA expression profile in bovine early embryogenesis

To our knowledge, *MATRIN 3* expression in embryos was revealed for the first time in our library enriched in transcripts expressed in the bovine late 8-cell embryos (Chapter IV). This library exposed more than 300 different transcripts expressed at the maternal to embryonic transition (MET) that are potentially critical to the proper development of the bovine embryo. To confirm the novel mRNA expression of *MATRIN 3* in the 8-cell

embryos, quantitative RT-PCR was performed on bovine GV oocytes and early embryos. Results displayed in Figure 6.1 were obtained using oligo dT(18) in the reverse transcriptase step thus ensuring that only polyadenylated mRNA were quantified. The addition of α -amanitin, which inhibits RNA polymerase II and hence transcription, allowed to discriminate the origin (i.e. maternal vs embryonic) of the transcripts detected. Results obtained for the 2- and 6- to early 8-cell stage embryos showed no difference between the mRNA levels measured in control or α -amanitin embryos. This indicated that the *MATRIN 3* mRNA detected at those stages was not influenced by the inhibition of transcription and was thus derived from maternal mRNA stores. The situation was quite different for the late 8- to 12-cell stage embryos where a significant difference was observed between the α -amanitin treated and untreated embryos (Figure 6.1). At these stages, levels of *MATRIN 3* mRNA were minute in treated embryos which demonstrated that nearly all maternal *MATRIN 3* mRNA had been degraded at this point and that the mRNA detected at this specific stage is derived from embryonic transcription. A validation experiment using random primers in the RT step was done with 8- to 12-cell stage embryos and gave comparable results, showing that this decrease is indeed due to transcription and not a loss in polyadenylation. The embryonic transcription of *MATRIN 3* increased thereafter as shown by the very high level detected in the blastocyst stage (Figure 6.1). The *de novo* transcription of embryonic mRNA coding for *MATRIN 3* in the 8-cell stage embryos, as maternal reserves decrease and become barely discernible, suggests the potential importance of this gene for early embryogenesis.

6.5.2 *MATRIN 3* protein localization in bovine oocytes and early embryos

Since mRNA and protein levels do not always correlate, especially in early embryos (Chapter III); we examined *MATRIN 3* protein expression and localization in bovine oocytes and early embryos (Figure 6.2). Results showed a very strong localization of *MATRIN 3* in the germinal vesicle of the immature GV oocyte. Thereafter, in the metaphase II oocytes (MII), where the nuclear envelope is absent, no further signal was detected around the chromatin. A similar rapid loss of signal of another nuclear matrix protein, lamin A/C was observed between the GV and MII oocyte stages (Prather *et al.*,

1989, Hall *et al.*, 2005). Interestingly, the expression level of MATRIN 3 was highly variable amongst the GV oocytes studied. Specifically, while some immature oocytes exhibited a very strong expression of MATRIN 3 localized to the germinal vesicle (Figure 6.2), others did not display any nuclear signal at all (data not shown). This observation could be explained by the stage heterogeneity of the GV oocytes retrieved from slaughterhouse ovaries (Lodde *et al.*, 2007a). Indeed, depending on the GV stage of the immature oocyte, the germinal vesicle differs as in the most advanced GV oocytes stages, which largely corresponds to the oocytes used in this experiment, the nuclear envelope is profoundly undulated compared to younger oocytes where it is intact (Lodde *et al.*, 2007b). This suggests that the presence of MATRIN 3 in the germinal vesicle of immature oocytes could depend on the type of the GV oocyte used and on the transcriptional status of these oocytes (Lodde *et al.*, 2007b). Thus, when the vesicle loses its integrity during the oocyte final growth or prepares itself for the germinal vesicle breakdown (GVBD), MATRIN 3 could be displaced from the nucleus and/or degraded.

MATRIN 3 nuclear localization was restored in the 2-cell and subsequent embryonic stages. However, no major difference in spatio-temporal expression of MATRIN 3 amongst embryonic stages was detected. Since the major transcriptional burst occurs in the 8- to 16-cell stages in bovine (Camous *et al.*, 1986, King *et al.*, 1988, Frei *et al.*, 1989, Kopecny *et al.*, 1989, Telford *et al.*, 1990), the presence of MATRIN 3 in previous stages points to a possible contribution of this protein to the minor transcription observed at these stages (Barnes & First, 1991, Memili *et al.*, 1998b, Natale *et al.*, 2000b). A strong presence of MATRIN 3 in the nucleus of cumulus cells was also observed in some corona cells that remained attached on the examined embryos as in the case of the 4-cell embryo displayed in Figure 6.2. Therefore, the presence of MATRIN 3 in the nucleus of early embryos, along with its embryonic mRNA transcription that occurs as soon as the embryonic genome is transcriptionally active, suggested a role for this gene in early embryogenesis. To test this hypothesis, we knocked down maternal *MATRIN 3* mRNA by siRNA microinjection and investigated the consequences of this knockdown on embryo development.

6.5.3 Knockdown efficiency and specificity of *MATRIN 3* siRNA microinjection

We previously showed that siRNA knockdown in GV oocytes within its cumulus cells layers is achievable without impairing the developmental potential of these oocytes (Chapter V). This procedure was used in this study to knockdown maternal *MATRIN 3* in bovine oocytes. The *MATRIN3* knockdown was evaluated 42h post-microinjection of the siRNA at the 1-cell stage (Figure 6.3). As a negative control to ensure that monitored effects on transcript levels was not due to the microinjection procedure by itself, a non-targeting control siRNA was microinjected in distinct oocytes. Results showed that siRNA directed against *MATRIN 3* degraded the endogenous *MATRIN 3* mRNA with an efficiency of ~90% when compared to zygotes obtained from non-injected and negative control microinjected oocytes ($P < 0.05$) (Figure 6.3). Evaluation of the mRNA levels of two ubiquitous genes, *Gapdh* and *H2a.1*, was done in the same embryos to validate that *MATRIN 3* and Neg Ctrl siRNA microinjection did not induce any non-specific mRNA degradation (Figure 6.3).

MATRIN 3 was a perfect target for siRNA knockdown by microinjection in GV oocytes because the oocyte enclosed large amounts of *MATRIN 3* mRNA (Figure 6.1) and that *MATRIN 3* seems to be translated in the early embryo since it is not detected in MII oocytes but detected *de novo* in 2-cell embryos (Figure 6.2). We studied previously the kinetics of the RNAi in bovine oocytes and showed that *MATRIN 3* mRNA knockdown is achieved as soon as 8h post-microinjection in the GV oocyte (Chapter V). This rapid degradation of the maternal *MATRIN 3* mRNA during the oocyte maturation could thus prevent significantly *de novo* *MATRIN 3* protein synthesis in the early embryo and reduce substantially *MATRIN 3* function.

6.5.4 Spatio-temporal expression of *MATRIN 3* in bovine embryos following siRNA microinjection

Our hypothesis that siRNA knockdown of the *MATRIN 3* maternal mRNA would lead to a reduction in *MATRIN 3* *de novo* protein synthesis in early embryos was

confirmed by immunofluorescence (Figure 6.4). MATRIN 3 protein was detected in the nucleus of control 1- and 2-cell non-injected embryos (Figure 6.4A and 6.4C). The same experiments were performed on 1- and 2-cell embryos produced following maturation and fertilization of *MATRIN 3* siRNA microinjected GV oocytes. *MATRIN 3* mRNA knockdown led to a decrease in the amount of MATRIN 3 protein in these embryos as displayed by the absence of fluorescent signal in the nucleus of the microinjected embryos (Figure 6.4B and 6.4D). Comparable results were obtained with another antibody directed against *MATRIN 3* (#A300-590A; data not shown) in microinjected 1-cell embryos, which further validates the inhibitory effect of siRNA mediated-knockdown of *MATRIN 3* mRNA on protein expression. The reduction of the MATRIN 3 protein levels combined with the loss of maternal mRNA coding for *MATRIN 3* in the 1-cell embryo restrict the access of the knocked down embryos to new MATRIN 3 proteins in the subsequent embryonic stages.

