UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : Santé, Science, Technologie

Équipe :

Follicule, Ovocyte et Développement, INRA, Nouzilly

THÈSE présentée par :

Abdulrahman AL DARWICH

Soutenue le : **16 décembre 2009**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Science de la vie / Biologie de la reproduction

Métabolisme lipidique et cryorésistance des embryons dans l'espèce bovine

THÈSE dirigée par :

Mr Pascal MERMILLOD	Ingénieur de Recherche HDR, INRA, Nouzilly
Mme Florence GUIGNOT	Ingénieur de Recherche, PhD, INRA, Nouzilly

RAPPORTEURS :

Mr Thierry JOLY	HDR, Maître de Conférences, ISARA, Lyon
Mr Jo LEROY	DVM, PhD, Professeur, Université d'Anvers

JURY :

Mme Joëlle DUPONT	Directeur de Recherche, INRA, Nouzilly
Mme Nicole HAGEN-PICARD	Professeur, ENVT, Toulouse
Mr Thierry JOLY	HDR, Maître de Conférences, ISARA, Lyon
Mr Jo LEROY	DVM, PhD, Professeur, Université d'Anvers
Mr Pascal MERMILLOD	Ingénieur de Recherche, HDR, INRA, Nouzilly
Mr Dominique ROYERE	Professeur, Université François Rabelais,Tours

TABLES DES MATIERES

ABREVIATIONS 3
LISTE DES TABLEAUX 6
LISTE DES FIGURES 7
INTRODUCTION
Introduction générale 9
CHAPITRE I : De l'ovocyte à l'embryon 11
1. La maturation de l'ovocyte 11
1.1. Reprise de la méiose et maturation nucléaire 11
1.2. La maturation cytoplasmique 12
1.3. La maturation moléculaire 12
2. La fécondation et le développement embryonnaire précoce 13
3. La compétence au développement de l'ovocyte 14
4. L'expression génique dans l'embryon 16
4.1. Les facteurs maternels 16
4.2. L'activation du génome embryonnaire 16
5. Influence du système de culture des ovocytes et des embryons 17
CHAPITRE II : Les Lipides – Notions générales 19
1. Les acides gras 19
1.1. Structure, nomenclature et propriétés des acides gras 19
1.2. La synthèse des acides gras 20
1.3. La β-oxydation ou lipolyse des acides gras 21
1.4. L'estérification des acides gras : synthèse des triglycérides et des phospholipides .. 22
2. Les acides gras polyinsaturés 22
2.1. Structure 22
2.2. Elongation et désaturation des acides gras à longue chaîne 23
2.3. Régulation de la Δ9-désaturase ou stéaroyl CoA désaturase (SCD) 23
2.4. C18 :2 n-6, C18 :3 n-3 : AG précurseurs des familles des omega 3 et des omega 6 24
3. Médiateurs clés (SREBP, PPAR, LXR, AMPK) 25
3.1. Les facteurs de transcription SREBPs (sterol regulatory element binding protein) . 25
3.2. Les récepteurs nucléaires PPARs (peroxysome proliferator-activated receptor) 26
3.3. Les récepteurs nucléaires LXRs (liver X receptor) 27
3.4. AMPK (AMP-activated protein kinase) 28
4. La membrane plasmique 28
4.1. Caractérisation 28
4.2. Relation entre la fluidité et la composition de la membrane plasmique 29
4.3. Modifications de la membrane plasmique induites par le régime alimentaire 30
5. Stockage des acides gras dans les cellules : rôle de l'adipophiline 30
CHAPITRE III: Lipides et fonction de reproduction 32
1. Alimentation et teneur en lipides des ovocytes et des embryons 32
1.1. Effets des acides gras sur la fonction ovarienne 32
1.2. Effets des acides gras sur l'embryon 33
2. Les acides gras de l'ovocyte et de l'embryon 34
3. La production d'embryons in vitro et milieux de culture 35
3.1. Effet du milieu de maturation sur la qualité embryonnaire 36
3.2. Effet de l'ajout de sérum durant le développement embryonnaire 36

3.3. Coculture sur cellules d'oviductes et autres types cellulaires 38
3.3.1. Coculture avec des cellules d'oviductes 38
3.3.2. Coculture avec d'autres types cellulaires 39
CHAPITRE IV : Embryon et cryoconservation 41
1. Importance de la cryoconservation des embryons 41
2. Les différentes techniques de cryoconservation 42
2.1. Congélation lente 42
2.2. La vitrification 42
2.3. Vitrification rapide (OPS) et ultra rapide 43
3. Facteurs affectant l'efficacité de la cryoconservation 44
3.1. Origine des embryons 44
3.2. Stade de développement 45
3.3. Espèce 45
4. Impact direct des lipides sur la survie au froid 46
4.1. Ajout d'AGPI 46
4.2. Délipidation des embryons 47
OBJECTIFS DE LA THESE 49
RESULTATS
EXPERIENCES PRELIMINAIRES 51
Mise au point des techniques de RT-QPCR et analyse des résultats de quantification de transcrits 51
Article 1 64
Variation of adipophilin mRNA expression in bovine embryos produced in vitro or in vivo 64
Aticle 2 101
Effect of fatty acid supplementation on embryo cryoresistance, gene expression and AMPKα phosphorylation in IVF-derived bovine embryos 101
RESULTATS COMPLEMENTAIRES 135
Effet du milieu coculture sur cellules congelées d'oviducte bovin (BOEC) sur la survie in vivo d'embryons bovins vitrifiés 135
Article 3 140
Effect of culture environment on gene expression profiling of bovine preimplantation embryo 140
DISCUSSION GENERALE
1. Mise au point des techniques de RT-QPCR et validation d'une méthode d'analyse des résultats de quantification des transcrits 166
2. Transcription du gène codant pour l'adipophiline et milieu environnemental 168
3. Ajout d'acides gras polyinsaturés dans le milieu de culture, taux de développement embryonnaire et cryorésistance des embryons 171
4. Ajout d'acides gras polyinsaturés dans le milieu de culture et variation de l'expression génique 172
5. Ajout d'acides gras polyinsaturés dans le milieu de culture et phosphorylation de l'AMPKα 175
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES 176
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 180

ABREVIATIONS

ACC : acetyl-CoA carboxylase

ACS : acetyl-CoA synthetase

ACSL : acyl-CoA synthetase long-chain

ADN : acide désoxiribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADRP : adipose differentiation-related protein

AG : acide gras

AGS : acide gras saturé

AGMI : acide gras monoinsaturé

AGPI : acide gras polyinsaturé

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique/ Cyclic adenosine monophosphate

AMPK : AMP-activated protein kinase

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ARNr : ARN ribosomal

ATP : adénosine triphosphate

BSA : bovine serum albumin

ChREBP : carbohydrate response element binding protein

COC : complexe ovocytes-cumulus

CPT-I : carnitine palmitoyl transferase type I

CPT-II : carnitine palmitoyl transferase type II

DGAT1 : diacylglycérol acyltransférase

DHA : acide docosahexaénoïque ou C 22:6n-3

DIV : développement *in vitro*

dNTP : désoxynucléotide triphosphate

DPA : acide docosapentaénoïque (C 22:5 n-3)

EGF : epidermal growth factor

EPA : acide eicosapentaénoïque (C 20:5 n-3)

FADS2 : fatty acid desaturase 2

FAS : fatty acid synthase

FIV : fécondation *in vitro*

FSH : follicle stimulating hormone

LH : luteinising hormone

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GVBD : Germinal vesicle Breakdown/Bris de la vésicule germinale

H2A : Histone 2A

Hepes : N-2-hydroxyethylpiperazine N-2-ethane sulphonic acid

HPLC : high performance liquid chromatography

IA : insémination artificielle

IGF: insulin growth factor

IGFBP: insulin growth factor binding proteins

IVF : *In vitro* fertilisation

IVM : *in vitro* maturation

IVP : *in vitro* production

LH : luteinising hrmone

LXR : liver X receptor

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MI : métaphase de première division méiotique

MII : métaphase de deuxième division méiotique

MIV : maturation *in vitro*

M-MLV : mouse moloney leukemia virus

MPF : M-phase promoting factor

OPS : open pulled straw

OPU : ovum pick up (ou ponction échoguidée des follicules ovariens)

pb : paire de bases

PCR : polymerase chain reaction

PPAR : peroxysome proliferator-activated receptor

QPCR : quantitative polymerase chain reaction

RT : reverse transcription

SCD1: stearoyl-CoA desaturase

SEM : standard error of the mean

SOF : synthetic oviduct fluid

SREBF1 : sterol regulatory element binding transcription factor1

SREBPs : sterol regulatory element-binding proteins

SVF : sérum de veau fœtal

TBE : Tris Borate EDTA

TCM-199 : Tissue culture medium-199

TG : triglycérides

TME : transition maternelle-embryonnaire

UV : ultra violet

VG : vesicule germinale

ZP : zone pellucide

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les acides gras les plus communs.

Tableau 2. Différences observées entre des embryons bovins produits *in vitro* et *in vivo*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cinétique de production d'embryons *in vivo* et systèmes de culture *in vitro* chez la vache.

Figure 2. Cycles cellulaires de l'embryon bovin et niveau de transcription dans l'ovocyte et l'embryon, d'après Memili and First (2000) et Sirard et al. (2001).

Figure 3. Structure générale des acides gras. Exemples : l'acide stéarique (C18 :0) et l'acide oléique (C 18 :1Δ9).

Figure 4. Nomenclatures des acides gras : la nomenclature chimique et la nomenclature physiologique. Exemple pour l'acide octadécadièn 9*cis*, 12*cis* oïque (acide linoléique).

Figure 5. Synthèse des acides gras dans le foie à partir du glucose et régulaton, d'après Dentin et al., (2005).

Figure 6. Oxydation mitochondriale des acides gras.

Figure 7 : Différentes classes de phospholipides.

Figure 8. Désaturation et élongation des acides gras à partir de l'acide palmitique.

Figure 9. Synthèse des acides gras polyinsaturés chez les organismes vivants.

Figure 10. Rôle de différents médiateurs dans la régulation de l'expression des gènes par les acides gras (Pégorier et Le May, 2003).

Figure 11. Gènes impliqués dans les voies de synthèse du cholestérol, des AG et des TG, et régulés par SREBP-1c et SREBP-2 (Horton et al., 2002).

Figure 12. La membrane plasmique : une mosaïque fluide.

Figure 13. Profil des acides gras dans les ovocytes bovins immatures (Zeron et al.,1999a).

Figure 14. Production d'embryons bovins *in vitro* : taux de succès obtenus à chaque stade.

Figure 15. Profil des acides gras dans les embryons bovins produits *in vivo* et *in vitro* (Abd El Razek et al., 2000).

Figure 16. Importance du transfert embryonnaire dans l'espèce bovine.

Figure 17. Blastocystes bovins expansés : coupes de cellules du bouton embryonnaire. A) Blastocyste produit *in vivo*. B) Blastocyste produit *in vitro* (mSOF). L : gouttelettes lipidiques, V : vacuoles, M : mitochondries, N : noyau, IS : espace intercellulaire (x 4800) (Crosier et al., 2001).

Figure 18. Blastocystes bovins J7 après coloration des noyaux au Hoechst. Développement embryonnaire réalisé dans : a/ mSOF + 5 % SVF ; b/ supplémentation en DHA (C22:6) ; coculture Boec ; *in vivo*.(x 280).

Figure 19. Synthèse et métabolisme des lipides.

Introduction générale

Chez les bovins, les biotechnologies de la reproduction, comme l'insémination artificielle, la collecte d'embryons produits *in vivo* après superovulation, le transfert d'embryon ou encore la cryoconservation d'embryons sont largement utilisées sur le terrain. D'autres le sont un peu moins, comme la production d'embryons *in vitro* à partir d'OPU, même si depuis les années 80, la production d'embryons *in vitro* fait l'objet de nombreuses recherches, notamment chez la plupart des espèces domestiques, et surtout dans l'espèce bovine. Or cette biotechnologie, associée à la cryoconservation des embryons et au transfert d'embryons, a des intérêts, génétique et économique, non négligeables en permettant une meilleure gestion des troupeaux de receveuses et une accélération de la diffusion du progrès génétique grâce à la production en masse d'embryons à partir de femelles sélectionnées. Il est ainsi possible de faire reproduire des vaches génétiquement intéressantes 5 fois plus qu'après transfert classique d'embryons. Une des limites de l'application à grande échelle de la production d'embryons *in vitro* sur le terrain est la faible congélabilité des embryons comparés à leurs homologues *in vivo*. En effet, après cryoconservation, dégel et transfert, les embryons produits *in vitro* sont peu viables comparés à ceux obtenus *in vivo*, et le taux de mise bas est très faible, de l'ordre de 20 à 30 points de moins par rapport à des embryons produits *in vivo*. Depuis une trentaine d'années, de nombreux travaux ont permis d'identifier des différences ultrastructurales et métaboliques différenciant ces embryons. Une accumulation excessive de lipides intra-cytoplasmiques en lien direct avec une plus grande sensibilité au froid de ces embryons a notamment été rapportée. Par HPLC, certaines classes de lipides ont même été identifiées comme étant différentiellement présentes dans les embryons produits *in vitro* et vivo. Des conditions de développement *in vitro* modulant ces accumulations lipidiques ont été identifiées, comme la supplémentation en sérum ou en acides gras essentiels, mais pas les mécanismes impliqués.

L'objectif général de cette thèse a été d'essayer de comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les différences de cryoconservation observées entre les embryons *in vivo* et *in vitro*, de trouver des marqueurs géniques de la cryorésistance, et de proposer, tester et valider des milieux environnementaux *in vitro* qui pallieraient au mieux à cette différence et ainsi lever la limite d'application de cette technique sur le terrain pour les embryons produits *in vitro*.

Dans la première partie de ce document sera présentée une synthèse bibliographique sur l'origine des caractéristiques du modèle étudié dans cette thèse, à savoir l'embryon préimplantatoire. Un rappel sera ensuite fait sur les lipides, leur métabolisme général et en relation avec la fonction de reproduction. Pour finir, seront abordés la cryoconservation des embryons et les facteurs affectant son efficacité, avec en particulier les lipides.

CHAPITRE I : De l'ovocyte à l'embryon

L'ovocyte est une cellule reproductrice hautement spécialisée qui subit une longue différenciation lui permettant d'acquérir des compétences uniques afin de reprendre sa méiose, d'être fécondé, d'assurer les premières divisions cellulaires de l'embryon avant l'activation du génome embryonnaire au stade 8/16 cellules chez le bovin et de soutenir le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste. L'ovocyte doit également acquérir la capacité de soutenir une gestation et de donner à terme un produit viable.

1. La maturation de l'ovocyte

La maturation ovocytaire est un processus complexe qui met en jeu l'ovocyte et les cellules somatiques qui l'entourent et qui confère à l'ovocyte son aptitude à être fécondé. Elle comprend (i) la maturation nucléaire, (ii) la maturation cytoplasmique et (iii) la maturation moléculaire (Sirard et al., 2006). La reprise de la méiose est induite soit par une augmentation rapide de LH, soit par le retrait de l'ovocyte de son environnement folliculaire : elle correspond donc à la levée d'un blocage par une ou plusieurs substances inhibitrices folliculaires encore appelées « oocyte meiotic inhibitor » (OMI). L'expansion des cellules du cumulus et l'expulsion du premier globule polaire sont les seuls signes morphologiques de maturation.

1.1. Reprise de la méiose et maturation nucléaire

Les ovocytes arrêtés en phase G2 de prophase I vont entrer en phase M du cycle cellulaire. Le premier signe visible de la reprise de la méiose est la disparition de la membrane nucléaire appelée rupture de la vésicule germinale (germinal vesicle breakdown, GVBD). S'en suit la condensation des chromosomes, la progression en métaphase I (MI), la séparation des chromosomes (anaphase et télophase I), l'émission du premier globule polaire, la prophase II et finalement l'arrêt en métaphase de deuxième division méiotique (MII), et ce jusqu'à l'initiation de la deuxième reprise de méiose lors de la fécondation, qui aboutit à l'émission du deuxième globule polaire.