6.5.5 Impact of siRNA-mediated maternal *MATRIN 3* knockdown on developmental capabilities of targeted oocytes

We next investigated the effects of maternal *MATRIN 3* knockdown in oocytes on their embryonic development potential. Microinjection procedures induced an 18 to 20% mortality rate among the microinjected oocytes (Table 6.2), independent of the type of siRNA microinjected (Neg Ctrl vs *MATRIN 3* siRNA). This mortality rate was also similar to that observed in previous experiments (Chapter V). Dead oocytes were removed and only 1-cell embryos produced from the microinjected GV oocytes that survived the procedure were cultured until the blastocyst stage for developmental rate assessment. Table 6.2 displays the blastocyst development obtained for the oocytes exposed to one of the following three different treatments: non-injected, injected with Neg Ctrl siRNA and injected with *MATRIN 3* siRNA. No significant difference in the blastocyst development was seen between the GV oocytes microinjected with Neg Ctrl siRNA and the non-injected control oocytes. However, maternal *MATRIN 3* knocked down in GV oocyte induced a striking reduction in their developmental potential ($P < 0.001$). Indeed, less than 2% of the oocytes that survived the microinjection procedure reached the blastocyst stage. It should be noted that it is possible that these few blastocysts developed because of improper

microinjection of their precursing oocytes. Representative culture droplets of embryos produced following maturation and fertilization of GV oocytes exposed to the three different treatments are shown in Figure 6.5.

These results clearly demonstrate that maternal *MATRIN 3* mRNA plays a fundamental role in promoting bovine early embryogenesis, as loss of maternal *MATRIN 3* caused a significant developmental inhibition of the oocyte. The precise cause of this developmental block is still unclear at this time. Discovered in the early 1990s (Belgrader *et al.*, 1991), *MATRIN 3* has recently been associated with essential role in cell proliferation of chicken cells although the exact mechanism responsible for this effect could not be identified (Hisada-Ishii *et al.*, 2007). A potential wide-scale defect in transcriptional activity, directly induced by loss of *MATRIN 3*, is an appealing hypothesis. Indeed, many elements suggest that *MATRIN 3* could ensure optimal and efficient transcription. For instance, this large protein (~130 kDa) contains many functional domains: a nuclear export signal (NES), a nuclear localization signal (NLS), two zinc finger domains (ZF1 and ZF2), two RNA-binding domains (RB1 and RB2) and a putative membrane retention signal (MRS) (Hibino *et al.*, 2006). Furthermore, it is established that *MATRIN 3* is a major component of the nuclear matrix (Nakayasu & Berezney, 1991) and that it binds S/MARs and other DNA sequences in synthetic reporter constructs to promote gene transcription a variety of cell lines (Hibino *et al.*, 1998, Hibino *et al.*, 2000). This putative role for *MATRIN 3* in regulating transcription is intriguing and could be very relevant to the mechanism implicated in the embryo lethality observed in our knockdown experiments.

On the other hand, the loss of function of the RNA-binding domains of *MATRIN 3* could also be involved in the cellular death observed when it is knocked down (Hisada-Ishii *et al.*, 2007). Indeed, *MATRIN 3* associates with the 54 kD nuclear RNA-binding protein (p54nrb) and PTB-associated splicing factor (PSF), and this complex is involved in the retention of hyperedited mRNA (Zhang & Carmichael, 2001). The retention in the nucleus of these erroneous mRNAs edited by adenosines deaminases ensures their repression thus limiting the possibilities of promiscuous protein translation (reviewed in DeCerbo & Carmichael, 2005).

6.6 CONCLUSION

Here, we confirmed the *de novo* transcription of a major component of the nuclear matrix, *MATRIN 3*, at MET in bovine embryos. Following examination of the spatio-temporal expression profile of the *MATRIN 3* protein that was detected in the nucleus of all embryonic stages studied, maternal stores of *MATRIN 3* mRNA in immature oocytes was inhibited by siRNA knockdown. This resulted in a substantial decrease in the quantity of embryonic *MATRIN 3* proteins as early as the 1-cell stage and blocked the development competence of the embryos and decreased considerably the blastocyst developmental rate. *MATRIN 3* is therefore one of the few maternal genes identified to date that have a vital role in early embryogenesis and possibly MET (reviewed in Minami *et al.*, 2007). However, further investigations will have to be conducted to elucidate the mechanisms involved in embryo lethality following *MATRIN 3* knockdown. Our hypothesis is that the 8- to 16-cell embryos fail to properly activate the transcription of their genome because of defects in the chromatin compartmentalization in their nucleus. Study of the transcriptome of the knocked down 8-cell embryos by microarray analysis could potentially give critical information relative to the effects of loss of function of *MATRIN 3* on the embryo transcriptional activity at MET. In addition, electron microscopy could possibly give important insights on possible morphological modifications of the nuclear matrix of *MATRIN 3*-knocked down embryos.

6.7 ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Isabelle Laflamme for her very helpful assistance with embryos manipulations and David Gosselin for the correction of this manuscript. We thank also the Canadian Natural Sciences and Engineering Research Council and the Canada Research Chair for their financial support.

6.8 REFERENCES

- Barnes FL & First NL 1991 Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 29 117-123.
- Belgrader P, Dey R & Berezney R 1991 Molecular cloning of matrin 3. A 125-kilodalton protein of the nuclear matrix contains an extensive acidic domain. *J Biol Chem* 266 9893-9899.
- Blencowe BJ, Nickerson JA, Issner R, Penman S & Sharp PA 1994 Association of nuclear matrix antigens with exon-containing splicing complexes. *J Cell Biol* 127 593-607.
- Bode J, Goetze S, Heng H, Krawetz SA & Benham C 2003 From DNA structure to gene expression: mediators of nuclear compartmentalization and dynamics. *Chromosome Res* 11 435-445.
- Camous S, Kopecny V & Flechon JE 1986 Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo. *Biol Cell* 58 195-200.
- Davie JR 1997 Nuclear matrix, dynamic histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Mol Biol Rep* 24 197-207.
- DeCerbo J & Carmichael GG 2005 Retention and repression: fates of hyperedited RNAs in the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* 17 302-308.
- Degrouard J, Hozak P, Heyman Y & Flechon JE 2004 Nucleoskeleton of early bovine embryos and differentiated somatic cells: an ultrastructural and immunocytochemical comparison. *Histochem Cell Biol* 121 441-451.
- Frei RE, Schultz GA & Church RB 1989 Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J Reprod Fertil* 86 637-641.
- Gilbert N, Gilchrist S & Bickmore WA 2005 Chromatin organization in the mammalian nucleus. *Int Rev Cytol* 242 283-336.
- Hall VJ, Cooney MA, Shanahan P, Tecirlioglu RT, Ruddock NT & French AJ 2005 Nuclear lamin antigen and messenger RNA expression in bovine in vitro produced and nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev* 72 471-482.
- Hibino Y, Ohzeki H, Hirose N & Sugano N 1998 Involvement of phosphorylation in binding of nuclear scaffold proteins from rat liver to a highly repetitive DNA component. *Biochim Biophys Acta* 1396 88-96.

Hibino Y, Ohzeki H, Sugano N & Hiraga K 2000 Transcription modulation by a rat nuclear scaffold protein, P130, and a rat highly repetitive DNA component or various types of animal and plant matrix or scaffold attachment regions. *Biochem Biophys Res Commun* 279 282-287.