L'entrée en phase M jusqu'à la progression au stade MII est sous influence du MPF (Maturation Promoting Factor, (Masu) qui va induire une cascade de phosphorylations protéiques (Masui, 1972, 2001). Le MPF est un complexe protéique composé de deux sous unités, la $p34^{cdc2}$ une protéine de 34 kDa, et la cycline B1, une protéine de 45 kDa. L'activité protéine kinase de $p34^{cdc2}$ est liée à son état de phosphorylation, alors que l'activité

oscillatoire du MPF est liée à l'accumulation de cycline B1 pendant l'interphase et à sa dégradation en fin de prophase. L'activité MPF lors de la maturation chez le bovin montre un patron biphasique. La première phase d'activité du MPF induit la GVBD et la condensation des chromosomes qui conduit à la MI entre 6 et 12 h de maturation. Par la suite, une baisse de l'activité du MPF induit la transition métaphase-anaphase entre 15 et 18 h de maturation. Finalement, la deuxième phase induit l'expulsion du premier globule polaire et la poursuite de la maturation jusqu'en MII entre 18 et 20 h de maturation (Wu et al., 1997).

Chez les bovins, la reprise de la méiose est corrélée positivement avec le diamètre croissant de l'ovocyte. Les ovocytes inférieurs à 90 µm sont incapables de reprendre la méiose. Entre 91-100 µm, ils entreront en GVBD, mais ne complèteront pas la MI avant d'atteindre 101 µm. Seuls les ovocytes de plus de 110 µm peuvent atteindre le stade MII (Fair et al., 1995). Ce sont en général les follicules de plus de 3 mm qui possèdent ces ovocytes (Hyttel et al., 2001).

1.2. La maturation cytoplasmique

La maturation cytoplasmique est l'ensemble des changements cytoplasmiques qui accompagnent la reprise de la méiose et la maturation nucléaire. Elle comprend des changements morphologiques et moléculaires avec traduction de nombreux transcrits. La quantité de gouttelettes lipidiques augmente en nombre et en taille. L'abondance de l'appareil de Golgi diminue. Les granules corticaux migrent de la région périnucléaire centrale vers le cortex ovocytaire, alors que les mitochondries et les ribosomes migrent vers le centre de l'ovocyte. L'ensemble de ces mouvements est orchestré par le réseau de microtubules du cytosquelette. Ces changements cumulatifs indiquent un statut métabolique moins actif indiquant que l'ovocyte est mûr et prêt à être fécondé (Dieleman and Bevers, 1993).

1.3. La maturation moléculaire

L'activité transcriptionnelle est active essentiellement pendant la croissance de l'ovocyte. Pendant la maturation nucléaire de l'ovocyte, elle existe toujours, mais elle diminue drastiquement jusqu'au stade MII (Hyttel et al., 1997 ; Memili et al., 1998 ; Tomek et al., 2002). Un ovocyte contient 2,4 ng d'ARN total dont seulement 1- 2% présente une queue polyA (Bilodeau-Goeseels and Schultz, 1997 ; Picton et al., 1998). Chez la souris, il a été démontré que la moitié des messagers sont déadénylés ou dégradés durant la maturation. (Paynton et al., 1988 ; Paynton and Bachvarova, 1994). Chez le bovin, il n'y a pas de réduction de la quantité d'ARNm, ni d'ARNr durant la maturation. Toutefois, la quantité d'ARNm polyadénylé passe de 53 pg à 25 pg après la maturation (Lequarre et al., 2004).

L'accumulation d'ARNm avec une longue queue poly(A) dans l'ovocyte en MII laisse sous-entendre que l'ovocyte se prépare à la fécondation et est prêt à traduire rapidement les messagers nécessaires afin d'initier le développement embryonnaire (Tomek et al., 2002).

Chez le bovin comme chez les autres animaux domestiques, la reprise de la méiose s'accompagne de synthèses protéiques dès les premières heures de la maturation et tout au long de la maturation, jusqu'au stade MII (Sirard et al., 1989 ; Kastrop et al., 1991). Cette synthèse est indispensable notamment pour la rupture de la vésicule germinale (Kastrop et al., 1990). Trois patrons protéiques reliés aux différents stades de la méiose ont été identifiés, (i) au stade VG (0-4 h), (ii) lors de la transition GVBD - MI (4 et 16 h) et (iii) lors de la transition MI - MII (16-28 h) (Coenen et al., 2004). Une grande activité traductionnelle entre 6 et 14 h a pu être démontrée par incorporation d'acides aminés radioactifs (Tomek et al., 2002). Cette synthèse protéique est corrélée à une activité accrue de la polyadénylation et non à la transcription de nouveaux ARNm. A la fin de la maturation nucléaire de l'ovocyte, la traduction revient à un niveau basal similaire à celui observé au stade GV (Wu et al., 1996; Tomek et al., 2002), même si le nombre de protéines différentes traduites est réduit (Coenen et al., 2004). La quantité de protéines présentes dans l'ovocyte mature est de 122 ng (Thompson et al., 1998c). Une régulation de l'activité des protéines via des phosphorylations / déphosphorylations ont été mises en évidence pendant la maturation ovocytaire (Chian et al., 2003 ; Vigneault et al., 2004).

2. La fécondation et le développement embryonnaire précoce

La fécondation est un évènement cellulaire qui se déroule dans la partie supérieure de l'oviducte chez les mammifères. Les spermatozoïdes y rencontrent les ovocytes ovulés, ce qui a pour conséquence d'activer l'ovocyte. Cette activation de l'ovocyte induit la décharge du contenu des granules corticaux dans l'espace périvitellin bloquant ainsi la polyspermie. Elle permet à l'ovocyte de reprendre la méiose de la seconde division méiotique, d'expulser un deuxième globule polaire, puis d'enclencher le début du développement embryonnaire précoce (figure 1). C'est un phénomène oscillatoire du calcium intracellulaire qui serait causé soit par une interaction récepteur-ligand du spermatozoïde avec l'ooplasme (Swann et al., 1989 ; Jones and Whittingham, 1996), soit par l'introduction d'un facteur activateur spermatique dans l'ooplasme (Sette et al., 1997 ; Kimura et al., 1998). Seuls les ovocytes matures sont capables de répondre à ce signal d'induction oscillatoire du spermatozoïde. L'âge de l'ovocyte en MII détermine également si l'oscillation calcique entraînera le développement embryonnaire normal ou l'apoptose de l'embryon (Fissore et al., 2002).

Le développement embryonnaire précoce est une succession de divisions cellulaires depuis l'activation de l'ovocyte, pour aboutir à une première différenciation cellulaire au stade blastocyste. Le premier cycle cellulaire présente les quatre phases du cycle cellulaire, soit les phases G1, S, G2 et M. Il dure entre 24 et 36 h selon les études (Blondin et al., 1996 ; Holm et al., 1998; Majerus et al., 2000). Il s'agit du stade de formation des pronoyaux jusqu'à la première division de segmentation séparant l'œuf en deux blatomères. Le second cycle (passage de 2 à 4 cellules) présente seulement une phase S et M et dure environ 12 h. Le troisième cycle (4 à 8 cellules) présente une phase S, G2 et M qui dure environ 12 h et le quatrième (8 à 16 cellules) présente à nouveau les quatre phases G1, S, G2 et M et dure environ 45 h (Barnes and Eyestone, 1990; Holm et al., 2002). Ce quatrième cycle chez les bovins est particulièrement long comparé aux précédents, car c'est à ce stade du développement que l'activation du génome embryonnaire se fait. Par la suite, les cycles cellulaires sont d'environ 18 ou 24 h (Holm et al., 2002). A partir du stade 16-32 cellules chez les bovins, les contacts entre les blastomères se resserrent et l'embryon est appelé **morula**, puis morula compacte. Les cellules s'engagent ensuite dans une voie de différenciation marquée par l'apparition du blastocoele (stade blastocyste) et la formation de deux types cellulaires, la masse cellulaire interne ou bouton embryonnaire, cellules totipotentes qui donneront l'embryon lui-même, et le trophectoderme, en surface, premier épithelium différencié au cours du développement embryonnaire, à l'origine des annexes embryonnaires. Au début de la formation du blastocoele, l'embryon est appelé « jeune blastocyste », puis **blastocyste**. Son diamètre est de 160 µm et il possède environ 100 cellules (Picard et al., 1986). L'expansion du blastocoele et la prolifération des cellules augmentent le diamètre embryonnaire, l'embryon est alors appelé « **blastocyste expansé** », et possède environ 200 cellules (Mannaerts, 1986). Chez les bovins, sous l'action des contractions du blastocoele, la zone pellucide qui entoure encore l'embryon à ce stade de développement va se rompre pour donner naissance à un « blastocyste éclos ».

3. La compétence au développement de l'ovocyte

La compétence au développement de l'ovocyte est généralement définie comme la capacité d'un ovocyte à compléter sa maturation, à être féconder et à se développer jusqu'au stade blastocyste pour engendrer ensuite une descendance (Duranthon and Renard, 2001; Sirard, 2001; Trounson et al., 2001). Elle dépend notamment de la taille et du nombre de follicules présents. Pour (Blondin et Sirard), les ovocytes compétents au développement apparaissent dans les follicules de 2-3 mm de diamètre (Blondin and Sirard, 1995), pour

(Hagemann et al., 1999), entre 3-8 mm. Pour d'autres auteurs, ce sont les ovocytes qui proviennent de follicules de plus de 6 mm (Lequarre et al., 2005), entre 4-8 mm (Lonergan et al., 1994) ou plus grands que 13 mm (Hagemann, 1999) qui ont un potentiel de développement plus grand. De ce fait, la fourchette de taille des follicules qui présentent les ovocytes les plus compétents au développement se situerait entre 6 et 13 mm. La compétence au développement de l'ovocyte est également corrélée au moment de la phase folliculaire (Hendriksen et al., 2000). Les follicules au stade statique ou en régression possèdent des ovocytes plus compétents au développement (Salamone et al., 1999). La présence et le nombre de couches de cellules de cumulus sont très importants afin de fournir le support nécessaire à la maturation de l'ovocyte, ainsi qu'à la fécondation *in vitro* (Fatehi et al., 2002), mais une interaction directe entre le cumulus et l'ovocyte n'est pas strictement nécessaire au développement de la compétence. En effet, la présence de complexes ovocytes-cumulus (COCs) avec des ovocytes dénudés lors de la maturation et de la fécondation permet d'obtenir à partir des ovocytes dénudés des taux d'embryons semblables à ceux obtenus avec des COCs (Luciano et al., 2005).

Même si la compétence de l'ovocyte au développement est le principal responsable du succès du développement embryonnaire, il existe un effet mâle, ainsi qu'un effet du milieu de culture *in vitro* sur la cinétique de développement des embryons, vitesse et rythme, qui est la signature du degré de compétence de l'embryon à se développer. Il a été démontré clairement que les embryons les plus compétents au développement se divisent plus rapidement durant les trois premiers cycles cellulaires (Holm et al., 2002). L'effet mâle, c'est-à-dire l'origine des spermatozoïdes utilisés lors de la fécondation, a une incidence sur le temps du premier clivage (Saacke et al., 1988). Une fois mis dans un milieu de culture *in vitro*, des zygotes produits *in vivo* présentent des longueurs de cycle cellulaire plus courts, de 1 à 5 h, que des zygotes produits *in vitro* (Holm et al., 2002). La présence de sérum dans le système de production *in vitro* affecte également la cinétique de développement des embryons. Ajouté pendant la maturation et la fécondation, il entraîne un allongement de certains cycles cellulaires, entre autre le premier, tandis qu'ajouté uniquement lors de la culture d'embryons, il accélère le 4e cycle cellulaire (passage de 8 à 16 cellules) (moins de 5 h) et la vitesse d'apparition du blastocoele (Holm et al., 2002). La durée du premier cycle cellulaire (1 à 2 cellules) est le marqueur de compétence au développement le plus important et le plus utilisé (Majerus et al., 2000). Le taux de production de blastocystes sera d'autant plus élevé que les zygotes auront réalisé leur première division autour de 22-27 h post insémination (pi) (Majerus et al., 2000), 30 h pi (Plante et al., 1994) et 32 h pi (Holm et al., 1998).

4. L'expression génique dans l'embryon

Dans le jeune embryon coexistent d'une part les produits issus de l'expression ovocytaire accumulés au cours de la croissance de l'ovocyte, transcrits et protéines maternels, et d'autre part ceux issus de l'expression parentale, transcrits embryonnaires néosynthétisés. Un développement embryonnaire viable nécessite une régulation précise de l'expression génique afin de coordonner harmonieusement les deux types d'information transcrite. Le passage du contrôle ovocytaire au contrôle embryonnaire se fait lors de l'activation majeure du génome embryonnaire, encore appelée **transition maternelle-embryonnaire** (TME). Trois évènements moléculaires se produisent lors de cette transition. Le premier consiste à détruire les transcrits spécifiques à l'ovocyte, le deuxième à remplacer les transcrits d'origine maternelle communs à l'ovocyte et à l'embryon par des transcrits embryonnaires et le troisième à promouvoir la reprogrammation du patron d'expression génique par de nouveaux gènes spécifiques à l'embryon (Latham et al., 1991).

4.1. Les facteurs maternels

Même si l'activation du génome embryonnaire débute dès le stade 1 à 2 cellules chez les bovins (Plante et al., 1994 ; Hyttel et al., 1996 ; Viuff et al., 1996), le développement embryonnaire est sous le contrôle maternel jusqu'au stade 8-16 cellules, stade de la TME chez les bovins. Les facteurs maternels sont même suffisants pour soutenir le développement embryonnaire jusqu'à ce stade (Memili and First, 1999). Les transcrits maternels sont cependant détruits jusqu'à la TME. Certains subissent une dégradation rapide et sélective dès la fécondation, comme le transcrit RY1 (putative nucleic acid binding protein) ou progressive jusqu'au stade 8 cellules comme le transcrit OCT4 (El-Halawany et al., 2004 ; Vigneault et al., 2004). Ces différentes cinétiques de dégradation suggèrent qu'il doit exister aussi chez les bovins un mécanisme régulant cette dégradation.

4.2. L'activation du génome embryonnaire

La machinerie de transcription est opérationnelle dès le stade 1 cellule, mais les facteurs synthétisés ne sont pas nécessaires pour les premières divisions de l'embryon jusqu'à la TME comme l'indique l'addition d'α-amanitine, un inhibiteur de la transcription, qui modifie le profil des néosynthèses protéiques 36 et 48 heures après fécondation, soit au stade 2 cellules, sans pour autant gêner la poursuite du développement jusqu'au stade 8 cellules (Barnes and First, 1991). L'activation majeure du génome embryonnaire se passe au stade 8-16 cellules ainsi que le démontre la présence d'uridine tritiée dans le noyau et le nucléole d'embryons à la fin du stade 8 cellules (Camous et al., 1986) et l'arrêt du développement

embryonnaire lors de la TME, au stade 8-16 cellules, après traitement des embryons à l'α-amanitine (Barnes and First, 1991 ; Natale et al., 2000) (figure 2). C'est également au stade 8 cellules qu'apparaît un vrai nucléole caractéristique d'une transcription active (Plante et al., 1994 ; Laurincik et al., 2000). La transcription de l'ARNr, partie intégrante du ribosome, est activée également au stade 8-16 cellules (Hyttel et al., 2000 ; Laurincik et al., 2000). Des études globales du transcriptome bovin mettent en évidence de nombreux gènes différentiellement exprimés entre les stades ovocytes immatures, 2 cellules, 8 cellules et blastocystes (Mohan et al., 2004 ; Sirard et al., 2005 ; Misirlioglu et al., 2006 ; Kanka et al., 2009).

L'activation majeure du génome embryonnaire bovin s'accompagne d'importantes modifications du profil de synthèse des protéines. Une diminution progressive de la quantité de protéines synthétisées est observée entre les stades 1 et 8 cellules après culture des embryons en présence de méthionine marquée. La quantité de protéines présentes dans l'embryon à 2-cellules et à 8-cellules sont respectivement 137 et 111 ng (Thompson et al., 1998c). Ensuite, la synthèse reprend jusqu'au stade blastocyste (Frei et al., 1989).