Hibino Y, Usui T, Morita Y, Hirose N, Okazaki M, Sugano N & Hiraga K 2006 Molecular properties and intracellular localization of rat liver nuclear scaffold protein P130. *Biochim Biophys Acta* 1759 195-207.

Hisada-Ishii S, Ebihara M, Kobayashi N & Kitagawa Y 2007 Bipartite nuclear localization signal of matrin 3 is essential for vertebrate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 354 72-76.

King WA, Niar A, Chartrain I, Betteridge KJ & Guay P 1988 Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos. *J Reprod Fertil* 82 87-95.

Kopecny V, Flechon JE, Camous S & Fulka J, Jr. 1989 Nucleologenesi s and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. *Mol Reprod Dev* 1 79-90.

Lodde V, Modina S, Galbusera C, Franciosi F & Luciano AM 2007a Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. *Mol Reprod Dev* 74 740-749.

Lodde V, Modina S, Maddox-Hyttel P, Franciosi F, Lauria A & Luciano AM 2007b Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. *Mol Reprod Dev*.

Martin C, Beaujean N, Brochard V, Audouard C, Zink D & Debey P 2006 Genome restructuring in mouse embryos during reprogramming and early development. *Dev Biol* 292 317-332.

McGraw S, Robert C, Massicotte L & Sirard MA 2003 Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biol Reprod* 68 383-389.

McGraw S, Vigneault C & Sirard MA 2007 Temporal expression of factors involved in chromatin remodeling and in gene regulation during early bovine in vitro embryo development. *Reproduction* 133 597-608.

Memili E, Dominko T & First NL 1998 Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 51 36-41.

Memili E & First NL 2000 Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8 87-96.

Minami N, Suzuki T & Tsukamoto S 2007 Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *J Reprod Dev* 53 707-715.

Nakayasu H & Berezney R 1991 Nuclear matrins: identification of the major nuclear matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 10312-10316.

Natale DR, Kidder GM, Westhusin ME & Watson AJ 2000 Assessment by differential display-RT-PCR of mRNA transcript transitions and alpha-amanitin sensitivity during bovine preattachment development. *Mol Reprod Dev* 55 152-163.

Philimonenko VV, Flechon JE & Hozak P 2001 The nucleoskeleton: a permanent structure of cell nuclei regardless of their transcriptional activity. *Exp Cell Res* 264 201-210.

Prather RS, Sims MM, Maul GG, First NL & Schatten G 1989 Nuclear lamin antigens are developmentally regulated during porcine and bovine embryogenesis. *Biol Reprod* 41 123-132.

Prather RS & Schatten G 1992 Construction of the nuclear matrix at the transition from maternal to zygotic control of development in the mouse: an immunocytochemical study. *Mol Reprod Dev* 32 203-208.

Razin SV, Iarovaia OV, Sjakste N, Sjakste T, Bagdoniene L, Rynditch AV, Eivazova ER, Lipinski M & Vassetzky YS 2007 Chromatin domains and regulation of transcription. *J Mol Biol* 369 597-607.

Rozen S & Skaletsky HJ 2000 Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386 (Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).

Ruddock-D'Cruz NT, Xue J, Wilson KJ, Heffernan C, Prashadkumar S, Cooney MA, Sanchez-Partida LG, French AJ & Holland MK 2008 Dynamic changes in the localization of five members of the methyl binding domain (MBD) gene family during murine and bovine preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev* 75 48-59.

Segev H, Memili E & First NL 2001 Expression patterns of histone deacetylases in bovine oocytes and early embryos, and the effect of their inhibition on embryo development. *Zygote* 9 123-133.

Telford NA, Watson AJ & Schultz GA 1990 Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26 90-100.

Vassetzky Y, Hair A & Mechali M 2000 Rearrangement of chromatin domains during development in *Xenopus*. *Genes Dev* 14 1541-1552.

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.

Wang Q & Latham KE 2000 Translation of maternal messenger ribonucleic acids encoding transcription factors during genome activation in early mouse embryos. *Biol Reprod* 62 969-978.

Zhang Z & Carmichael GG 2001 The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell* 106 465-475.

Zheng P, Patel B, McMenamin M, Paprocki AM, Schramm RD, Nagl NG, Jr., Wilsker D, Wang X, Moran E & Latham KE 2004 Expression of genes encoding chromatin regulatory factors in developing rhesus monkey oocytes and preimplantation stage embryos: possible roles in genome activation. *Biol Reprod* 70 1419-1427.

Zurita M, Reynaud E & Aguilar-Fuentes J 2007 From the beginning: the basal transcription machinery and onset of transcription in the early animal embryo. *Cell Mol Life Sci*.

6.9 TABLES

Table 6.1. Oligos used for quantitative RT-PCR and siRNAs production

Oligos		Sequences (5'-3')
Matrin3	Forward	AAAGTGGCAGTTCAGTGGGAGA
	Reverse	TCTTTGCAGCTCCAGAAGCACT
GAPDH	Forward	ATGCTGGTGCTGAGTATGTAGTGG
	Reverse	AGAAGCAGGGATGATATTCTGGGC
H2A.1	Forward	GCGACAACAAGAAGACCCGTATCA
	Reverse	GCCTTATGGTGACTCTCGGTTT
GFP	Forward	CCACAAGTTCAGCGTGTCC
	Reverse	GTGCTGCTTCATGTGGTGGG
MATRIN 3 siRNA	Antisense	AACCATGGAAGTCGTTCTCAACCTGTCTC
	Sense	AATTGAGAACGACTTCCATGGCCTGTCTC

Table 6.1. Nucleotide sequences underlined correspond to the priming site of the T7 promoter oligos used to produce the template in the siRNA Construction Kit. Antisense and sense annotations correspond to the siRNA strand produced with this oligo.

Table 6.2. Survival and blastocyst development rates of GV oocytes microinjected

Treatment	No. Oocytes	Survival rate (%)	Blastocyst development (%)
Non-Injected	160	100.0 ± 0.0 ^a	35.3 ± 13.6 ^a
Neg Ctrl siRNA	258	80.2 ± 4.2 ^b	25.1 ± 12.8 ^a
MATRIN 3 siRNA	209	82.0 ± 5.0 ^b	1.8 ± 2.3 ^b

Table 6.2. Survival rate was evaluated at the zygotic stage and dead embryos were discarded for subsequent culture and blastocyst development assessment. Different letters indicate significant differences ($p < 0.001$).

6.10 FIGURES

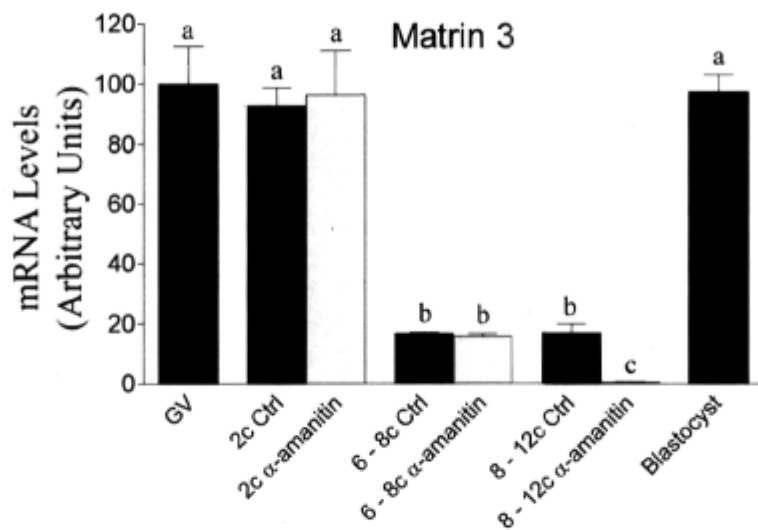


Figure 6.1. Quantification of the mRNA profile of *MATRIN 3* by real-time RT-PCR throughout bovine early development. Stages are represented below histograms: GV = GV oocytes, 2c, 6-8c and 8-12c represent embryos collected 32, 55 and 90 hpf respectively. Dark histograms represent control embryos while light grey histograms correspond to α -amanitin treated embryos. Messenger RNA level measurement at each developmental stage was done in triplicate (three different pools) and the amount of mRNA displayed represent the mean \pm SEM of each transcript corrected with the *GFP* value obtained for each pool. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.001$).