5. Influence du système de culture des ovocytes et des embryons

L'analyse globale du transcriptome tout comme celle de gènes candidats montre clairement des modifications d'expression génique en fonction des conditions de développement *in vitro* et *in vivo* des embryons (Lonergan et al., 2003a ; Miller et al., 2003 ; Mohan et al., 2004 ; de A Camargo et al., 2005 ; Balasubramanian et al., 2007 ; Wrenzycki et al., 2007 ; Katz-Jaffe et al., 2009). Les gènes candidats étudiés sont notamment impliqués dans la compaction, cavitation de l'embryon, l'adaptation au stress, le métabolisme énergétique, la méthylation de l'ADN, l'apoptose ou encore la signalisation. Certains gènes apparaissent surexprimés, d'autres sous exprimés (Natale et al., 2000 ; Ponsuksili et al., 2002 ; Tesfaye et al., 2003 ; Vigneault et al., 2009), et d'autres ont un profil similaire *in vitro* et *in vivo* comme la sous-unité 2 de NADH-deshydrogenase et eIF-4C (De Sousa et al., 1998). D'autres gènes présentent un profil radicalement différent puisque leurs transcrits peuvent être détectés *in vitro* mais pas *in vivo* ou inversement (Tesfaye et al., 2004). Les conditions de maturation des ovocytes, l'ajout de sérum par exemple ou d'autres additifs, altèrent également l'expression de certains gènes dans l'embryon (Gardner and Lane, 2005). Le niveau du transcrit CX43 est plus faible en présence de sérum, tandis que le niveau du transcrit LIF est plus fort (Rizos et al., 2003). Ces altérations du profil d'expression pourraient être une réponse de l'embryon pour compenser les conditions de culture sous

optimales qui lui sont imposées (Niemann and Wrenzycki, 2000). L'analyse des profils d'expression des gènes associés au développement de l'embryon précoce s'avère donc être un moyen très utile pour évaluer la capacité des embryons.

CHAPITRE II : Les Lipides – Notions générales

1. Les acides gras

1.1. Structure, nomenclature et propriétés des acides gras

Les **acides gras** (AG) sont des acides carboxyliques (groupement COOH, polaire) avec une chaîne aliphatique linéaire comprenant un nombre d'atomes de carbone supérieur à 4 et généralement pair (figure 3). Ils appartiennent à la famille des lipides. Ils se distinguent les uns des autres par :

* leur nombre d'atomes de carbone : il varie de 4 à 24. De 4 à 10 carbones, on parle d'acides gras à courte chaîne, entre 12 et 14 carbones d'acides gras à moyenne chaîne et, à 16 carbones et plus, d'acides gras à longue chaîne.

* leur nombre de doubles liaisons éthyléniques (entre deux carbones) ou degré d'insaturation, généralement au nombre de 0 à 6. Les acides gras ne comportant pas de double liaison sont appelés acides gras saturés, ceux possédant une double liaison, acides gras monoinsaturés et ceux ayant plus d'une double liaison, acides gras polyinsaturés (voir chapitre II.2). Le degré d'insaturation confère à l'acide gras autant d'angulations dans l'espace qui lui font occuper un très grand volume et générant des corps plus fluides, alors que les acides gras saturés sont linéaires et donnent des structures compactes.

***** la position des doubles liaisons (isomérie de position)

***** la forme des doubles liaisons (isomérie géométrique **cis** ou **trans**). Dans la configuration **cis**, les deux atomes d'hydrogène sont du même côté du plan de la liaison, c'est le cas le plus fréquent dans la nature, notamment pour les AG alimentaires. Dans la configuration **trans,** les deux atomes d'hydrogène sont de part et d'autre du plan de la liaison, cas moins fréquent (Adrian, 1999).

Il existe deux nomenclatures pour désigner un acide gras, la **nomenclature chimique et la nomenclature physiologique** (figure 4)**.** Les deux font référence au nombre d'atomes de carbone, au nombre de doubles ou triples liaisons et à position de la première double liaison. Ce qui diffère entre les deux nomenclatures est le carbone de référence pour commencer la numérotation. Pour la première, la numérotation des carbones part du groupement carboxylique terminal, alors que pour la seconde, elle part du groupement méthyl terminal, pour lequel le carbone est appelé "ω", donnant le nom de la famille de l'acides gras (ω 3, 6 ou

9). La géométrie des doubles liaisons est ajoutée à la nomenclature chimique. Un nom systématique est donné aux acides gras.

Cependant, il lui est le plus souvent préféré un nom commun tel que l'acide linoléique pour l'acide octadécadièn 9*cis*,12*cis* oïque ou encore le C18:2 Δ9*cis*, Δ12*c*is ou C18:2 9*c*,12*c*, ou le C18:2 ω6, et en nomenclature consensus, le C18 :2 n-6. Pour l'acide octadécatrièn 9*cis*,12*cis*,15*cis* oïque, il est plus communément trouvé « acide linolénique », abrégé en C18:3 9*c*,12*c*,15*c* ou C18:3 ω3, ou C18:3 n-3 (tableau 1).

Les acides gras sont des molécules très hydrophobes, par conséquent insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques, comme l'hexane, l'éther ou le chloroforme. L'hydrophobie d'un acide gras croît avec la longueur de sa chaîne carbonée. Les acides gras sont soit à l'état solide soit à l'état liquide. Le passage d'un état à l'autre se produit à une température (point de fusion) dont la valeur diminue avec le degré d'insaturation et augmente avec la longueur de la chaîne carbonée. A température ambiante, les acides gras saturés sont donc généralement solides et les acides gras polyinsaturés liquides. Ces derniers se retrouvent principalement dans les huiles végétales (maïs, soja, tournesol, noix, lin…..). Les doubles liaisons confèrent aux acides gras une grande instabilité et les rendent particulièrement sensibles aux réactions d'oxydation. Les acides gras peuvent s'estérifier avec un ou plusieurs alcools, ce qui conduit à la formation de **lipides**, plus ou moins complexes en fonction des autres corps, variés, qui peuvent s'y associer (exemple : les acylglycérols ou glycérides : AG + glycérol ; les phosphoacylglycérols ou phosphoglycérides : AG + glycérol + phosphate).

1.2. La synthèse des acides gras

Chez les mamifères, les deux sites majeurs de la synthèse *de novo* des acides gras ou lipogenèse sont le foie et le tissu adipeux. Les AG sont formés à partir des molécules d'acétyl-CoA provenant notamment des glucides (glycolyse et oxydation du pyruvate), de l'alcool (éthanol) et des acides aminés. La lipogénèse a lieu dans le cytosol. Deux enzymes clés : l'acétyl CoA carboxylase (ACC) et la fatty acid synthase (FAS) (Wakil et al., 1983) ; elles sont toutes les deux exprimées dans le tissu adipeux (Letexier et al., 2003). La première étape est une réaction à vitesse limitante où l'ACC catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA qui se transforme en malonyl-CoA. Cette enzyme est régulée par sa forme (active en polymère et inactive en protomère) et par son état de phosphorylation (activée par déphosphorylation insulinodépendante et inactivée après phosphorylation par l'AMP kinase. S'ensuit une cascade de réactions ou hélice de Wakil qui conduit à des AG à 6, 8, 10, 12, 14 et 16 C (palmitate). Chez les animaux, le palmitate est le précurseur d'acide gras à chaînes

longues, saturées ou insaturées, par l'action d'élongases et de désaturases (voir chapitre II.2.2).

La synthèse des acides gras est contrôlée à la fois par l'abondance et la nature des substrats énergétiques et par l'insuline qui inhibe la lipase. L'excès de glucose transformé en acides gras ainsi que les acides gras d'origine alimentaire sont transformés en lipides de stockage (triglycérides, TG). La lipolyse est à l'inverse imposée par le jeûne ; elle est sous la dépendance du glucagon. Le facteur de transcription SREBP-1c joue un rôle majeur dans le contrôle de l'expression des gènes de la lipogenèse en stimulant la transcription du gène codant pour l'ACC (Ikeda et al., 2002). La présence d'acides gras polyinsaturés (PUFAs) empêchent l'action du facteur de transcription SREBP1 (Sekiya et al., 2003), ce qui inhibe la transcription d'autres gènes comme ceux codant pour FAS et SCDl (stearoyl-CoA desaturase 1). Synthèse et régulation des acides gras dans le foie sont schématisées sur la figure 5.

1.3. La β-oxydation ou lipolyse des acides gras

Les acides gras sont dégradés par oxydation au niveau du **carbone** β dans la mitochondrie (figure 6). Les AG sont transformés en acyl- CoA grâce à des acyl-CoA synthases dans le cytoplasme, qui sont ensuite transportés dans la matrice mitochondriale via des carnitines palmityl CoA transferases (CPT-I et CPT-II) et une translocase (Brady et al., 1993 ; McGarry and Brown, 1997 ; Zammit, 1999). Les acides gras à très longue chaîne (plus de 18 carbones) peuvent tout d'abord être oxydés partiellement au sein des peroxysomes. Une fois raccourcis, ils poursuivent leur oxydation dans la mitochondrie (Brady et al., 1993 ; Hocquette and Bauchart, 1999). CPT-I dont l'activité est inhibée par le malonyl-CoA, 1er intermédiaire formé lors de la synthèse des acides gras dans le foie, constitue l'étape limitant de l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie (Brindle et al., 1985 ; McGarry and Brown, 1997). L'oxydation des acides gras est donc, indirectement sous le contrôle de l'insuline, puisque celle-ci est responsable de l'activation de l'acétyl-CoA carboxylase, qui catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA (Hennen, 1995). CPT-1 est connu pour être un régulateur du niveau d'acides gras polyinsaturés d'origine alimentaire dans le foie et le tissu adipeux (Kennedy et al., 2006 ; Morash et al., 2009). Chez la souris, les transcrits pour CPT-II ne sont pas détectables au stade 2 cellules, mais seulement au stade morula (Gentile et al., 2004). Cette augmentation se fait de façon concommittente à l'augmentation des profils d'absorption d'oxygène et d'oxydation des acides gras.

L'oxydation intramitochondriale des acides gras (β-oxydation) se déroule en 4 étapes qui se répètent n fois, décrivant l'hélice de Lynen, et aboutissant à chaque fois à la formation

d'un acyl-CoA plus court de 2 atomes de carbone et d'un acétyl-CoA (Hennen, 1995). L'acétyl-CoA subira soit une oxydation complète dans le cycle de Krebs, soit une oxydation partielle en acide acétique ou en corps cétoniques (acétoacétate et β-hydroxybutyrate) (Emery et al., 1992). La β-oxydation est inhibée par l'augmentation du ratio NADH/NAD dans la matrice mitochondriale, par la présence de propionyl-CoA, forme activée du propionate, premier métabolite intermédiaire lors de la néoglucogenèse, ainsi que par un déficit en carnitine.

1.4. L'estérification des acides gras : synthèse des triglycérides et des phospholipides

Les triglycérides sont des esters d'AG et du glycérol qui constituent la forme majeure des lipides de l'organisme. Ils ont un rôle énergétique, alors que les phospholipides, molécules amphiphiles, entrent dans la structure des lipoprotéines et des membranes cellulaires (voir chapitre II.5). Les AG sont tout d'abord activés en acyl CoA par l'acyl-Coa-synthétase (ACS) et le glycérol phosphorylé en glycérol-3-Phosphate par la glycérol kinase. S'en suivent des estérifications successives du glycérol-3-P sous l'action de plusieurs enzymes, respectivement, les glycérol-3-P acyltransférases, GPATs (Bell and Coleman, 1980), les 1-acylglycérol acyltransférases, AGPATs, (Leung, 2001) et les diacylglycérol-transférases, DGATs, (Cases et al., 1998 ; Cases et al., 2001). Deux isoformes de DGAT existent, DGAT1 et DGAT2, mais DGAT2 a un rôle primordial dans le stockage et le métabolisme des triglycérides (Stone et al., 2004)**.** La voie de synthèse des phospholipides est commune avec celle des triglycérides jusqu'à la formation des diglycérides. Les étapes suivantes aboutissent à deux catégories de phospholipides différents, les phosphatidylcholines (PC) et les phosphatidyléthenolamines (PE) selon le groupement transféré (figure 7).

2. Les acides gras polyinsaturés

2.1. Structure

Les AG insaturés sont soit mono (AGMI) soit polyinsaturés (AGPI). Les AGMI possèdent une seule double liaison qui peut être de géométrie soit cis soit trans. Elle peut se situer en différents points de la chaîne carbonée (Naudet, 1992). Par exemple, l'acide oléique C18:1 9c (acide octadécèn 9c oïque), acide en 18:1 le plus présent dans les aliments. Les AGPI possèdent quant à eux plusieurs doubles liaisons qui peuvent être de géométrie *cis* ou *trans*. Ils peuvent donc être soit tout *cis*, soit tout *trans*, soit combinés *cis*/*trans*. Par exemple, l'acide linoléique C18:2 9*c*,12*c*, acide octadécadièn 9*c*,12*c* oïque, le plus souvent rencontré dans les aliments, a 3 isomères géométriques 9*c*,12*t* - 9*t*,12*c* et 9*t*,12*t* . Les doubles liaisons

des AGPI peuvent se situer en différents points de la chaîne carbonée, mais à l'état naturel, elles ne se touchent généralement pas, ce qui fait que deux doubles liaisons sont séparées de 3 carbones ; si c'est tout de même le cas, on parle de liaisons conjuguées, exemple l'acide linoléique conjugué, ALC, C18 :2 t10, c12.

2.2. Elongation et désaturation des acides gras à longue chaîne

L'ensemble des acides gras à longue chaîne insaturée (AGMI et AGPI), mais aussi saturés (AGS) qui sont incorporés dans les triglycérides, phospholipides et esters du cholestérol, constitutifs des lipides tissulaires est obtenu à partir de l'acide palmitique grâce à l'action d'élongases et de désaturases du réticulum endoplasmique (figure 8). Chez les bovins, quatre types de désaturases sont distingués selon leur site de désaturation : Δ9-, Δ6-, Δ5- et Δ4-désaturases. La Δ9-désaturase agit sur des AGS à chaîne longue comme l'acide palmitique C16:0 et l'acide stéarique C18:0 qu'elle désature entre les carbones 9 et 10 à partir de l'extrémité carboxylique pour donner respectivement l'acide palmitoléique C16:1 Δ9 et l'acide oléique C18:1 Δ9 (Ntambi, 1999).

Les autres désaturases interviennent ultérieurement associées aux élongases pour introduire des doubles liaisons uniquement du côté de l'extrémité carboxylique, contrairement aux végétaux chez lesquels, grâce à des Δ12- et Δ15- désaturases, la désaturation progresse depuis la première double liaison en position 9 vers l'extrémité méthylique. Les animaux, ne peuvent donc pas synthétiser l'acide linoléique (C18:2 Δ9,12) et l'acide α-linolénique (C18:3 Δ9,12,15), qu'ils doivent trouver dans leur alimentation. La Δ9-désaturase intervient plus particulièrement dans le maintien des propriétés physico-chimiques des membranes, notamment leur fluidité, en modifiant la composition en AG des phospholipides et des triglycérides (Jeffcoat and James, 1984). Son activité est décelée principalement dans les cellules épithéliales mammaires, et dans les cellules du tissu adipeux et de l'intestin grêle, mais à un niveau plus faible (Kay et al., 2004).

2.3. Régulation de la Δ9-désaturase ou stéaroyl CoA désaturase (SCD)

SCD est une protéine membranaire de 40 kDa ancrée dans le réticulum endoplasmique (Ozols, 1997) qui est régulée à la fois par la qualité de la prise alimentaire et par certaines hormones. Les régimes riches en acides gras polyinsaturés, la leptine et le glucagon inhibent l'expression du gène SCD1 dans les tissus adipeux et le foie (Ntambi, 1999 ; Lefevre et al., 2001 ; Cohen et al., 2002). L'activité de SCD diminue également en cas de diabète (Faas and Carter, 1980 ; Mimouni and Poisson, 1992) et lors du jeûne (Oshino and Sato, 1972 ; Chanussot et al., 2000). Par opposition, une alimentation riche en glucide, l'insuline et le

cholestérol sont reconnus comme des effecteurs positfs de l'expression du gène de SCD1 (Joshi and Aranda, 1979 ; Chin and Chang, 1982 ; Kawashima et al., 1983). Chez le poulet, l'insuline augmente le taux d'ARNm et l'activité enzymatique de SCD respectivement de 1,4 et de 3 fois (Lefevre et al., 1999). En plus de son effet inhibiteur direct sur la transcription du gène SCD1 et l'activité enzymatique, le glucagon agit comme inhibiteur de l'action de l'insuline (Spence and Pitot, 1982 ; Lefevre et al., 1999). Des effets similaires sur les Δ6-et Δ5 désaturases ont été mis en évidence, diminution lors d'un régime enrichi en acides gras essentiels, lors du jeûne ou en présence de glucagon (Mahfouz et al., 1984 ; Pugh and Kates, 1984 ; Garg et al., 1986 ; Blond et al., 1989 ; Giron et al., 1996).

Les séquences promotrices du gène SCD1 contiennent des éléments de fixation pour la liaison de facteurs de transcription comme SREBP (sterol regulatory element binding protein), NF-Y (nuclear factor Y), c/EBPa (CCAAT enhancer binding protein alpha), NF-I (nuclear factor 1) et USF (upSteam transcription factor). La plupart de ces facteurs seraient impliqués dans la régulation nutritionnelle et hormonale de la transcription du gène SCD1 (Christy 1989 ; Lefevre 2001 ; Zhang 2001). SREBP et NF-Y sont notamment reconnus pour leur implication dans la régulation du gène SCDI par les AGPI. Les AGPI diminuent la transcription et la maturation des SREBP et donc leur liaison aux éléments de réponse SRE inhibant ainsi la transcription de SCD1 par ces facteurs (Ntambi, 1999). Ils peuvent également réprimer la transcription de SCD1 en se liant directement à leur propre site de liaison AGPI-RE (polyunsaturated fatty acids response element). Les AGPI pourraient aussi jouer un rôle post-transcriptionnel en diminuant la stabilité de l'ARNm de SCD1. Le cholestérol pour sa part, est reconnu pour activer la transcription du gène SCD1 par modulation de l'expression du récepteur LXRa (Liver X Receptor) (Ntambi, 1999), dont l'activation peut mener à la maturation de SREBP et donc à une augmentation de la disponibilité de la forme mature nucléaire du facteur de transcription (Eberle et al., 2004).

2.4. C18 :2 n-6, C18 :3 n-3 : AG précurseurs des familles des omega 3 et des omega 6

L'acide linoléique C18 :2 n-6 et l'acide alpha-linolénique C18 :3 n-3 sont deux acides gras polyinsaturés à longue chaine dits **essentiels**. Ils sont les précurseurs d'autres AGPI comme le C20:4 n-6 (acide arachidonique), constituant prépondérant des phospholipides membranaires, le C20:5 n-3 (acide eicosapentaénoïque, EPA), à rôles physiologiques essentiels, lui-même précurseur du C22 :6 n-3 (acide docosahexaénoïque, DHA), et d'autres permettant la synthèse de médiateurs chimiques importants (figure 9). Le DHA est

notamment primordial pour le développement du système nerveux du foetus (Yavin et al., 2001), il favorise le maintien de la gestation chez l'homme (Allen and Harris, 2001) et les ruminants (Mattos et al., 2000) et peut moduler le taux de triglycérides circulants. Les AGPI de la série n-6 sont les précurseurs des dérivés lipoxygénés et cyclooxygénés, qui sont des médiateurs lipidiques impliqués dans les mécanismes de prolifération et de différenciation cellulaire. Bien que leur rôle dans le développement de l'embryon soit mal connu, la régulation des teneurs des acides gras polyinsaturés est primordiale au maintien de ces fonctions. De plus, ces acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées du stress oxydant (Roberts and Morrow, 2002) dont les effets se traduisent par l'inhibition du développement de l'embryon, stress oxydant qui est augmenté par les méthodes *in vitro* (Johnson and Nasr-Esfahani, 1994 ; Fujitani et al., 1997).

L'acide linoléique conjugué (ALC), dérivé de l'acide linoléique, présente différents isomères, dont le C18:2 *trans*-10, *cis*-12 auquel sont attribués des effets sur le métabolisme lipidique des animaux en croissance ou en lactation. Chez la vache laitière, le C18:2 *trans*-10, *cis*-12 est associé à une diminution de la synthèse des matières grasses du lait par inhibition des Δ9, Δ6 et Δ5 désaturases (Chouinard et al., 2001). L'inhibition de la Δ9 désaturase expliquerait la baisse de production lactée de C18:1 *cis* 9 constatée lors d'infusion ruminale d'ALC (Loor, 2001). La Δ9 désaturase intervient également sur le C18:1 *trans*-11 pour donner le C18:2 *cis*-9, *trans*-11 : cette voie de synthèse est responsable de la formation de 64 à 93% des ALC *cis*-9, *trans*-11 retrouvés dans les matières grasses du lait chez la vache dans différentes conditions d'alimentation (Griinari et al., 2000 ; Piperova et al., 2002).

3. Médiateurs clés (SREBP, PPAR, LXR, AMPK)

Les acids gras peuvent réguler l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidiques via plusieurs médiateurs clés (figure 10).

3.1. Les facteurs de transcription SREBPs (sterol regulatory element binding protein)

Les facteurs de transcription reconnaissent généralement des petites séquences d'ADN conservées contenues au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles. Certains de ces facteurs et de ces séquences sont communs à plusieurs gènes et utilisés de manière constitutive, et d'autres sont spécifiques de gènes et leur activité est régulée. Les facteurs de transcription (SREBP) sont des acteurs majeurs de la régulation du métabolisme lipidique en contrôlant l'expression des gènes du métabolisme des acides gras, des triglycérides et du cholestérol (Eberle et al., 2004). Ces facteurs appartiennent à une famille composée de trois membres :

SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP- 2. L'isoforme SREBP-2 est codée par le gène SREBP-2 alors que SREBP-1a et 1c sont codées par le gène SREBP-1, par l'utilisation de deux promoteurs différents et par épissage alternatif. Les trois isoformes se distinguent par leur localisation tissulaire, leurs gènes cibles et la régulation de leur activité transcriptionnelle (figure 11). Les facteurs SREBP sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs ancrés dans les membranes du réticulum endoplasmique. Le clivage protéolytique du précurseur SREBP permet la libération de la partie transcriptionnellement active qui, une fois libérée, migre dans le noyau pour activer ses gènes cibles (Brown, 1999).

L'expression de SREBP-1c dans le foie varie avec l'alimentation, elle est faible chez un animal à jeun et élevée avec un régime riche en glucides. L'ALC C18:2 *trans*-10, *cis*-12 inhibe l'activation protéolytique de SREBP-1 dans la glande mammaire bovine et réduit également l'activation transcriptionnelle de gènes lipogénics comme ceux codant pour ACC ou FAS, diminuant ainsi la synthèse des lipides (Peterson et al., 2004). La leptine via l'AMPK (5'-AMP activated protein kinase) qui inhibe l'ACC réprime également l'expression du SREBP-1c dans le foie, le pancréas et le tissu adipeux, inhibant de la sorte la lipogenèse dans ces tissus (Kakuma et al., 2000). Les effets transcriptionnels positifs de l'insuline sur les gènes de la glycolyse et de la synthèse des acides gras passent par l'activation transcriptionnelle du médiateur SREBP-1c via la voie de la phosphatidyl inositol 3-phosphate kinase (Foretz et al., 1999).

3.2. Les récepteurs nucléaires PPARs (peroxysome proliferator-activated receptor)

Les PPAR, α, β/δ et γ, sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils forment des hétérodimères avec le RXR (retinoid X receptor) lorsqu'ils sont activés et lient leur élément de réponse spécifique sur leurs gènes cibles (Chinetti-Gbaguidi et al., 2005 ; Vidal, 2005).

PPARα joue un rôle important dans la captation des AG par les cellules et dans leur dégradation en régulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des AG. En régulant l'estérification des AG en acyl-CoA par augmentation de l'expression de l'acyl-CoA synthétase, PPARα empêche la sortie des AG des cellules (Schoonjans et al., 1995 ; Martin et al., 1997 ; Frohnert et al., 1999). Il augmente également l'expression de CPT-I et II dans le foie et le muscle (Brandt et al., 1998 ; Gilde et al., 2003) et celle d'enzymes mitochondriales (HKII, ACS-5, LCAD, MCPT-1, UCP-2, et UCP-3) responsables de la dégradation des AG (Aoyama et al., 1998 ; Gilde et al., 2003). L'activation de PPARα

conduit donc à l'augmentation de la dégradation oxydative des AG diminuant ainsi la quantité d'AG libres pour la synthèse des lipoproteines de faible densité (VLDL, very low density lipoprotein).

PPAR γ est un facteur clé de l'adipogenèse. Son expression forcée dans des fibroblastes induit une différenciation adipocytaire et son absence empêche toute différenciation (Rosen and MacDougald, 2006). Il existe deux isoformes, PPARγ1, exprimée dans de nombreux tissus (foie, muscle, colon…) et PPARγ2, exprimée spécifiquement au niveau de l'adipocyte (Michalik et al., 2006). La capacité des cellules à se différencier en adipocytes et donc à accumuler des lipides est uniquement liée au niveau d'expression de PPAR γ2 (Camp et al., 2002). Des travaux ont montré que la production du ligand de PPARγ2 pouvait être augmenté par les facteurs de transcription C/EBP béta et SREBP-1c (Rosen and MacDougald, 2006). Enfin, il semble que le facteur SREBP-1c/ADD-1 (facteur de la détermination et de la différenciation adipocytaire) intervienne également dans l'induction de l'expression et de l'activité de PPARγ2.

PPAR-β/δ serait impliqué dans l'homéostasie lipidique des macrophages et serait pro-inflammatoire (Marx et al., 2004), en plus d'être possiblement associé au phénomène d'insulino-résistance musculaire (Vidal, 2005).

3.3. Les récepteurs nucléaires LXRs (liver X receptor)

Comme les PPAR, les récepteurs LXRs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires (Peet et al., 1998). Ce sont des facteurs de transcription activés par des signaux lipophiles comme les stéroïdes, les hormones thyroïdiennes, des dérivés vitaminiques (acide rétinoïque et vitamine D3) ou des métabolites lipidiques (acides gras et dérivés hydroxylés du cholestérol). Dans le cas des LXRs, les ligands sont des oxystérols spécifiques. En absence de ligand, les LXRs sont fixés sur l'ADN avec leur partenaire obligatoire d'hétérodimérisation, le récepteur nucléaire RXR (Retinoic X Receptor) de l'acide rétinoïque 9-cis (Lobaccaro et al., 2001). Le LXR peut réguler les niveaux cellulaires de lipides par activation de SREBP-1c et être activé par des stérols oxydés (Edwards et al., 2002 ; Ory, 2004). En effet, les LXRs ont directement pour cible des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras comme la lipoprotéine lipase (LPL) (Zhang et al., 2001), FAS (Joseph et al., 2002), SCD1 et SCD2 (Sun et al., 2003), et SREBP-1c (Repa et al., 2000), expliquant ainsi les effets secondaires de certains agonistes sur les triglycérides circulants. Les LXRs ont également été impliqués dans la régulation de la biosynthèse des lipides via l'action de l'insuline (Cao et al., 2003) et dans l'homéostasie glucidique via la régulation de GLUT4 (Dalen et al., 2003). La protéine de

transfert des phospholipides (PLTP) impliquée dans le métabolisme des lipoprotéines à haute densité (HDL, High Density Lipoprotein) est également régulée par LXR (Cao et al., 2002). Les acides gras insaturés, comme le DHA et l'acide oléique, peuvent être liés avec une forte affinité aux RXR, et entrent alors en compétition avec l'acide rétinoïque 9-cis (Goldstein et al., 2003).

3.4. AMPK (AMP-activated protein kinase)

L'AMPK apparaît comme un censeur métabolique incontournable permettant l'ajustement précis des besoins et disponibilités énergétiques cellulaires. Elle joue un rôle important dans le contrôle du métabolisme lipidique, notamment dans l'inhibition de la synthèse des acides gras dans le foie et les tissus adipeux, en inactivant ACC et FAS, et ce, via l'inhibition de l'expression et de l'activité des facteurs de transcription SREBP-1c (Minokoshi et al., 2002 ; Foretz et al., 2005) et ChREBP (carbohydrate response element binding protein) (Kawaguchi et al., 2002 ; Foretz et al., 2005).

Comme le malonyl-CoA produit par l'ACC joue le rôle d'élément régulateur puisqu'il bloque, dans le foie et dans les muscles striés, le transport des acides gras du cytosol vers la mitochondrie en inhibant CPT-1, l'activation de l'AMPK entraîne donc dans ces tissus une diminution de la concentration cytosolique de malonyl-CoA, facilitant ainsi la pénétration des acides gras dans la mitochondrie et leur oxydation. Par ce mécanisme, il a été récemment démontré que la leptine et l'adiponectine, deux adipokines sécrétées par le tissu adipeux, stimulent l'oxydation des acides gras dans le foie et le muscle squelettique secondairement à une activation de l'AMPK dans ces tissus (Minokoshi et al., 2002 ; Tomas et al., 2002). Plusieurs résultats montrent que des variations du statut énergétique de l'hypothalamus sont capables de moduler directement l'activité AMPK. Ainsi, une déplétion en ATP causée par le 2-désoxyglucose, analogue non métabolisable du glucose, active l'AMPK et la prise alimentaire alors qu'une augmentation de l'état énergétique par injection intrahypothalamique d'un inhibiteur de la synthèse des acides gras les inhibe (Kim et al., 2004a ; Kim et al., 2004b).

4. La membrane plasmique

4.1. Caractérisation

La membrane plasmique est constituée de lipides et de protéines comme d'autres membranes cellulaires. Les protéines sont intercalées dans une bicouche de phospholipides qui forme une barrière stable entre deux compartiments aqueux (figure 12).

Elles assurent les fonctions spécifiques de transport et de signalisation cellulaire de la membrane plasmique alors que les lipides constituent les éléments structuraux essentiels des membranes et leur confèrent leurs caractéristiques physiques (fluidité) et leur rôle de barrière. Le rapport protéines / lipides est très variable en fonction de la nature et du rôle des membranes et de ceux des tissus et organismes (Cooper and Hausman, 2003). Les quatre phospholipides majeurs des membranes plasmiques des mammifères sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et la sphingomyéline (SM) (figure 7). Ils représentent plus de la moitié des lipides membranaires. Leur distribution est asymétrique, entre les deux feuillets membranaires, avec une majorité de phospholipides contenant de la choline, PC et SM, dans le feuillet externe, et plus d'aminophospholipides, PE et PS, dans le feuillet interne. Un cinquième phospholipide, le phosphatidylinositol (PI) est aussi présent dans le feuillet interne. Bien qu'il constitue quantitativement un composant mineur, il joue un rôle important dans les signaux cellulaires (Cooper and Hausman, 2003). Les AG constitutifs des phospholipides chez les mammifères sont généralement C16:0 et C18:0 pour les AGS, et C18:1, C18:2 et C20:4 pour les AGMI et AGPI. Le cholestérol est un autre élément majeur des membranes plasmiques de mammifères où il se trouve essentiellement sous forme libre (Cooper, 1984). Il est surtout présent dans le feuillet externe, ce qui amplifie la dissymétrie membranaire et doit limiter la mobilité transversale des phospholipides.