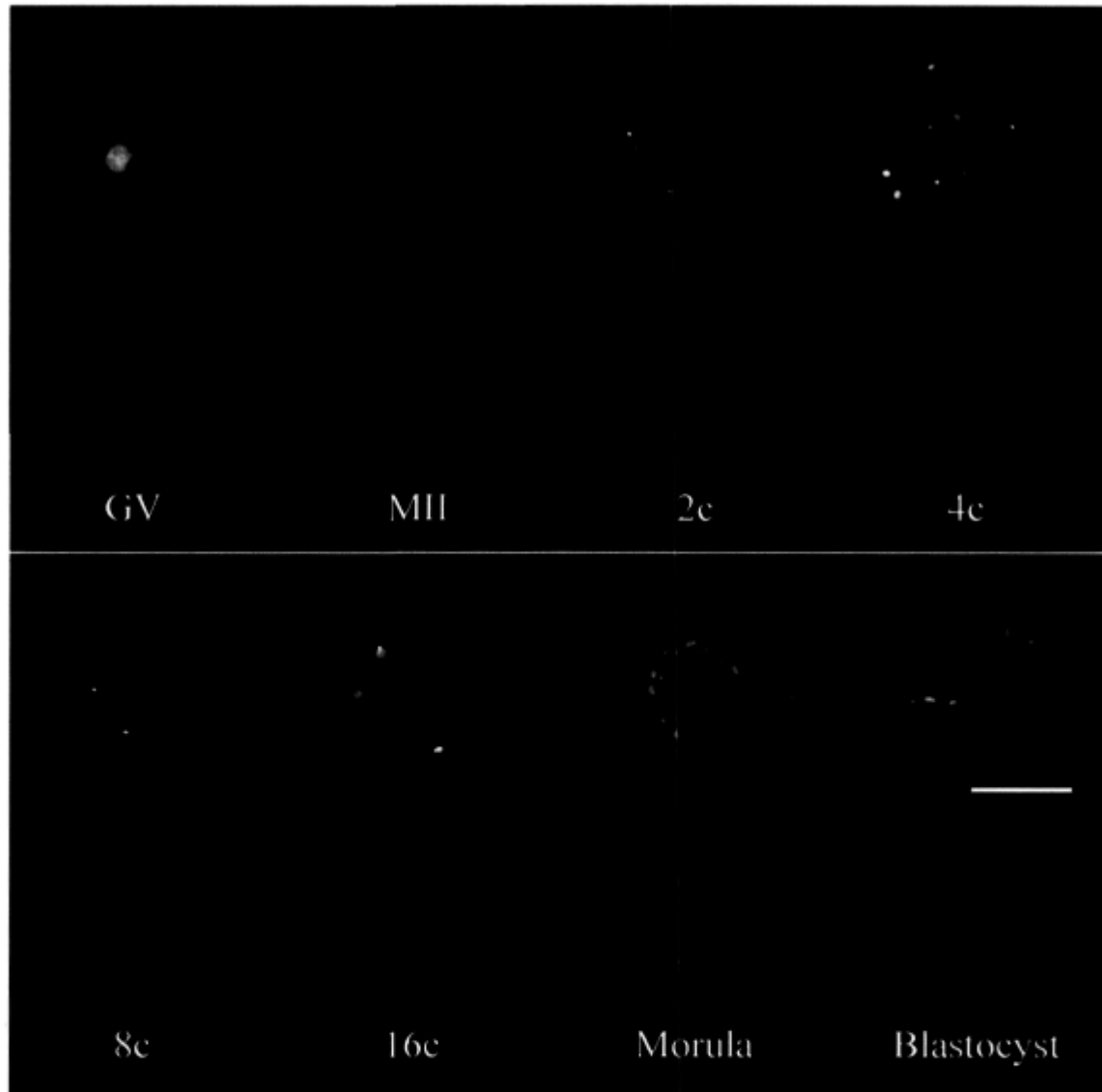


Figure 6.2. Immunolocalization of MATRIN 3 in oocytes and early embryos. Confocal representation of oocytes (GV and MII) and embryos (2-, 4-, 8-, 16-cell, morulae and blastocyst) stained in green with anti-*MATRIN 3* antibody and in red with propidium iodide to visualize the DNA. Magnification x600. Scale bar = 100 μ M.

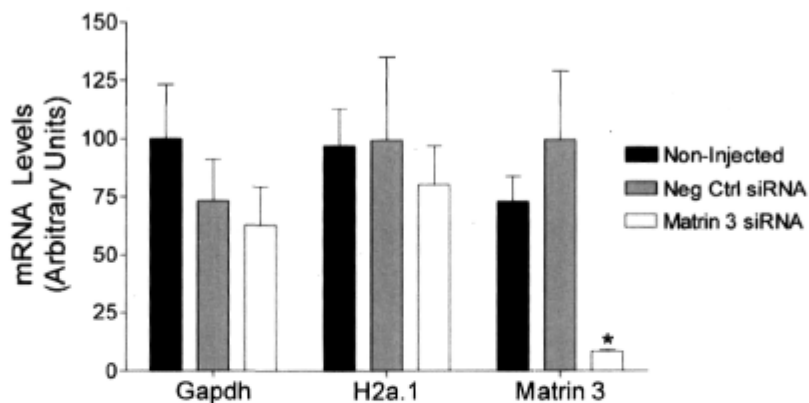


Figure 6.3. Quantification of *MATRIN 3*, *Gapdh* and *H2a.1* mRNA levels in 1-cell embryos following each siRNA treatment: derived from non-injected oocytes (Black histograms), oocytes injected with non-targeting siRNA (grey histograms) and oocytes microinjected with siRNA against *MATRIN 3* mRNA (white histograms). Messenger RNA level measurement at each developmental stage was done in triplicate (three single embryos). Bars represent the amount of mRNA (mean \pm SEM) of each transcript corrected with the *GFP* value obtained for each embryo. Asterisk (*) indicates a significant difference ($P < 0.05$).

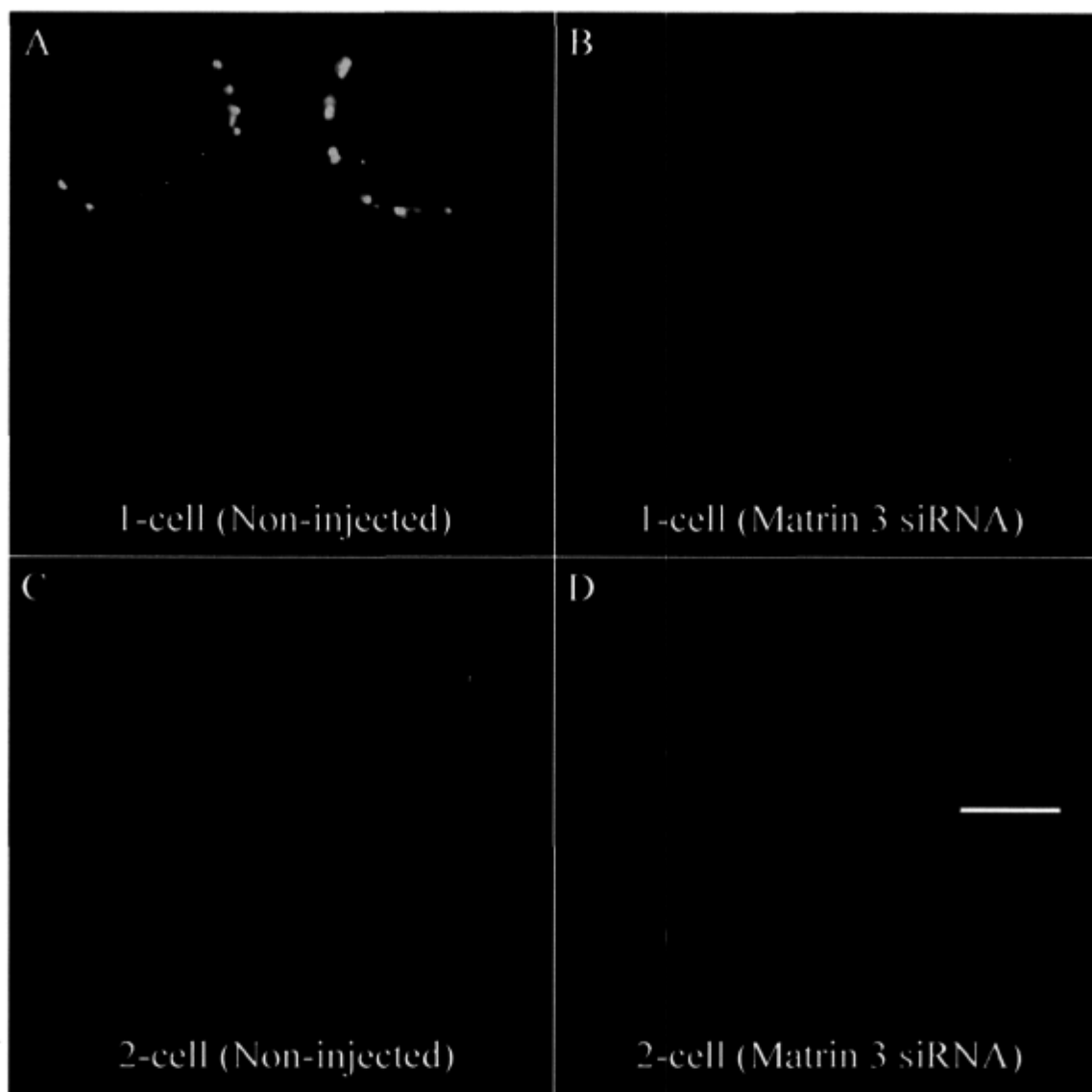


Figure 6.4. Immunolocalization of MATRIN 3 following microinjection of siRNA. 1-cell (A and B) and 2-cell stage (C and D) embryos produced by maturation and fertilization of control GV oocytes non-injected (A and C) and GV oocytes microinjected with siRNAs against *MATRIN 3* (B and D) are displayed. Embryos were stained in green with anti-MATRIN 3 antibody and in red with propidium iodide to visualize the DNA. Magnification x600. Scale bar = 100 μ M.

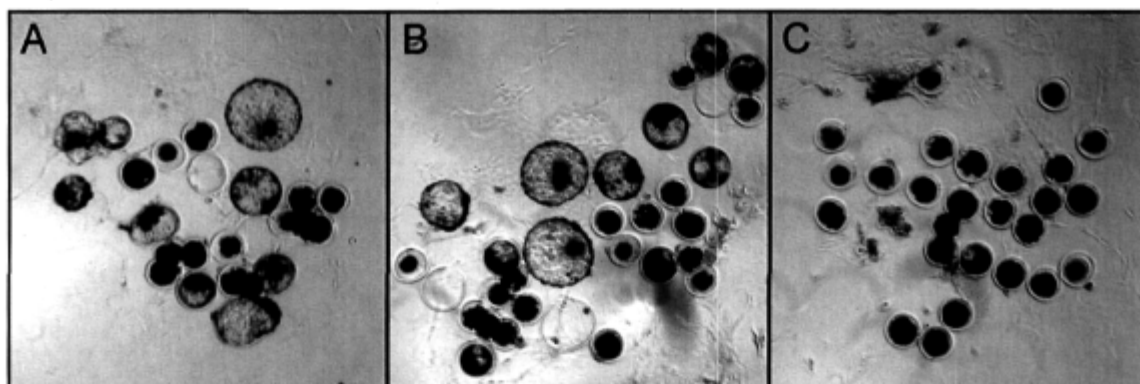


Figure 6.5. Representative culture droplets of each siRNA treatment: control (non-injected) embryos (A) and embryos following microinjection of negative control siRNA (B) or *MATRIN 3* siRNA (C).

CHAPITRE VII : CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Tout au long du premier chapitre de cette thèse, il est démontré qu'afin de se préparer à produire un embryon de bonne qualité, l'ovocyte passe par une multitude d'étapes au cours de sa croissance et de sa maturation. Toutefois, seulement une portion de ces ovocytes acquiert cette aptitude à produire un embryon viable que l'on désigne comme étant la compétence au développement (Sirard, 2001). L'implication de l'ovocyte dans la formation de l'embryon est majeure puisqu'il n'agit pas qu'à titre de simple vecteur fournissant la moitié du bagage génétique de l'embryon. Il doit, par exemple, procurer tout le matériel nécessaire à la formation du zygote suite à la fécondation, mais de plus, il a la tâche de supporter à lui seul les premiers stades embryonnaires en fournissant ARNm et protéines au jeune embryon. Cet approvisionnement en ARNm et protéines que procure l'ovocyte à l'embryon est essentiel puisque la transcription du génome de l'embryon est pratiquement éteinte lors des premiers cycles cellulaires et n'est activée fortement qu'aux stades 8- à 16-cellules chez le bovin (Camous *et al.*, 1986, King *et al.*, 1988, Frei *et al.*, 1989, Kopecny *et al.*, 1989, Telford *et al.*, 1990). C'est donc à ce moment que survient la substitution des réserves maternelles d'ARNm par de nouveaux ARNm embryonnaires; une étape cruciale intitulée la transition maternelle embryonnaire (MET).

Le travail derrière cette thèse avait donc comme objectif général d'étudier cette activation du génome embryonnaire chez le bovin dans le but de mieux comprendre ce qui se produit lors de cette étape déterminante dans la vie du jeune embryon et d'identifier des facteurs impliqués dans ce processus. L'hypothèse générale derrière notre travail était que l'ovocyte contient sous forme d'ARNm et/ou protéique, les facteurs ou régulateurs de transcription participant à l'activation majeure de la transcription dans l'embryon 8-cellules bovin.

Il est bien connu que ce sont les protéines qui sont responsables de l'action d'un gène et non l'ARNm. Cependant, du point de vue technique, l'étude des protéines dans les ovules et les embryons est beaucoup plus fastidieuse en coûts et en énergie. En effet, cela

nécessite des quantités astronomiques de cellules et exige bien souvent de posséder un anticorps fonctionnel, sensible et spécifique contre la protéine d'intérêt, ce qui peut être spécialement difficile chez le bovin puisque la majorité des anticorps développés commercialement sont dirigés contre des antigènes humains ou murins. Ainsi, l'utilisation des techniques de biologie moléculaire telles le PCR quantitatif ou les hybridations de biopuces permettent d'effectuer un certain défrichage plus rapide et à moindre coût pour ensuite identifier des cibles potentielles pour une étude plus raffinée. C'est par conséquent l'approche que nous avons utilisée.