4.2. Relation entre la fluidité et la composition de la membrane plasmique

La membrane cellulaire n'est pas une structure statique mais constitue une mosaïque fluide où la mobilité dynamique fluctue constamment pour répondre aux besoins changeants de la cellule. La fluidité d'une membrane est ainsi un paramètre important qui régule la fonction membranaire par i/ ses effets sur l'orientation des protéines intrinsèques et sur la perméabilité membranaire et ii/ par sa modulation des processus de transports transmembranaires (Schachter, 1984). Les caractéristiques de fluidité des membranes biologiques sont essentielles pour de nombreuses fonctions cellulaires telles que la croissance, le transport de solutés, la transduction de signaux et les activités enzymatiques associées aux membranes (Sunshine and McNamee, 1994 ; Emmerson et al., 1999 ; Prasad et al., 1999 ; Oghalai et al., 2000 ; Parks et al., 2000). La fluidité membranaire augmente généralement avec la proportion d'AGI et le degré d'insaturation, et diminue avec la longueur des chaînes des phospholipides (Schwarz et al., 1984 ; Stubbs and Smith, 1984). Elle est influencée par les rapports cholestérol / phospholipides et lipides / protéines (Cooper, 1984 ; Yeagle, 1985).

Le rôle du cholestérol est assez complexe. Il tend à rigidifier une membrane très fluide, dont les chaînes d'acides gras sont dans une phase désordonnée, par un effet de condensation, et à rendre plus fluide une membrane que la composition en acides gras et/ou les conditions de milieu (basses températures) devrait rendre rigide (Spector and Yorek, 1985 ; Yeagle, 1985).

4.3. Modifications de la membrane plasmique induites par le régime alimentaire

Chez les mammifères, les graisses alimentaires sont largement connues pour influencer la composition lipidique des membranes corporelles incluant les membranes plasmiques, notamment en fonction de leurs teneurs respectives en acides gras saturés et insaturés (Tahin et al., 1981 ; Stubbs and Smith, 1984 ; Clandinin et al., 1985 ; Conroy et al., 1986 ; Christon et al., 1988 ; Clamp et al., 1997). Ces modifications de composition lipidique des membranes peuvent modifier en conséquence diverses fonctions incluant la production d'eicosanoïdes et d'autres messagers secondaires (Hornstra, 1984 ; Johnston, 1985 ; Merrill, 1992), le fonctionnement des récepteurs (Criado et al., 1982 ; Kinsella, 1990) et les activités enzymatiques (Mead, 1984). Ainsi chez le rat, une carence en acide gras essentiel induit une baisse des proportions d'acides linoléique et arachidonique au profit des acides oléique, palmitoléique et eicosatriénoïque dans les phospholipides des membranes microsomales des cellules hépatiques, ce qui entraîne une diminution de la fluidité membranaire et une modification des activités enzymatiques, notamment celles en rapport avec les fonctions de détoxification (Christon et al., 1988). Lors de régimes carencés en lipides, au-delà des modifications de la composition en acides gras des phospholipides membranaires, une diminution du rapport cholestérol / phospholipides est observée (Hamm et al., 1988).

5. Stockage des acides gras dans les cellules : rôle de l'adipophiline

Les acides gras sont stockés majoritairement sous forme de triglycérides dans le cytoplasme des adipocytes, constituant ainsi une réserve énergétique pour l'organisme. Cette réserve est bien plus importante en quantité que celle provenant des glucides stockés sous forme de glycogène. Chez les mammifères, plusieurs protéines sont connues pour s'associer spécifiquement aux goutelettes lipidiques et contrôler l'utilisation des triglycérides, ce sont la périlipine, TIP47 et l'adipophiline (ADRP, adipose differentiation-related protein). Cette dernière est une protéine de 50 kDa dont l'activation transcriptionnelle est étroitement liée à la différenciation du tissu adipeux (Jiang and Serrero, 1992a). Elle est présente dans les adipocytes, mais également dans de nombreux types cellulaires et tissus où les lipides sont stockés ou synthétisés (Heid et al., 1998). L'ADRP facilite le transport et l'accumulation

d’acides gras libres à longue chaine, aussi bien saturés que mono ou polyinsaturés et pourrait donc jouer un rôle de transporteur d’AG (Gao et Serrero, 1999 ; Gao et al., 2000). Les mécanismes d’action ne sont pas clairement identifiés. Cependant, PPARγ pourrait induire l'expression de l'ADRP (Tontonoz et al., 1994 ; Buechler et al., 2001), même si aucun PPRE (Peroxisome-proliferator-responsive element) n'a été identifié sur la région proximale du promoteur de l'ADRP (Eisinger and Serrero, 1993).

CHAPITRE III: Lipides et fonction de reproduction

1. Alimentation et teneur en lipides des ovocytes et des embryons

Chez les bovins, un régime enrichi en lipides est parfois utilisé pour augmenter l'énergie de la ration. Dans la période périconceptionnelle, il peut avoir une incidence sur le nombre de follicules, la qualité des ovocytes et des blastocystes obtenus (Fouladi-Nashta et al., 2007). Chez la souris, l'administration d'un régime enrichi en acides gras polyinsaturés oméga 3 pendant quatre semaines avant la fécondation affecte significativement la distribution des mitochondries et les niveaux de calcium dans l'ovocyte et augmente la production de radicaux oxygénés (Wakefield et al., 2008).

1.1. Effets des acides gras sur la fonction ovarienne

Plusieurs études ont montré que la qualité de l'ovocyte avait une forte incidence sur la poursuite du développement embryonnaire après fécondation et donc sur le devenir de la descendance (Lonergan et al., 2003b). L'alimentation durant la période de développement des follicules à partir du moment où ils sortent de la réserve ovarienne (approximativement trois à quatre mois chez la vache) peut influencer les taux d'ovulation et la qualité des ovocytes. Cette dernière peut être améliorée chez les ruminants par le flushing (suralimentation temporaire), en particulier sur les animaux maigres (Robinson et al., 2006). Dans une autre étude, il a été montré que la supplémentation de génisses avec des acides gras (huile de palme, riche en C16 :0) augmentait significativement la teneur lipidique des complexes cumulus-ovocytes sans altérer leur composition en acides gras du fait d'un passage sélectif des acides gras saturés dans l'ovocyte (Zeron et al., 2001 ; Robinson et al., 2006). Chez la vache laitière, un régime enrichi en acides gras à longue chaîne (acides palmitique et oléique) augmente le nombre de follicules de classe 3–9 mm, ainsi que le diamètre du follicule préovulatoire (Lucy et al., 1991 ; Staples et al., 1998). Les effets positifs des acides gras sur la taille du follicule dominant ont été confirmés par plusieurs études (Mattos et al., 2000 ; Ambrose et al., 2006). Chez la brebis également, le nombre et la qualité des ovocytes sont augmentés lorsque les animaux sont nourris avec un régime enrichi en AGPI (DHA et EPA) (74,3 % versus 57 %) (Zeron et al., 2002). De plus, la composition en acides gras du fluide folliculaire et des cellules de cumulus est modifiée, plus de C18:2 et de DHA dans le lot AGPI que dans le lot contrôle. Par ailleurs, chez la vache, les AGPI favorisent davantage la croissance folliculaire que les AGMI (Bilby et al., 2006), tout comme la famille d'acides gras insaturés, n-3 ou n-6 (Ponter et al., 2006). Plus de petits follicules sont obtenus avec un régime riche en AGPI n-3.

Chez la vache, un régime enrichi en AGPI n-6 augmente la sécrétion de progestérone par les cellules de la granulosa (Wehrman et al., 1991) via une augmentation significative de la teneur en cholestérol dans le liquide folliculaire, les corps jaunes et le plasma (Hawkins et al., 1995 ; Lammoglia et al., 1996 ; Staples et al., 1998), le cholestérol servant de précurseur pour la synthèse de la progestérone par les cellules ovariennes (Grummer and Carroll, 1991). Une alimentation enrichie en acides gras stimule donc de façon non négligeable la fonction ovarienne dans l'espèce bovine, et ce d'autant plus que sa chaine carboné est longue et insaturée.

1.2. Effets des acides gras sur l'embryon

Peu de travaux ont testé l'effet d'une supplémentation en acide gras dans la ration alimentaire sur la qualité et le développement embryonnaire. Deux études récentes ont néanmoins montré un effet positif des AGPI (acides trans-octadécenoique, linoléique et linolénique) par comparaison aux AGS (acides palmitique et stéarique) sur la qualité des embryons produits *in vivo* chez la vache laitière (Thangavelu et al., 2007). Les embryons ont plus de blastomères et sont essentiellement de grade 1 et 2 avec un régime enrichi en AGPI par rapport à un régime enrichi en AGS. Les taux d'embryons sont améliorés de façon équivalente pour les deux familles d'AGPI, oméga 6 (a linoleique) et oméga 3 (a α linolénique) (Ponter et al., 2006 ; Cerri et al., 2009). Un résultat identique a été retrouvé *in vitro* à partir d'ovocytes collectés sur des femelles soumises à un régime enrichi en acides gras (acides palmitique, oléique et stéaroique), par comparaison à un régime maigre, et ce sans que la qualité des ovocytes collectés (grade équivalent) et le taux de fécondation soient modifiés (Fouladi-Nashta et al., 2007). Plus d'embryons dégénérés ont été collectés sur des vaches alimentées avec un complément en acide palmitique par comparaison à un apport en EPA et DHA (Childs et al., 2008). Par contre, ces auteurs n'ont pas vu au stade blastocyste deffet de l'alimentation sur l'expression de genes impliqués dans l'apoptose (BAX), les jonctions cellulaires (Cx43, E-CAD) et les PPARs. Entre les deux familles d'AGPI, oméga 6 (a linoleique) et oméga 3 (a α linolénique), les résultats sont équivalents (Ponter et al., 2006 ; Cerri et al., 2009). Ces résultats démontrent clairement l'importance du régime alimentaire en acides gras des femelles sur la qualité des embryons produits, même *in vitro*. D'autre part, l'état corporel initial est négativement corrélé aux effets d'un apport alimentaire riche en gras sur les taux d'ovocytes maturés *in vitro* et de blastocystes produits (Adamiak et al., 2005).

2. Les acides gras de l'ovocyte et de l'embryon

Toute étude exhaustive des lipides embryonnaires demeure limitée par les faibles quantités de matériel biologique des premiers stades du développement. Cependant, la possibilité d'obtenir en grande nombre des ovaires de mammifères domestiques dans les abattoirs a permis tout de même d'analyser la composition des principales classes de lipides des ovocytes (Ferguson and Leese, 1999 ; Zeron et al., 1999b ; Abd El Razek et al., 2000 ; McEvoy et al., 2000). La quantité de lipides dans l'ovocyte immature de ruminants (bovin, ovin) est environ 20 fois supérieure à celle observée dans l'ovocyte de souris (76 ng versus 4 ng) et deux fois moindre par rapport à celle d'un ovocyte de truie (160 ng). Chez les ruminants comme chez le porc, ils sont composés pour 50% de triglycérides, 20% de phospholipides, 20% de cholestérol et 10 % d'acides gras libres, avec majoritairement C16 :0, C18 :0 et C18 :1 (McEvoy et al., 2000). Les AGS représentent près de la moitié des acides gras, contre 30% pour les monoinsaturés et 20% pour les polyinsaturés, avec prédominance d'AG n-6 (a. linoléique et arachidonique), figure 13, (Zeron et al., 1999a). La quantité de triglycérides dans l'ovocyte immature constitue une réserve énergétique fondamentale pour le développement ultérieur de l'ovocyte et de l'embryon, comme l'indique la baisse de la teneur en triglycérides observée dans les ovocytes matures (Ferguson and Leese, 1999 ; Kim et al., 2001).

Dans les embryons bovins, Charpigny et al. (2003) ont montré par chromatograhie en phase gazeuse que, comme dans l'ovocyte (McEvoy et al., 2000), les acides palmitique (C16:0), stéarique (C18:0) et oléique (C18:1) étaient les trois acides gras majeurs des triglycérides et des phospholipides, pour des embryons au 7ème, 13ème et 16ème jours de développement (Charpigny et al., 2003). Précédemment, des quantités importantes d'acide myristique (C14:0) et myristoléique (C14:1) ont été rapportée comme constituant jusqu'à 40 % des acides gras de l'embryon bovin (Menezo et al., 1982 ; Sata et al., 1999). Les AGPI n-3 et n-6 les plus représentés dans l'embryon sont le DHA, qui représente jusqu'à 11 % des AG des phosphatidyléthanolamines pour les embryons de 16 jours, et les acides arachidonique et linoléique (Charpigny et al., 2003). Entre le 13ème et le 16ème jour de développement, les quantités d'acide arachidonique sont peu modifiées dans l'embryon, alors que cet acide gras est normalement mobilisé en quantité importante pour la synthèse des prostaglandines chez l'embryon de ruminants en fin d'élongation (Charpigny et al., 1997).

Bien que les rôles des AGPI dans le développement de l'embryon soient mal connus, il semble évident que les différentes classes d'acides gras conférent à l'ovocyte et à l'embryon

des propriétés et potentialités bien spécifiques, et que la régulation de leur teneur soit primordiale au maintien de ces fonctions. Peu d'études ont envisagé l'importance structurelle et fonctionnelle de ces différentes catégories de lipides et d'acides gras au cours du développement pré-implantatoire de l'embryon, alors que de nombreux travaux ont établi l'importance du rôle des acides gras sur la croissance et la différenciation cellulaires (Sellmayer et al., 1996 ; Hardy et al., 1997).

Chez l'homme, les embryons qui sont capables de se développer au-delà du stade 4 cellules contiennent plus d'acides gras insaturés (acides linoléique et oléique) et moins d'acides gras saturés que les embryons qui n'atteignent pas ce stade (Haggarty et al., 2006), indiquant un métabolisme lipidique intense à ce stade du développement où l'embryon a un besoin considérable d'augmenter ses surfaces cellulaires.

3. La production d'embryons *in vitro* et milieux de culture

L'intérêt de produire des embryons *in vitro* est double. Sur un plan fondamental, elle permet de connaître des phénomènes et mécanismes dont l'approche *in vivo* est difficile, comme la folliculogénèse, la maturation des gamètes, la fécondation et le développement embryonnaire précoce. Elle permet d'évaluer spécifiquement l'influence de facteurs externes, comme des facteurs de croissance, des vitamines, des acides gras ou encore des agonistes ou antagonistes fonctionnels, après ajout dans les milieux *in vitro*. Sur un plan appliqué, couplée à l'OPU (ovum pic up) et au transfert d'embryon, elle permet d'accélérer la diffusion du progrès génétique grâce à la production en masse d'embryons à partir de femelles sélectionnées. Elle permet également de faire produire des embryons à des femelles infertiles pour cause de pathologie du tractus génital et de reconstruire plus rapidement un cheptel en obtenant une dernière descendance à partir de femelles qui devraient être abattues pour des raisons sanitaires. L'application de cette biotechnologie sur le terrain est d'autant plus importante si elle peut également être couplée à la cryoconservation des ovocytes et des embryons.

Les techniques de culture *in vitro* des embryons ont considérablement évolué depuis les premiers essais de production dans l'espèce bovine (Goto et al., 1988 ; Aoyagi et al., 1989 ; Marquant-Le Guienne et al., 1989 ; Voelkel and Hu, 1992). Différents systèmes ont été testés. Par exemple, des cultures sur tapis cellulaires (Massip et al., 1993 ; Rizos et al., 2001), des cultures en milieu défini en absence de sérum (Mermillod et al., 1992 ; Dinnyés et al., 1996 ; Abe et al., 2002 ; Hoshi, 2003 ; Pereira et al., 2007 ; Gomez et al., 2008), substance connue pour augmenter le taux de triglycérides des embryons par rapport à un embryon

produit *in vivo* (Ferguson and Leese, 1999 ; Sata et al., 1999), ainsi qu'un culture dans des oviductes de brebis (Enright et al., 2000 ; Rizos et al., 2002b). D'autres part, des ajouts d'agents antioxydants comme le β-mercaptoethanol (Feugang et al., 2004 ; Hashem et al., 2006) ont également été réalisés pour protéger l'embryon des phénomènes de peroxydation induit par la culture *in vitro* (Johnson and Nasr-Esfahani, 1994 ; Fujitani et al., 1997) Les taux de succès obtenus sont de l'ordre de plus de 90% des ovocytes qui atteignent le stade de métaphase II et, entre 30 et 40% de zygotes qui vont jusqu'au stade blastocystes et, entre 10 et 18% de naissance après transfert à l'état frais (figure 14).