Dans notre première étude décrite au chapitre II, nous avons utilisé le PCR quantitatif pour évaluer la présence de quinze facteurs et régulateurs de transcription dans l'embryon bovin en couvrant la période embryonnaire allant de l'ovocyte immature jusqu'au blastocyste. La stratégie utilisée était une approche gène candidat et visait spécifiquement des gènes ayant démontrés leur possible implication dans la MET chez d'autres espèces telles *Xenopus* ou la souris. Nous étions donc intéressés dans un premier temps de vérifier la présence des transcrits correspondant à ces gènes dans nos embryons pré-MET afin d'évaluer la possibilité que la régulation de la MET chez le bovin puisse se faire via un processus similaire à ce qui est observé chez d'autres espèces. Nos résultats ont démontré la présence à des niveaux plus ou moins élevés de tous les transcrits étudiés dans les ovocytes et les embryons pré-MET. À la lumière de cette étude et de nos spéculations suite à l'analyse des profils d'ARNm des différent transcrits, nous avons choisi quelques gènes intéressants susceptibles de jouer un rôle dans la MET bovine : *ATF2*, *TBP*, *MSY2* et *HMGN2*.

Avec l'utilisation d'anticorps, nous avons évalué le profil des niveaux protéiques de ces gènes par immunobuvardage ainsi que leur localisation par immunocytochimie et microscopie confocale. Les résultats présentés aux chapitres III et V démontrent la présence protéique de tous ces facteurs dans les jeunes embryons bovins. Nos observations ont confirmé l'existence chez le bovin de mécanismes semblables à ceux présents chez l'embryon murin, et ce malgré que la MET se produise dans l'embryon 2-cellules chez cette espèce (Nothias *et al.*, 1995). Dans le cas de *MSY2*, sa forte présence jusqu'à

l'activation du génome s'est avérée importante chez la souris pour l'entreposage et la répression des réserves d'ARNm maternels dans l'ovocyte pour éviter leur traduction ou leur dégradation prématurée (Yu *et al.*, 2001, Yu *et al.*, 2004). Un scénario analogue a été observé chez l'embryon bovin puisqu'une très forte présence de *MSY2* a été détectée seulement dans les embryons pré-MET (Chapitre III). Cela suggère donc fortement la conservation du mécanisme de protection des ARNm maternels par l'entremise de *MSY2* dans les jeunes embryons chez le bovin. Cette théorie va dans le sens de notre hypothèse générale suggérant que l'embryon doit recourir à l'utilisation de ses réserves maternelles d'ARNm afin de produire des protéines essentielles dans le processus d'initiation de la MET. *MSY2* agirait donc à titre de protecteur ou de gardien de ces ARNm chez le bovin pendant les premiers jours du développement embryonnaire, et ce afin que les ARNm nécessaires ne soit relâchés qu'au temps voulu pour l'induction de leur traduction.

Les résultats que nous avons obtenus concernant la protéine TBP renforcent l'idée proposée dans le paragraphe précédent. En effet, *TBP* illustrent bien le cas précis d'un gène présent presque exclusivement sous forme d'ARNm dans l'ovocyte et par la suite, à mesure que l'on procède vers les stades embryonnaire plus avancés, nous assistons à une diminution de ces niveaux d'ARNm pour les voir remplacés par la protéine TBP elle-même (Chapitre III). Le cas de *TBP* soulève donc la possibilité que le silence transcriptionnel observé chez les très jeunes embryons soit en partie expliqué par l'absence de certains facteurs clés. Ces derniers feraient leur apparition au moment opportun pour enclencher l'activation du génome de l'embryon, c'est-à-dire, lorsque les réserves ovocytaires sont épuisées.

Une constatation très importante que nous pouvons effectuer suite à ces expériences d'expression spatio-temporelle des protéines est que les profils des niveaux d'ARNm et de protéines peuvent diverger considérablement au cours du développement embryonnaire. Bien que nous n'avons regardé l'expression protéique que d'un nombre limité de gènes (Chapitre III), nous avons obtenus des relations complètement différentes entre les patrons d'ARNm et protéiques. Cela démontre bien l'importance d'approfondir l'étude des transcrits au niveau protéique avant de pouvoir tirer des conclusions fiables quant à la

possible fonction d'un gène suite à la caractérisation de son profil d'ARNm dans les embryon pré-MET. J'ai spécifié dans les embryons pré-MET car il y a une différence capitale entre la dynamique ARNm/protéine retrouvée dans un embryon pré-MET et un embryon post-MET. En effet, étant donné son silence transcriptionnel, l'embryon pré-MET contient de grandes réserves d'ARNm pour produire certaines protéines nécessaires pendant les premières étapes de sa vie. Par contre le haut niveau d'ARNm mesuré pendant ces stades précis ne veut aucunement signifier que les protéines pour lesquelles ils encodent sont actives ou présentes. Je crois même que le contraire est plus plausible dans le sens que lorsque nous assistons à une baisse soudaine des niveaux d'ARNm pendant la croissance de l'embryon pré-MET, ceci peut être un indicateur que les réserves maternelles sont en cours d'utilisation pour leur traduction en protéines comme cela semble être le cas pour *TBP* (Chapitre III). À l'opposé, suite à la MET, l'embryon bovin peut désormais transcrire au fur et à mesure les gènes dont il a besoin et ainsi, une relation plus étroite entre les niveaux d'ARNm et l'activité du gène est envisageable car le maintien de grandes quantités d'ARNm en réserve sans leur traduction en protéines est moins probable.

Bien que le fait d'investiguer la présence protéique d'un gène et sa localisation donne plus d'information sur son implication probable dans le développement embryonnaire, cela ne permet encore que d'émettre des conclusions spéculatives sur sa fonction. C'est pourquoi des techniques telles le « knockout » sont utilisées à grande échelle pour étudier les effets de la perte de fonction d'une protéine, ce qui génère des données très informatives sur la fonctionnalité du gène étudié. Cependant, il est très peu envisageable d'utiliser le « knockout » afin d'étudier le rôle d'un gène dans l'embryon bovin puisque les investissements demandés en temps et en argent pour générer de tels animaux sont bien trop élevés. La technique d'interférence d'ARN (RNAi) procure donc une belle alternative au « knockout » pour l'inhibition de l'expression d'un gène. Elle fut adaptée et appliquée pour la première fois chez l'ovocyte bovin dans notre propre laboratoire (Paradis *et al.*, 2005). Cependant, cette technique bien que très efficace s'est avérée très limitante puisqu'elle impliquait la micro-injection d'ARN interférentiels (ARNi) dans des ovocytes dénudés. Le fait de dénuder des ovocytes avant la maturation engendre des effets très néfastes sur la maturation de ces ovocytes et diminue

considérablement leur compétence au développement (Fukui & Sakuma, 1980, Yamazaki *et al.*, 2001, Luciano *et al.*, 2005). Pour contourner ces problèmes nous aurions pu injecter nos ARNi ciblant notre gène d'intérêt dans l'embryon 1-cellule dénudé sauf que cette technique amène elle aussi ses propres limitations. En effet, des études préalables faites entre autre dans notre laboratoire, ont démontré qu'une multitude d'ARNm maternels sont traduits très tôt dans la maturation de l'ovocyte ou dans les premiers stades embryonnaires (Coenen *et al.*, 2004, Massicotte *et al.*, 2006). Ainsi, puisque nous voulions étudier la fonction de gènes maternels, il fallait trouver une façon de dégrader l'ARNm par RNAi avant que les transcrits ne soient traduits et ce sans nuire au développement embryonnaire. C'est pourquoi de grands efforts ont été mis en place pour développer une méthode permettant la micro-injection de ARNi dans les ovocytes immatures, sans toutefois les dénuder de leurs cellules de cumulus environnantes afin de ne pas induire d'effets collatéraux indésirables (Chapitre V). Nos travaux ont donc permis l'élaboration d'une méthode très efficace pour étudier la fonction de gènes spécifiques dans le développement embryonnaire bovin. De plus, cette technique exige des investissements en temps et en argent très limités en comparaison au « knockout ».