3.1. Effet du milieu de maturation sur la qualité embryonnaire

Les ovocytes maturés *in vivo* et *in vitro* n'ont pas la même compétence au développement, même si ces derniers ont été recueillis sur des femelles juste avant le pic de LH pour être ensuite maturés *in vitro* (Rizos et al., 2002b). Ces dernières décennies, de nombreux travaux ont été réalisés afin d'optimiser les milieux de maturation *in vitro*. Des cocktails d'hormones sont couramment ajoutés, comme la FSH (follicle-stimulating hormone), l'EGF (Epidermal Growth Factor), IGF-I (Insulin-like growth factor 1) pour améliorer la maturation des ovocytes et l'expansion des cellules cumulus, et améliorer ainsi la compétence au développement des ovocytes chez les bovins (Harper and Brackett, 1993 ; Lonergan et al., 1996 ; Rieger et al., 1998 ; Donnay et al., 2004) et chez la souris (De La Fuente et al., 1999). L'ajout de leptine pendant la maturation permet également d'augmenter le pourcentage d'ovocytes compétents au développement et de réduire le taux d'apoptose des blastocystes (Harper and Brackett, 1993 ; Lonergan et al., 1996 ; Rieger et al., 1998 ; Boelhauve et al., 2005). Par contre, l'ajout d'acides gras saturés, comme l'a. palmitique et l'a. stéarique, pendant la maturation a des effets négatifs sur la compétence au développement des ovocytes chez les bovins, tandis que l'acide oléique n'a aucun effet (Leroy et al., 2005b). Ces deux acides gras sont fortement présents dans le fluide folliculaire de vaches à fertilité réduite (Leroy et al., 2004 ; Leroy et al., 2005b). Récemment, Shehab-El-Deen et al. (2009) ont montré que l'ajout de l'un de ces deux acides pendant la maturation ovocytaire avait des effets négatifs sur la cryotolérance des embryons bovins (Shehab-El-Deen et al., 2009).

3.2. Effet de l'ajout de sérum durant le développement embryonnaire

Les effets favorables du sérum sur le développement embryonnaire ont été largement rapportées dans la littérature (Pinyopummintr and Bavister, 1994 ; Dobrinsky et al., 1996 ; Van Langendonckt et al., 1997). Le sérum de veau fœtal (SVF) ajouté au milieu synthétique

mSOF (modified synthetic oviductal fluid) a des propriétés embryotrophiques conduisant à l'accroîssement de la capacité des zygotes à se différencier en blastocystes et à l'augmentation significativement du nombre total de blastomères dans les embryons (Pinyopummintr and Bavister, 1994 ; Dobrinsky et al., 1996 ; Van Langendonckt et al., 1997). Par contre, ajouté trop tôt au milieu de culture, c'est à dire dès les premiers stades du développement embryonnaire (stades 2-8 cellules), le sérum réduit significativement la formation de blastocystes bovins éclos (Pinyopummintr et al. 1991).

Plusieurs études ont porté sur l'influence du sérum sur l'accumulation de lipides, et les variations de la composition des acides gras dans les ovocytes et les embryons. La présence de sérum dans les milieux de culture est reconnue pour favoriser l'accumulation des lipides dans l'embryon (Thompson et al., 1995 ; Abe et al., 2002 ; Abe and Hoshi, 2003 ; Leroy et al., 2005a). La quantité de triglycérides dans des embryons bovins est doublée en présence de sérum dans le milieu de culture, 62 ng par embryon contre 33 ng pour un embryon *in vivo* (Ferguson and Leese, 1999) et est trouvée égale à 80 % de la masse totale des acides gras des embryons produits *in vitro* (Charpigny et al., 2003). Bien que les mécanismes de l'accumulation de triglycérides ne soient pas connus, Ferguson et Leese (1999) ont suggéré que les triglycérides pourraient être prélevés à partir du sérum par pinocytose, mais des résultats obtenus après incorporation d'acide oléique radioactif suggèrent plutôt que le sérum stimulerait la synthèse des triglycérides au sein de l'embryon (Abd El Razek et al., 2000). L'inconvénient majeur de cet excès de lipides est la diminution de la cryotolérance des embryons (Leibo and Loskutoff, 1993a ; Plante and King, 1994 ; Abe et al., 2002 ; Reis et al., 2005 ; Pereira et al., 2007) (chapitre IV.3). La quantité de phospholipides est inversement diminuée dans les embryons produits avec sérum comparée à celles des embryons produits *in vivo* Abd El Razek et al., 2000 (figure 15).

Afin de palier aux inconvénients précités, l'albumine est souvent utilisée comme source alternative de protéines et de substrats énergétiques nécessaires au développement de l'embryon (Pemble and Kaye, 1986), mais les taux de blastocystes obtenus chez les bovins sont généralement inférieurs avec un milieu uniquement supplémenté en BSA (bovine serum albumine), comparativement au milieu BSA enrichi par exemple avec du sérum de vache en chaleur (ECS, Estrous Cow Serum ; Shamsuddin et al., 1994).

Le sérum aurait donc différents effets sur les embryons, néfaste aux premiers stades, il favoriserait le développement ultérieur, aux prix de modifications métaboliques pouvant altérer le métabolisme (en particulier le métabolisme lipidique) et par là même, la viabilité et

la cryorésistance des embryons. Quoiqu'il en soit, le sérum présente des inconvénients (risque sanitaire, variabilité des lots,…) qui plaident largement pour des solutions alternatives à son utilisation.

3.3. Coculture sur cellules d'oviductes et autres types cellulaires

Les premiers systèmes efficaces de développement *in vitro* étaient basés sur la coculture des embryons avec des cellules d'oviducte, suivant l'hypothèse que l'oviducte devait certainement jouer un rôle très important dans les mécanismes périconceptionnels et préimplantatoires. Pour des raisons sanitaires et de reproductibilité, mais aussi pour faciliter la mise en œuvre de la technique, ces systèmes ont évolué vers la coculture avec des lignées cellulaires : cellules BRL (Buffalo Rat Liver) ou cellules Vero (Menck et al., 1997 ; Pegoraro et al., 1998).

3.3.1. Coculture avec des cellules d'oviductes

Les cellules d'oviductes ont été utilisées en coculture avec de nombreux milieux, comme par exemple le milieu TCM-199 additionné de sérum, dans le but de favoriser le développement embryonnaire chez diverses espèces (Gandolfi and Moor, 1987 ; Thibodeaux et al., 1992 ; Feng et al., 1996). Dans chacun des cas, le système de coculture s'est avéré efficace pour lever le blocage caractéristique associé au développement *in vitro* au stade 8-16 cellules, stade où l'embryon bovin est en transit dans l'oviducte (Telford et al., 1990), et produirent des embryons viables après 7 jours de coculture (Thibodeaux et al., 1992).

Les mécanismes par lesquels les cellules somatiques agissent sur le développement embryonnaire *in vitro* demeurent encore obscurs. Certaines protéines secrétées *in vivo* par l'oviducte ont été identifiées dans les cultures *in vitro* chez plusieurs espèces. Wegner et Killian (1991) ont mis en évidence une protéine de 97 kDa qui correspond à la taille de l'oEGP (oviduct specific estrus-associated glycoproteins), protéine sécrétée durant la période de l'œstrus (Wegner and Killian, 1991). Plusieurs de ces protéines adhèrent à la zone pellucide des embryons et peuvent aussi être séquestrées dans le cytoplasme (Bavister, 1995). La présence de ces protéines pourrait améliorer la viabilité de l'embryon en agissant d'une part, précocement, sur les premières divisions cellulaires, grâce à un facteur de faible poids moléculaire (inférieur à 10 kDa), et d'autre part, ultérieurement, du stade 8 cellules au stade blastocyste, par un facteur de poids moléculaire supérieur à 10 kDa (Mermillod et al., 1993).

L'oviducte synthétise quasi toutes les classes de lipides, à savoir les phospholipides, les triglycérides, les acides gras libres, le cholestérol libre et estérifié (Henault and Killian, 1993b ; Grippo et al., 1994 ; Menezo and Guerin, 1997), signe d'un métabolisme lipidique

très actif au sein de l'oviducte (Henault and Killian, 1993a), en quantité cependant plus faible par rapport à celles observées dans le sérum (Menezo and Guerin, 1997). Des cultures d'explants d'oviducte bovin ont permis de mettre en évidence une synthèse lipidique différentielle avec plus de phospholipides (phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine et phosphatidyl inositol) synthétisés au niveau de l'ampoule que de l'isthme (Henault and Killian, 1993a), ce qui pourrait influencer la composition lipidique des embryons dès les premiers stades de développement, notamment au niveau des membrannes cellulaires.

L'oviducte permet de lutter contre la peroxydation des lipides induite par les radicaux libres oxygénés, qui modifie en particulier la fluidité des membranes (Guerin et al., 2001). En effet, l'oviducte produit grâce à un certain nombre de protéines qui sont impliquées dans la lutte contre les radicaux libres tels que SOD, catalase, (Mermillod et al., 1993 ; Lee et al., 2004 ; Goncalves et al., 2008). Par ailleurs, comme toute autre cellule, les cellules de l'oviducte consomment de l'oxygène, ce qui réduit la concentration en oxygène dans le microenvironnement de l'embryon et donc participe aussi à la protection contre la peroxydation. Ces activités antioxydantes pourraient donc représenter une explication supplémentaire des effets positifs de l'oviducte sur le développement précoce.

L'oviducte agit donc sur le développement embryonnaire par différentes voies dont certaines sont spécifiques de ces cellules (oEGP et sans doute d'autres facteurs embryotrophes), alors que d'autres relèvent de mécanismes cellulaires généraux (concentration d'oxygène, protection contre les radicaux libres).

3.3.2. Coculture avec d'autres types cellulaires

Des travaux effectués dans différentes espèces animales ainsi que chez l'Homme suggèrent que la nature des types cellulaires ainsi que les espèces étudiées ne sont pas des prérequis essentiels pour l'action embryotrophe des supports de coculture embryonnaire (Bongso et al., 1991). La coculture en présence de cellules de différentes origines telles que l'utérus, le cumulus, l'ovaire, le rein, la rate et l'embryon de poulet peuvent avoir des effets bénéfiques sur les premiers stades de développement ainsi que sur la viabilité d'embryons de diverses espèces (Bongso et al., 1991 ; Feng et al., 1996). La coculture avec des fibroblastes utérins peut également améliorer les taux de développement des embryons comparativement aux milieux de culture seuls et ce, même en absence des cellules elles-mêmes lors de l'utilisation de milieux conditionnés (Kuzan and Wright, 1981). Les cellules Vero, cellules épithéliale de rein du singe vert d'Afrique, sont des cellules très utilisées dans les systèmes de coculture. C'est une lignée cellulaire utilisée dans la production de vaccins, donc très

contrôlée pour la présence de virus et autres contaminants, qui se cultive facilement dans différents milieux tout en conservant ses propriétés physiologiques (Guerin and Nicollet, 1997). Des taux de blastocystes supérieurs à 50% ont été rapportés avec ces lignées (Menezo et al., 1990). Ainsi, plusieurs types cellulaires sont capables de mimer tout ou partie des effets embryotrophes de l'environnement maternel tubaire. L'existence de facteurs spécifiques capables de réguler les étapes clés du développement précoce reste toutefois une question importante pour une meilleure maîtrise du développement *in vitro*.

CHAPITRE IV : Embryon et cryoconservation

1. Importance de la cryoconservation des embryons

La possibilité de cryoconserver les embryons à très basse température pendant une longue période présente de nombreux intérêts. Elle permet une meilleure gestion des troupeaux de receveuses et facilite la diffusion des embryons en dissociant, dans le temps et dans l'espace, la production des embryons et leur réimplantation dans les receveuses, ce qui est un facteur très important pour le développement de la transplantation embryonnaire. Elle place donc le commerce d'embryons à l'échelon international tout en diminuant considérablement les coûts d'exportation de la génétique. La création de **banques d'embryons congelés** peut également être un moyen efficace pour la sauvegarde patrimoniale de certaines races menacées de disparition. Lors de maladies ou de catastrophes impliquant la disparition des troupeaux, la cryoconservation des embryons permet la régénération plus rapide des lignées. Les avantages **économiques**, **sanitaires** et **génétiques** apportés par cette technique sont donc très importants pour les éleveurs et les sélectionneurs.

Les premières conservations d'embryons par le froid chez la vache datent des années 1970 (Wilmut and Rowson, 1973). Cela consistait en un refroidissement lent, 0,2°C par minute en présence d'un cryoprotecteur, le DMSO (diméthylsulfoxide) jusqu'à -30°C, puis la conservation des paillettes d'embryons dans l'azote liquide à -196°C. Depuis, différentes méthodes de cryoconservation, impliquant différents cryoprotecteurs et différentes courbes de refroidissement ont été décrites avec des efficacités variables selon les espèces et les stades embryonnaires. Lors du transfert des embryons dans une receveuse, la possibilité de mettre en place, par voie cervicale, le contenu entier de la paillette sans retrait des cryoprotecteurs, ni tri des embryons, a été un apport décisif pour le développement de la technique de cryoconservation sur le terrain, le geste s'apparentant alors à l'insémination artificielle, technique déjà en place (Renard, 1982). Après **transfert « direct »**, des taux de gestation supérieurs à 50 % ont été obtenus. Le transfert d'embryons congelés en ferme a ainsi connu un essor significatif à partir de 1982, pour dépasser le millier en 1983 (Nibart and Thibier, 1987).

En 2005, plus de 600 000 embryons obtenus *in vivo* ont été transférés dans le monde entier, dont environ la moitié (280 000) a été transférée après cryoconservation. Dans cette même année, environ 265 000 embryons produits *in vitro* ont été transférés, dont environ un tiers (82 500) a été transféré après cryoconservation (figure 16) (Thibier, 2006). En Europe, la cryoconservation de l'embryon bovin est largement employée sur le terrain, avec 49 % des

transferts réalisés en 2007 (n = 97 292) à partir d'embryons produits *in vivo* et 59% à partir d'embryons produits *in vitro* (n = 5 832) (Merton, 2008).

2. Les différentes techniques de cryoconservation

2.1. Congélation lente

La grande majorité des embryons de mammifères est congelée à l'aide de méthodes conventionnelles utilisant le glycérol ou l'éthylène glycol comme cryoprotecteurs, un refroidissement **lent** et contrôlé, et des vitesses relativement rapides de réchauffement (Palasz et al., 1996). C'est la congélation lente. Cette technique est basée sur l'**équilibration** progressive entre le ou les cryoprotecteurs et le compartiment aqueux de l'embryon. La vitesse de refroidissement est lente pour permettre une déshydratation optimale des cellules jusqu'à -25 ou -30°C, à la suite de quoi les paillettes sont plongées dans l'azote liquide. Cette technique implique une **induction de la cristallisation** du milieu vers -6 ou -7°C afin d'éviter les oscillations de température en surfusion. Les mouvements de l'eau dépendent de plusieurs paramètres liés à la cellule : le rapport volume-surface, la conductivité hydraulique et l'énergie d'activation). Cette technique est facile à mettre en œuvre, ce qui peut permettre à une personne peu expérimentée de pratiquer cette méthode. Les cryoprotecteurs sont utilisés à des concentrations relativement peu toxiques, 1 à 1,5 M. De plus, la possibilité de réaliser des transferts directs évite d'avoir recours systématiquement à des spécialistes lors du dégel pour juger de l'état des embryons, sans que les taux de mises bas soient inférieurs à ceux obtenus après élimination des cryoprotecteurs (Baril et al., 2001a ; Martínez et al., 2002). Par contre, cette technique est très coûteuse en temps et en argent, puisqu'elle nécessite l'achat d'un congélateur programmable pour le refroidissement. D'autre part, cette technique ne convient pas à toutes les espèces, notamment l'espèce porcine, ni à tous les stades de développement. C'est cependant la technique classiquement utilisée sur le terrain pour la congélation des embryons bovins, caprins et ovins produits *in vivo*, avec plus de 74 % des embryons bovins congelés / décongelés avec cette méthode en Europe (Heyman and Joly, 2002 ; Guignot, 2003).

2.2. La vitrification

La vitrification est une technique de « non équilibre » à la différence de la congélation lente. Elle permet d'éviter au maximum la formation des cristaux de glace au cours du refroidissement en transformant la phase liquide du cytoplasme cellulaire en phase solide amorphe : **état vitreux**. La solidification amorphe est rendue possible par une viscosité très

élevée du milieu, due à une forte concentration en cryoprotecteur (6 à 7,5 M) et une chute brutale de la température (environ 2500°C/min). Cette technique a été mise au point afin de répondre à des caractéristiques spécifiques d'embryons à certains stades, issus de production *in vitro* ou provenant de certaines espèces. Elle a également été développée chez les petits ruminants afin d'essayer de limiter le coût de la transplantation embryonnaire, qui représente un facteur limitant chez ces espèces par rapport à la valeur de l'animal (Thibier, 2000). Cette technique ne nécessite pas d'équipements coûteux, et les embryons peuvent être vitrifiés au fur et à mesure de leur collecte. Le protocole consiste à plonger les embryons dans des bains successifs à concentration croissante de cryoprotecteurs, puis à déposer très vite les embryons conditionnés en paillettes de 0,25 mL dans l'azote liquide (Rall and Fahy, 1985 ; Scheffen et al., 1986), ce qui réduit l'exposition des embryons aux gammes de température induisant le "***cold shock***" (Massip, 2003). La survie des embryons les plus fragiles comme les embryons produits *in vitro*, sensibles au refroidissement en milieu liquide, s'en trouve améliorée (Massip et al., 1995 ; Vajta, 2000). Par contre, les très fortes concentrations de cryoprotecteurs qui doivent être utilisées pour permettre la vitrification sont hautement toxiques pour les embryons. Le temps de passage dans chacun des bains, surtout le dernier est donc très critique : la déshydratation de l'embryon doit s'arrêter à un temps précis, dépendant de la vitesse de pénétration des cryoprotecteurs et de leur concentration ainsi que de la température d'incubation. Il faut donc respecter scrupuleusement les temps imposés, d'où la nécessité d'avoir une main experte pour réaliser cette technique.

2.3. Vitrification rapide (OPS) et ultra rapide

La mise au point des paillettes OPS (**open pulled straw**) (Vajta et al., 1998 ; Vajta, 2000) et SOPS (super OPS) (Isachenko et al., 2003) permettant des descentes ultrarapides en température a amélioré la vitrification. Les paillettes OPS sont des paillettes de 0,25 mL, classiques, qui ont été étirées de façon à réduire leur diamètre et l'épaisseur de leur paroi. Ainsi, le volume de l'échantillon cryoconservé est plus faible, 2 µl versus 250 µl pour la paillette standard, ce qui augmente les vitesses de refroidissement des échantillons (environ 20 000°C/min). Comme pour la vitrification classique, l'OPS implique l'utilisation de cryoprotecteurs à de fortes concentrations (6 M). Cette technique a permis de conserver l'embryon de porc (Berthelot et al., 2000 ; Berthelot et al., 2007), ainsi que l'embryon de hamster (Lane et al., 1999). Cette technique a également donné des résultats encourageants pour la cryoconservation d'ovocytes chez le bovin (Vajta et al., 1998). Cependant, ces techniques de refroidissement ultra rapide nécessitent des mains encore plus expertes que

pour la vitrification traditionnelle et le stockage des embryons vitrifiés en paillettes OPS, en gouttes ou sur cryoloop reste quelque peu problématique. D'autre part, les paillettes OPS ne sont généralement pas fermées : les risques de contamination des embryons au contact de l'azote liquide et pendant leur stockage ne sont donc pas nuls. Ce problème a été résolu par une nouvelle génération de paillettes, scellées cette fois, les CryoTip^{TM} (Kuwayama et al., 2005) et les paillettes haute sécurité 'VHS', évitant tout risque sanitaire, ce qui est primordial lors de la commercialisation et l'export des cellules cryoconservées.

3. Facteurs affectant l'efficacité de la cryoconservation

3.1. Origine des embryons

Plusieurs études montrent que les embryons produits ***in vitro*** et congelés survivent moins bien que ceux qui sont produits ***in vivo*** (Hasler et al., 1995 ; Fair et al., 2001 ; Martínez et al., 2006). Chez la vache, seulement 30 % de survie embryonnaire ont été obtenus après transfert d'embryons produits *in vitro* et vitrifiés (Vajta et al., 1997a ; Lane et al., 1998 ; Traldi, 2000) et 42 % après congélation lente (Hasler et al., 1995), alors que le taux de mise bas dans l'espèce bovine à partir d'embryons produits *in vivo*, et congelés, n'est que légèrement inférieur à celui obtenu après transfert des embryons à l'état frais (Niemann, 1991 ; Hasler, 2001; Martinez et al., 2002). Pour les embryons *in vivo*, un effet race a été mis en évidence (Steel and Hasler, 2004).

Les embryons produits *in vitro* différent énormément de ceux produits *in vitro* de par leur structure cellulaire (Crosier et al., 2000, 2001 ; Fair et al., 2001) et leur métabolisme (Khurana and Niemann, 2000 ; Thompson, 2000). En effet, les embryons produits *in vitro* ont, comparés aux embryons produits *in vivo,* un espace périvitellin plus grand, une plus grande richesse en grandes vacuoles, un nombre réduit de mitochondries, des jonctions entre les cellules trophoblastiques moins nombreuses, une densité plus faible due à un rapport lipides / protéines plus élevé et plus de triglycérides que de phopholipides (Iwasaki et al., 1990 ; Leibo and Loskutoff, 1993a ; Abd El Razek et al., 2000 ; Crosier et al., 2000, 2001) (voir figure 17 et tableau 2), ce qui peut expliquer leur forte sensibilité à la congélation. En effet, par exemple, la teneur en lipides cytoplasmiques des embryons et l'accumulation des gouttelettes lipidiques pendant la culture *in vitro*, induite notamment par la présence de sérum dans le milieu (chapitre III.3.2), sont corrélées à une faible cryotolérance (Abe et al., 2002 ; Reis et al., 2005 ; Pereira et al., 2007).

3.2. Stade de développement

Les stades avancés de développement embryonnaire tolèrent généralement mieux la cryoconservation. Dans les espèces bovine, porcine et caprine, le taux de mise bas obtenu à partir de blastocystes produits *in vivo* ou *in vitro* et congelés, est supérieur à celui obtenu à partir de morula. Dans l'espèce bovine, 40 % de mise bas sont obtenus à partir de blastocystes produits *in vivo* et congelés contre seulement 18 % à partir de morula (Martínez et al., 2002).

Chez le porc, 32 % de mise bas sont obtenus avec des embryons *in vivo* vitrifiés au stade blastocyste contre seulement 13 % au stade morula (Berthelot et al., 2001 ; Berthelot et al., 2002 ; Bi et al., 2009). Il en est de même dans l'espèce caprine (Chemineau et al., 1986 ; Li et al., 1990). Par contre, chez l'homme, comme chez la souris, les embryons plus jeunes sont plus résistants au froid (Vanderzwalmen et al., 1999 ; Mukaida et al., 2003) : des taux de grossesse de 29 et 25 % ont été obtenus après transfert d'embryons vitrifiés, respectivement, au stade morula à J 4 et jeunes blastocystes à J 5, alors que seulement 8 % ont été obtenus à partir du stade blastocyste à J 6. Il semble que la cavité blastocoelique et la grande quantité de liquide qu'elle renferme soient un frein à la bonne cryconservation de l'embryon humain. En effet, après contraction artificielle du blastocoele, le taux de survie embryonnaire des blastocystes et blastocystes expansés à J 5 est de 20,5 % contre seulement 4,5 % pour des blastocystes intacts (Vanderzwalmen et al., 2002).

3.3. Espèce

Les travaux de recherche sur la cryoconservation de l'embryon bovin sont de loin les plus nombreux (Vajta, 2000 ; Massip, 2001). Chez la brebis, la vitrification et la congélation lente d'embryons produits *in vivo* donnent de très bons résultats après transfert, de l'ordre de 50 à 60 % de mise bas (Mermillod et al., 1999 ; Baril et al., 2001b ; Dattena et al., 2004). Moins de travaux sont disponibles chez la chèvre ; la vitrification semble toutefois donner de moins bons résultats que la congélation lente dans cette espèce, 39 % versus 55 % de mise bas (Baril et al., 2001b). Chez les petits ruminants, l'OPS permet d'obtenir 55 à 64 % de survie embryonnaire avec des embryons produits *in vivo* (Branca et al., 2000 ; Dattena et al., 2000 ; El-Gayar and Holtz, 2001 ; Dattena et al., 2004). Chez les porcs, seule la technique OPS permet d'obtenir de relativement bons résultats, jusqu'à 32 % de survie à partir de blastocystes (n = 200) (Vajta et al., 1997b ; Berthelot et al., 2001 ; Berthelot et al., 2002). Chez les équins, la présence d'une capsule protéique (Betteridge, 1989) limite l'entrée des cryoprotecteurs dans l'embryon ce qui réduit les chances de survie de ces embryons après congélation / décongélation.

La technique de cryoconservation utilisée doit donc être adaptée à l'espèce, à la race, à l'origine (*in vivo* vs. *in vitro*) et au stade de développement des embryons.

4. Impact direct des lipides sur la survie au froid

4.1. Ajout d'AGPI

Ces dernières années, de nombreux travaux ont rapporté l'accumulation excessive de lipides intracytoplasmiques dans l'embryon en culture et essayer d'y remédier, puisque cette accumulation est en lien direct avec une plus grande sensibilité de ces embryons à la congélation comparée à celle de leurs homologues produits *in vivo* (Leibo and Loskutoff, 1993b ; Plante and King, 1994 ; Massip et al., 1995). Certains auteurs ont proposé de modifier l'accumulation des lipides dans les embryons en ajoutant des acides gras insaturés qui sont connus pour réduire la quantité de triglycérides dans les adipocytes (Park et al., 1999) en inhibant l'expression de plusieurs gènes codant pour des enzymes lipogéniques (Peterson et al., 2003 ; Granlund et al., 2005). Hochi et al (1999) ont obtenu des embryons bovins plus résistants au froid après ajout de BSA enrichi avec 0,3% d'acide linoléique. De même, l'ajout de 100 µM d'acide linoléique conjugué (ALC t10, c12) dans le milieu de culture en présence de 10% de sérum de vache en chaleur a amélioré la résistance au froid des embryons bovins, sans affecter le taux de développement des blastocystes (Diez et al., 2001 ; Abe et al., 2002 ; Pereira et al., 2007). Ces auteurs ont remarqué une diminution de la taille des gouttelettes lipidiques suite à l'ajout d'ALC. Des acides gras polyinsaturés, C20: 4n-6 (acide arachidonique) et C20: 5n-3 (EPA) ont également des effets positifs sur la résistance à la cryoconservation des embryons lorsqu'ils sont ajoutés dans le milieu de maturation (Marques et al., 2007). De même, un apport de DHA et d'EPA dans l'alimentation permet une meilleure résistance des ovocytes au froid par abaissement de la température de cristallisation dans la membrane ovocytaire (Zeron et al., 2002).

Les acides gras insaturés doivent jouer un double rôle. Comme dans les adipocytes, ils doivent agir sur le stockage des triglycérides, puisque Peirera et al. (2007) ont observé une modification de la taille des gouttelettes lipidiques. Cela permettrait une meilleure diffusion des cryoprotecteurs dans les cellules et une meilleure protection des organites cellulaires profonds. Au niveau membranaire, il peut y avoir une incorporation directe des AGPI qui se traduirait par une augmentation de la fluidité et donc une amélioration de la résistance à la cryoconservation (Pereira et al., 2008). Cette hypothèse est en accord avec une observation faite par Zéron et al. (2001) sur la composition en acides gras d'ovocytes bovins en fonction de la saison, et avec de nombreuses études sur la composition lipidique des poissons en

réponse aux variations de température (Hazel and Sellner, 1979 ; Farkas et al., 1980 ; Tocher et al., 2004). En hiver, les ovocytes et les cellules de granulosa de vaches sont plus riches en AGPI, alors qu'en été, ils sont plus riches en AGMI. Parallèlement, un meilleur taux de développement embryonnaire *in vitro* et un meilleur taux de conception sont obtenus en hiver. (Zeron et al., 2001). Cette accumulation d'AGPI dans les ovocytes et les cellules de granulosa permettrait donc de mieux supporter les basses températures, phénomène souvent observé au niveau des membranes biologiques (Crowe et al., 1989). Chez la truite arc-en-ciel et la carpe, l'activité des désaturases et élongases augmente significativement lorsque la température du milieu extérieur diminue, conduisant à une augmentation des AGPI des phospholipides membranaires (Sellner and Hazel, 1982 ; Tiku et al., 1996 ; Tocher et al., 2004). Chez les mammifères, les mécanismes restent encore à élucider.

4.2. Délipidation des embryons

Pour améliorer la survie embryonnaire après cryoconservation, plusieurs études ont proposé de réduire mécaniquement la quantité de lipides stockés dans les embryons au stade 1 cellule (Nagashima et al., 1994 ; Ushijima et al., 1999 ; Diez et al., 2001). Chez le porc, la centrifugation puis délipidation par micromanipulation au stade 1 cellule d'embryons produits *in vivo* ont permis d'augmenter le taux de survie après refroidissement et réchauffement par comparaison à celle d'embryons non délipidés (Nagashima et al., 1994 ; Nagashima et al., 1995). Ces auteurs avaient par ailleurs vérifié que centrifugation et délipidation n'altéraient pas le développement des embryons. Les mêmes résultats ont été obtenus par Diez et al (2001) avec des embryons bovins produits *in vitro*, centrifugés, délipidés et cryonconservés par congélation lente.

La délipidation peut être également réalisée chimiquement par addition d'ethosulphate phénazine au milieu de développement, ce qui améliore la survie des embryons bovins après vitrification et congélation lente des blastocystes (Barcelo-Fimbres and Seidel, 2007 ; Barcelo-Fimbres et al., 2009). Chez le porc, l'ajout d'oxaloacétate ou de forskoline, molécules qui stimulent le catabolisme des triglycérides via l'activation de l'adénylate cyclase, conduit à une délipidation partielle des embryons et à une augmentation de leur cryorésistance (Men et al., 2006).

Il semble donc bien que le métabolisme lipidique soit le cœur de la régulation de la capacité des embryons à résister aux méthodes de cryoconservation. Il est possible de modifier la composition lipidique de l'embryon par des méthodes physiques ou chimiques mais une meilleure compréhension du métabolisme lipidique de l'embryon, de sa régulation

et de ses altérations en conditions *in vitro* sera la clé de l'amélioration physiologique des conditions de production et permettra de proposer des critères d'évaluation de la qualité embryonnaire.

OBJECTIFS DE LA THESE

D'après les données de la bibliographie, la composition lipidique des embryons, qui peut être modifiée par des méthodes physiques ou chimiques, est un élément primordial dans l'aptitude à la cryorésistance de l'embryon, mais les mécanismes n'en sont pas connus. Cette thèse a eu pour objectif principal de mieux connaître le profil transcriptomique des embryons produits dans différentes conditions de développement, par une approche gène candidat. Deux axes ont orienté nos recherches. Le premier est lié au stockage excessif de triglycérides dans les embryons *in vitro* qui pourrait gêner la pénétration des cryoprotecteurs jusqu'au cœur des organites cellulaires, et donc empêcher que l'embryon soit correctement protégé des basses températures lors de la cryoconservation. Le deuxième est en rapport avec la composition membranaire en lipides plus ou moins insaturés qui sont responsables de la fluidité de la membrane et donc sûrement du passage sélectif des cryoprotecteurs à travers elle, et de sa sensibilité au refroidissement. Et les embryons bovins *in vitro* sont connus pour avoir moins de phospholipides.