Bien que l'hypothèse que plusieurs facteurs nécessaires à l'embryon seraient emmagasinés sous forme d'ARNm dans l'ovocyte semble bien plausible, l'identification de ces derniers autrement que par l'approche gène candidat s'avère ardue. En effet, l'ovocyte qui a atteint la fin de sa phase de croissance contient une abondance de transcrits assez hors du commun. Très rares sont les transcrits qui se sont avérés être absents de l'ovocyte dans les très nombreuses expériences menées, entre autre, dans notre laboratoire (Robert *et al.*, 2002b, McGraw *et al.*, 2003, Vigneault *et al.*, 2004, Tremblay *et al.*, 2005, Vallee *et al.*, 2005, McGraw *et al.*, 2006a, McGraw *et al.*, 2007). Lors d'études préliminaires effectuées durant mes études doctorales (données non publiées), l'hybridation de biopuces commerciales enrichies en régulateurs de transcription a démontré la présence probable de près de mille facteurs de transcription dans l'ovocyte bovin sous forme d'ARNm. Ce ne sont cependant pas tous ces transcrits qui seront traduits et plusieurs seront ainsi tout simplement dégradés. Il est donc impossible d'envisager la caractérisation systématique de tous les transcrits ovocytaires codant pour des régulateurs de transcription en espérant

mettre la main sur ceux qui sont des facteurs clés dans l'activation du génome. Une méthode permettant d'identifier les ARNm maternels traduits et non seulement dégradés pourrait réduire considérablement la liste de gène à étudier. Les travaux en cours dans le laboratoire du Dr Claude Robert (Université Laval) cherchent à permettre une telle identification. Il sera ainsi possible d'identifier la population d'ARNm traduits à des moments spécifiques du développement embryonnaires. Bien que cette avenue semble très prometteuse, elle en est encore à l'étape de mise au point. C'est pourquoi nous avons dirigés nos efforts vers l'étude d'un autre aspect de l'activation du génome embryonnaire : son transcriptome.

Tout comme les mécanismes activant la MET, les événements en découlant étaient encore bien mal établis chez le bovin. La plupart des rapports ayant étudié l'activation du génome embryonnaire bovin se sont concentrés sur la détection de transcription dans les noyaux des embryons par autoradiographie (Camous *et al.*, 1986, King *et al.*, 1988, Frei *et al.*, 1989, Kopecny *et al.*, 1989). Seulement deux études ont récemment étudié l'apparition des gènes nouvellement transcrits dans les embryons 8-cellules bovins (Natale *et al.*, 2000b, Misirlioglu *et al.*, 2006). Cependant, bien qu'ayant produit des résultats intéressants, l'impact de ces deux études fut limité en raison des techniques utilisées. En effet, la sensibilité de la technique utilisée par Natale *et al.* manque de sensibilité et donc, un nombre minime de transcrits a pu être identifié alors que la deuxième étude a fait appel à l'hybridation de lames de microarray commerciales non enrichies en transcrits embryonnaires ce qui limite la quantité et la qualité des transcrits identifiés. L'amélioration des techniques de biologie moléculaire nous a donc permis d'identifier plus de 300 gènes transcrits *de novo* dans le jeune embryon bovin à la MET (Chapitre IV). Ce qui est intéressant de noter, c'est la nature des transcrits isolés puisqu'une très grande proportion est impliquée dans la transcription soit au niveau de la liaison à l'ADN et l'activation de la transcription proprement dite ou bien dans le maniement des ARNm suite à leur transcription. Cette observation concorde avec l'idée que les embryons 8- à 16-cellules deviennent autonomes et doivent transcrire les gènes importants pour le bon développement de l'embryon jusqu'au stade de blastocyste.

L'embryon post-MET est composé de cellules pluripotentes et le maintien de ces cellules dans cet état de pluripotence requiert une multitude de différents acteurs. *OCT-4* et *NANOG* sont parmi les gènes clés impliqués dans ce maintien de la pluripotence qui sont les mieux caractérisés (revu dans Johnson *et al.*, 2006). Cependant, encore aujourd'hui, bien peu est connu sur les autres gènes agissant en amont, en aval ou en synergie avec ces facteurs. L'analyse de notre librairie du transcriptome de l'embryon bovine à la MET a permis de déceler la présence de plusieurs facteurs de transcription (*ZFP42*, *GABPA*, *TPT1* et *KLF4*) susceptibles de jouer un rôle dans le maintien de la pluripotence chez l'embryon (Chapitre IV). L'utilisation de cette banque de transcrits comme outil d'étude pour suivre la reprogrammation cellulaire lors de clonage pourrait donc s'avérer très utile. C'est d'autant plus vrai que le modèle bovin est le modèle de choix pour l'étude de la reprogrammation cellulaire suite au clonage puisque des taux de succès plus élevés sont observés chez cette espèce, mais surtout, la fenêtre de temps entre la fusion de la cellule somatique à l'ovocyte et l'activation du génome est beaucoup plus grande chez le bovin que chez la souris par exemple, où la MET se produit après seulement 1 cycle cellulaire. Ceci permet une meilleure décortication des événements de reprogrammation du noyau somatique vers un état pluripotent et facilite l'étude de l'activation du génome de ce nouvel embryon. Ainsi, le suivi de l'expression de différents facteurs de notre librairie dans les embryons produits par clonage pourrait permettre d'établir le niveau de reprogrammation de ces embryons et ainsi permettre le raffinement des techniques de clonage.

Nous croyons que l'ajout de notre librairie à la biopuce « BlueChip », contenant déjà des transcrits spécifiques à l'ovocyte et au blastocyste (Sirard *et al.*, 2005), deviendra un outil extrêmement puissant pour l'étude du développement embryonnaire. Il est bien établi que des méthodes de culture inadéquates induisent des modifications de l'expression génique chez l'embryon (Wrenzycki *et al.*, 2005) et des conséquences néfastes sur la qualité des embryons produits (Rizos *et al.*, 2002c). Notre librairie pourra donc être utilisée dans l'étude de l'impact des différentes méthodes de culture embryonnaire sur l'expression génique chez l'embryon dans le but d'améliorer nos techniques afin de se rapprocher de la situation rencontrée *in vivo*. Jusqu'à ce jour, la grande majorité des études qui ont mesuré l'expression des gènes en relation avec les différentes méthodes de culture ont été

effectuées au stade blastocyste (Wrenzycki *et al.*, 2001, Rizos *et al.*, 2002b, Rizos *et al.*, 2003, Corcoran *et al.*, 2006). Bien que très informatives, ces études sont davantage représentatives du portrait final résultant d'une mauvaise culture embryonnaire et ne donnent pas nécessairement d'information sur les gènes en amont qui peuvent être en cause dans certains de ces dérèglements. Dès que l'embryon devient transcriptionnellement actif, suite à la MET, il est apte à répondre aux divers stimuli de son environnement. Dès ce moment, si un problème est rencontré, des anomalies transcriptionnelles devraient se produire et certaines de ces aberrations pourraient être en cause dans les défauts observés plus tard au niveau du blastocyste. Le fait que l'embryon 8-cellules bovin exprime autant de gènes impliqués dans la régulation de la transcription supporte cette hypothèse. L'identification de premiers transcrits à démontrer une expression aberrante à la MET pourrait éventuellement permettre de démasquer des mécanismes sous-jacents à ces dérèglements et donner des pistes sur les carences de nos méthodes de culture.

Enfin, le chapitre VI de cette thèse démontre l'utilisation des méthodologies développées lors des chapitres précédents afin de caractériser le rôle d'un gène, *MATRIN 3*, issu de notre librairie décrite au chapitre IV. Ce constituant majeur de la matrice nucléaire semble jouer un rôle crucial dans le développement embryonnaire puisque l'inhibition de son expression par micro-injection de RNAi provoque un arrêt du développement embryonnaire. La cause exacte de cette mortalité embryonnaire est inconnue sauf que l'hypothèse d'une défaillance majeure dans l'initiation de la transcription causée par l'absence de *MATRIN 3* semble bien plausible. Si tel en est le cas, cela signifierait que la matrice nucléaire pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'activation du génome et dans la transcription embryonnaire. Une autre observation supportant cette idée est le fait que *MATRIN 3* n'est pas le seul constituant de la matrice nucléaire exprimé à la MET chez le bovin car plusieurs « heterogeneous nuclear ribonucleoprotein » (*hnRNP A2/B1, G, AB, H1, A1, U, D-like* et *F*) ont été identifiés dans notre librairie enrichie de transcrits exprimés à la MET (Chapitre IV). Les hnRNPs sont associées à la matrice nucléaire (He *et al.*, 1991, Mattern *et al.*, 1996) et selon le type, régulent la transcription ou participent aux différentes facettes de la manipulation des ARNm suite à leur transcription (revu dans Krecic & Swanson, 1999). La très grande variété de hnRNPs exprimé à la MET soutient donc l'idée

de l'importance du rôle de la matrice nucléaire dans l'activation du génome embryonnaire et ce concept devra faire l'objet d'études plus poussées afin d'être validé.

Les résultats présentés dans cette thèse procurent de nouvelles connaissances au sujet de la transition maternelle embryonnaire chez le bovin. Notre librairie contenant une grande diversité de gènes exprimés à la MET fournit une liste très intéressante de candidats pouvant lancer de nouveaux projets de recherche afin de mieux comprendre les événements moléculaire amenant le jeune embryon vers le stade de blastocyste. Notre méthode de micro-injection de siRNA dans les ovocytes immature pourrait s'avérer très utile dans l'étude de la fonction de ces gènes. L'étude de ces gènes fournira une meilleure compréhension de cette période cruciale du développement embryonnaire qu'est la MET et cela s'avère nécessaire pour l'amélioration des méthodes de culture embryonnaire.

7.1 RÉFÉRENCES

Camous S, Kopecny V & Flechon JE 1986 Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo. *Biol Cell* 58 195-200.

Coenen K, Massicotte L & Sirard MA 2004 Study of newly synthesized proteins during bovine oocyte maturation in vitro using image analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Mol Reprod Dev* 67 313-322.

Corcoran D, Fair T, Park S, Rizos D, Patel OV, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ, Boland MP, Evans AC et al. 2006 Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction* 131 651-660.

Frei RE, Schultz GA & Church RB 1989 Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J Reprod Fertil* 86 637-641.

Fukui Y & Sakuma Y 1980 Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol Reprod* 22 669-673.

He DC, Martin T & Penman S 1991 Localization of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein in the interphase nuclear matrix core filaments and on perichromosomal filaments at mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 7469-7473.

Johnson BV, Rathjen J & Rathjen PD 2006 Transcriptional control of pluripotency: decisions in early development. *Curr Opin Genet Dev* 16 447-454.

King WA, Niar A, Chartrain I, Betteridge KJ & Guay P 1988 Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos. *J Reprod Fertil* 82 87-95.

Kopecny V, Flechon JE, Camous S & Fulka J, Jr. 1989 Nucleologenesi and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. *Mol Reprod Dev* 1 79-90.

Krecic AM & Swanson MS 1999 hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* 11 363-371.

Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A & Modena S 2005 Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. *Mol Reprod Dev* 71 389-397.

- Massicotte L, Coenen K, Mourot M & Sirard MA 2006 Maternal housekeeping proteins translated during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Proteomics* 6 3811-3820.
- Mattern KA, Humbel BM, Muijsers AO, de Jong L & van Driel R 1996 hnRNP proteins and B23 are the major proteins of the internal nuclear matrix of HeLa S3 cells. *J Cell Biochem* 62 275-289.
- McGraw S, Robert C, Massicotte L & Sirard MA 2003 Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biol Reprod* 68 383-389.
- McGraw S, Vigneault C, Tremblay K & Sirard MA 2006 Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. *Mol Reprod Dev* 73 692-699.
- McGraw S, Vigneault C & Sirard MA 2007 Temporal expression of factors involved in chromatin remodeling and in gene regulation during early bovine in vitro embryo development. *Reproduction* 133 597-608.
- Misirlioglu M, Page GP, Sagirkaya H, Kaya A, Parrish JJ, First NL & Memili E 2006 Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 18905-18910.
- Natale DR, Kidder GM, Westhusin ME & Watson AJ 2000 Assessment by differential display-RT-PCR of mRNA transcript transitions and alpha-amanitin sensitivity during bovine preattachment development. *Mol Reprod Dev* 55 152-163.
- Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ & DePamphilis ML 1995 Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J Biol Chem* 270 22077-22080.
- Paradis F, Vigneault C, Robert C & Sirard MA 2005 RNA interference as a tool to study gene function in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 70 111-121.
- Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J & Gutierrez-Adan A 2002a Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod* 66 589-595.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP & Lonergan P 2002b Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61 234-248.
- 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.

Robert C, McGraw S, Massicotte L, Pravetoni M, Gandolfi F & Sirard MA 2002 Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. *Biol Reprod* 67 1465-1472.

Sirard MA 2001 Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55 1241-1254.

Sirard MA, Dufort I, Vallee M, Massicotte L, Gravel C, Reghenas H, Watson AJ, King WA & Robert C 2005 Potential and limitations of bovine-specific arrays for the analysis of mRNA levels in early development: preliminary analysis using a bovine embryonic array. *Reprod Fertil Dev* 17 47-57.

Telford NA, Watson AJ & Schultz GA 1990 Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26 90-100.

Tremblay K, Vigneault C, McGraw S & Sirard MA 2005 Expression of cyclin B1 messenger RNA isoforms and initiation of cytoplasmic polyadenylation in the bovine oocyte. *Biol Reprod* 72 1037-1044.

Vallee M, Gravel C, Palin MF, Reghenas H, Stothard P, Wishart DS & Sirard MA 2005 Identification of novel and known oocyte-specific genes using complementary DNA subtraction and microarray analysis in three different species. *Biol Reprod* 73 63-71.

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.

Wrenzycki C, Herrmann D, Keskindepe L, Martins A, Jr., Sirisathien S, Brackett B & Niemann H 2001 Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod* 16 893-901.

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 Dev* 17 23-35.

Yamazaki Y, Wakayama T & Yanagimachi R 2001 Contribution of cumulus cells and serum to the maturation of oocyte cytoplasm as revealed by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Zygote* 9 277-282.

Yu J, Hecht NB & Schultz RM 2001 Expression of MSY2 in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol Reprod* 65 1260-1270.

Yu J, Deng M, Medvedev S, Yang J, Hecht NB & Schultz RM 2004 Transgenic RNAi-mediated reduction of MSY2 in mouse oocytes results in reduced fertility. *Dev Biol* 268 195-206.

“It ain't about how hard you hit. It's about how hard you can get it and keep moving forward. How much you can take and keep moving forward. That's how winning is done!” -R.B.