Dans un premier temps, nous avons mis en place et validé une méthodologie pour l'étude des gènes candidats par RT-QPCR à partir du modèle « embryon bovin J7/J8 » (**expériences préliminaires**).

La recherche et la validation d'un marqueur génique du stockage des triglycérides ont ensuite été réalisées à partir d'embryons produits dans différents milieux de développement (**article1**). Les milieux qui ont été étudiés sont le milieu mSOF avec ou sans sérum, la coculture (Boec), la supplémentation en DHA (acide gras polyinsaturé), le développement dans des oviductes de brebis et *in vivo*.

Ce marqueur génique validé, trois acides gras polyinsaturés ont été testés à différentes concentrations sur la survie embryonnaire *in vitro*, puis sur l'expression d'un ensemble de gènes ayant un rôle dans le métabolisme lipidique de l'embryon bovin, au niveau de la synthèse des acides gras et des triglycérides, de la désaturation et oxydation des acides gras, du stockage des triglycérides et de la régulation de ces mécanismes (**article 2**).

Pour valider nos résultats de transcriptomique, des transferts dans des femelles receveuses ont été réalisés et la survie *in vitro* des embryons après gel / dégel a été évaluée (**résultats complémentaires**).

Nous avons, pour conclure cette thèse, choisi un des 3 acides gras précédemment ajoutées aux milieux de développement, le DHA, et fait un suivi de l'évolution des transcrits

des gènes précités au cours de la maturation ovocytaire et du développement embryonnaire préimplantatoire (**article 3**).

EXPERIENCES PRELIMINAIRES

Mise au point des techniques de RT-QPCR et analyse des résultats de quantification de transcrits

Introduction

Les techniques de PCR et de RT-QPCR sont apparues très rapidement comme des outils indispensables en biologie moléculaire et réplication ciblée *in vitro*. Elles sont en effet les méthodes de quantification les plus sensibles (Brown et al., 1999). La mise au point de ces techniques sur des transcrits d'embryons bovins produits *in vivo* et *in vitro* à J7/J8 se révèle être nécessaire pour analyser le potentiel transcriptionnel embryonnaire, mais elles sont très délicates à mettre en place. L'objectif de ces expériences préliminaires à mon travail de thèse a été d'étudier la faisabilité de ces techniques sur des embryons bovins J7/J8, de voir leur efficacité et leur répétabilité entre répliques, ainsi que leurs limites. Deux points sont essentiels, l'extraction des ARN et leur rétro-transcription. Afin de minimiser l'effet opérateur, nous avons choisi dans un premier temps une extraction sur kit commercial. La normalisation des résultats est également importante : nous avons choisi de tester deux gènes rapporteurs internes, celui codant pour le 18S, ARN ribosomal, donc sans queue poly-A, et celui codant pour la protéine ribosomale RPL19.

Cet objectif a été réalisé sur des ARNm de gènes codant pour des protéines impliquées notamment dans le métabolisme lipidique d'embryons bovins produits dans différentes conditions de développement : le milieu mSOF (modified synthetic oviduct fluid) enrichi en sérum, en coculture avec des cellules d'oviducte bovin, *in vivo*, ou encore après ajout de l'acide linoléique conjugué trans-10, cis-12 (ALC *t*10, *c*12, C18 :2), ou de l'acide docosahexaenoïque (DHA, C22 :6). Cinq gènes d'intérêt ont été testés, le gène codant pour l'adipophiline, protéine liant les gouttelettes lipidiques au cytosquelette et connue pour être un marqueur de l'accumulation des lipides dans de nombreux tissus, celui codant pour SCD1 (stearoyl-CoA-desaturase 1), ou Δ9 désaturase 1, enzyme réduisant le degré de saturation des corps gras (indice corrélé négativement avec la fluidité membranaire), ceux codant pour l'acetyl-CoA carboxylase (ACC) et la fatty acid synthase (FAS), deux enzymes intervenant dans la synthèse des acides gras, et pour finir, celui codant pour la carnitine palmitoyl transferase Type II (CPT-II), enzyme responsable du transport des acides gras dans la matrice mitochondriale pour y être oxydés.

Matériels et Méthodes

1. Production des embryons *in vivo*

Les embryons *in vivo* ont été produits à partir de génisses superovulées (24 UI de stimufol, FSH/LH, par donneuse, 5 injections pendant 3 jours), puis inséminées 12 h et 24 h après détection des chaleurs. Les embryons ont été collectés 7,5 jours (J7,5) après la première insémination. Le détail du protocole se trouve dans le tableau 1. Les embryons ont été mis à sec, dans des tubes, par groupe de 5 embryons de stade de développement équivalent et conservés à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN.

2. Production des embryons *in vitro*

Les embryons *in vitro* ont été produits à partir de complexes ovocytes-cumulus (COCs) ponctionnés sur des ovaires prélevés à l'abattoir. Le détail du protocole est précisé dans les publications 1 et 2 à suivre. Brièvement, les ovaires sont maintenus entre 35 et 37°C dans une solution saline (NaCl 9 g/L) jusqu'à la ponction. Les COCs sont triés et lavés dans un milieu tamponné (TCM 199 hépes), puis mis en maturation *in vitro* (MIV) 22 à 24 heures dans un incubateur (38,8°C ; 5 % CO_2 ; 20 % O_2) à raison de 50 à 70 COCs par puits de 500 µL de milieu 199 enrichi, ou « mix », comme décrit par (Donnay et al., 2004). Après maturation, les COCs sont fécondés *in vitro* (FIV ; J0) avec du sperme congelé / décongelé et lavé sur gradient de Percoll. Les COCs sont incubés avec les spermatozoïdes, à une concentration d'un million de spermatozoïdes par mL de milieu de fécondation pendant 18 heures (38,5°C ; 5 % CO_2 ; 20% O_2). A J1, les zygotes sont vortexés pendant 2 minutes pour détacher complètement les dernières cellules de cumulus restantes, puis ils sont mis en développement *in vitro* (DIV) dans des gouttes de 25 à 30 µL sous huile jusqu'à J7-J8 (38,5°C ; 5 % CO_2 ; 5 % O_2). Quatre milieux de développement ont été testés, en plus du milieu de base témoin, milieu mSOF, enrichi avec 5 % de sérum de veau fœtal (SVF).

2.a. expérience 1

Dans cette expérience, les embryons ont été cultivés soit dans le milieu témoin mSOF + 5 % SVF, soit sur un tapis de cellules d'oviducte bovin (coculture). Les cellules d'oviducte proviennent d'un pool de cellules bovines d'oviducte préalablement multipliées et congelées. A chaque réplique expérimentale, un aliquot de ce pool de cellules a été dégelé, puis ensemencé dans des gouttes de mSOF enrichies de SVF 10 %, gentamicine 8 µL/mL et d'amphotéricine B 1,25 µg/mL, 5 jours avant le dépôt des zygotes afin d'avoir un tapis de cellules presque à confluence à J1. La veille du dépôt des zygotes, le milieu est changé pour

du mSOF + 5 % SVF + 4 µL/mL de gentamicine. Le milieu est changé par moitié toutes les 48 heures durant toute la culture.

2.b. expérience 2

Trois conditions de développement ont été testées dans cette expérience, 1/ le milieu témoin mSOF + 5 % SVF, 2/ le milieu témoin mSOF + 5 % SVF + 100 µM β-mercaptoethanol (β-ME), et 3/ le milieu témoin mSOF + 5 % SVF + 100 µM β-ME + 100 µM C18 :2.

2.c. expérience 3

Trois conditions de développement ont également été testées dans cette expérience, 1/ le milieu témoin mSOF + 5 % SVF, 2/ le milieu témoin mSOF + 5 % SVF + 100 µM β-ME, et 3/ le milieu témoin mSOF + 5 % SVF + 100 µM β-ME + 10 µM C22 :6.

Pour les trois expériences, les blastocystes expansés et éclos obtenus à J7 et J8 ont été mis à sec dans des tubes, par groupe de 5 embryons par tube, et conservés à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN. Les groupes de 5 embryons sont faits le plus homogènes possible, en fonction du diamètre et du stade de développement de l'embryon.

3. Extraction des ARN totaux et RT

Les ARN des embryons ont été extraits avec le kit picopure (RNA isolation, Alphelys, France) suivant les instructions du fabricant. Les tubes sont plongés 3 fois dans l'azote liquide puis dans l'eau à 30°C, avant l'ajout du tampon d'extraction, afin de faire éclater les membranes cellulaires. De l'ARN de luciférase, témoin exogène d'extraction et de RT, est ajouté dans chaque tube à raison de 1 pg par embryon. La purification des ARN est réalisée avec de l'éthanol, puis est suivie par des phases de lavages successifs avec du tampon de lavage. Les ARN obtenus sont repris dans 10 µL de tampon d'élution. Le protocole détaillé est repris dans le tableau 2.

La transcription reverse a été réalisée dans un volume de 20 µL final sur la moitié du produit d'extraction, donc sur 2,5 équivalents embryons, pour les échantillons de la première et de la deuxième expérience, et sur l'ensemble du produit d'extraction, donc sur 5 équivalents embryons, pour la troisième expérience. Deux types d'amorces couplées ont été utilisés pour la RT : un oligo(dT)15 et une amorce spécifique du 18S (18S-as6). Une phase de dénaturation des ARN est réalisée à 65°C pendant 5 min, suivie par une phase d'hybridation des amorces et d'élongation des ADN complémentaires, à 37°C pendant 50 min par l'enzyme

MMLV- RT à 200 U/µL. Les produits de RT ont été conservés à -20°C jusqu'à la réalisation de la Q-PCR.

4. Q-PCR

Les réactions de Q-PCR ont été faites dans un thermocycleur MyiQ^{TM} (BIO RAD). Pour chaque QPCR, les produits de RT ont été dilués. Les dilutions ont été faites une seule fois, aliquotées et congelées pour l'ensemble des gènes étudiés sur une même série d'échantillons, afin que la quantification de tous les gènes soit réalisée à partir d'une même série de dilution.

La gamme de référence (5 points de dilution) a été réalisée à partir d'ADNc de cellules luminales d'utérus bovins pour tous les gènes étudiés excepté pour la luciférase, pour qui la gamme a été faite à partir de plasmides, à une concentration initiale de 2 pg/µL. Chaque point de gamme a été réalisé en duplicate et chaque échantillon en triplicate sur une même plaque avec un témoin d'eau.

Les réactions de Q-PCR ont été faites dans un volume de 20 µL. A 15 µL de mix spécifique ont été ajoutés 5 µL de produit de RT de chacun des échantillons à analyser. Le mix est composé d'eau, de mix 2x biorad (contenant le marqueur fluorescent Syber green, détection à 490 nm), et des amorces sens et anti-sens spécifiques du fragment à amplifier. Les séquences des amorces utilisées pour les gènes étudiés se trouvent dans le tableau 3.

5. Analyse des résultats de PCR en temps réel

Les résultats des PCR en temps réel ont été analysés en utilisant la médiane des « starting quantity » (SQ) données par l'appareil pour chaque échantillon. Les valeurs médianes pour chaque gène ont été rapportées à la médiane du gène normalisateur externe, la luciférase, puis à la médiane des gènes normalisateurs internes, le 18S et RPL19. L'ensemble de ces ratios a été comparé, dans chacune des expériences, au ratio obtenu pour les embryons cultivés dans le milieu témoin de base mSOF + 5 % SVF.

Les résultats obtenus ont été soumis à des tests statistiques non paramétriques (SYSTAT10, Kruskal-Wallis). La différence entre les lots testés est donnée significative pour une probabilité P inférieure à 5 %.

Résultats

1. Effet du milieu coculture sur l'expression génique embryonnaire

Trois répliques de cinq embryons ont été réalisées pour chacun des deux milieux *in vitro*, ainsi que pour les embryons produits *in vivo*. Le produit de RT, réalisé sur la moitié du produit d'extraction, a été dilué 10 fois pour faire l'amplification par QPCR des gènes intérêt, et 50 fois pour les gènes rapporteurs, ce qui fait des Q-PCR réalisées sur $3{,}12.10^{-3}$ et $6{,}25.10^{-4}$ équivalent embryon/µL, respectivement.

L'analyse du gène codant pour la lucifèrase indique que les rendements de l'extraction et de RT sont homogènes et satisfaisants pour les 9 tubes d'embryons extraits. L'amplification des ADNc pour les 2 gènes rapporteurs, 18S et RPL19, et les gènes d'intérêt codant pour l'adipophiline et FAS, a pu être validée, excepté pour une réplique du lot *in vivo*, pour laquelle la quantité d'amplicons était très faible, voire non détectable. Pour les 3 autres gènes d'intérêt codant pour SCD1, ACC et CPT-II, une deuxième RT sur le reste du produit d'extraction a été réalisée, et les QPCR ont été faites sur une dilution moins forte du produit de RT (1/5 au lieu de 1/10). Par contre, les gènes contrôles, luciférase, 18S et RPL19, ont été ré-amplifiés à partir des mêmes dilutions appliquées lors de la première RT, à savoir 1/50. Cette fois, il a été possible d'analyser les variations des transcrits pour ces 3 gènes. Cependant, le même souci que pour une réplique du lot *in vivo* a été de nouveau identifié. Cette réplique a du être éliminée et par conséquent, il était impossible de faire une analyse statistique avec les deux répliques restantes, et le lot *in vivo* a dû être supprimé de l'analyse. Les variations de quantité de transcrits pour les deux autres lots ont été normalisées par la luciférase, puis par le 18S et par RPL19 (Figure 1.A). La comparaison entre les 2 lots de développement embryonnaire montre une plus grande quantité de transcrits dans le lot mSOF + 5 % SVF que dans le lot coculture pour les gènes codant pour l'adipophiline, SCD1 et FAS lorsque la normalisation est faite avec RPL19 ($P<0{,}05$) Par contre, aucune différence significative entre les deux lots n'a été observée en normalisant par le 18S. Pour les gènes codant pour ACC et CPT - II, aucune différence significative n'a été observée, que la normalisation soit faite par l'un ou l'autre des gènes rapporteurs.

2. Effet de l'ajout de l'acide linoléique conjugué ALC trans-10, cis-12 (C18 :2)

Pour ce second essai, 5 répliques de 5 embryons ont été réalisées pour chacun des trois lots *in vitro* testés. Le produit de RT, réalisé sur la moitié du produit d'extraction, a été dilué 5 fois pour faire l'amplification par QPCR des gènes d'intérêt, et comme dans l'expérience 1 pour les gènes rapporteurs, à savoir 50 fois, ce qui fait des Q-PCR réalisées sur $6{,}25.10^{-3}$ et $6{,}25.10^{-4}$ équivalent embryon/µL, respectivement.

L'analyse du gène codant pour la lucifèrase indique que les ARN de 4 tubes d'embryons n'ont pas été correctement extraits ou/et rétro-transcrits : ils correspondent à une réplique du lot mSOF témoin, une du lot mSOF β-ME, et deux répliques du lot C18:2, qui ont dû être éliminées. Pour les autres répliques, toutes les amplifications des ADNc par QPCR ont pu être validées et analysées sur l'ensemble des gènes étudiés (Figure 1.B/). Pour les gènes codant pour FAS et ACC, les quantités d'amplicons étaient vraiment très faibles, avec une détection seulement après 37 cycles de QPCR. Les quantités de transcrits pour les 5 gènes d'intérêt étudiés n'ont présenté aucune différence significative entre les lots d'embryons, que la normalisation soit faite par rapport au 18S ou à RPL19. Une tendance à la diminution des transcrits du gène codant pour ACC et CPT-II rapportés au gène 18S a pu être observée après ajout de C18:2 comparés aux deux autres lots.

3. Effet de l'ajout de l'acide docosahexaenoïque (C22 :6)

Dans cette expérience, 6 répliques de 5 embryons ont été réalisées pour chacun des 3 lots *in vitro* (mSOF, β-ME, C22 :6) et pour le lot *in vivo*. La RT a été faite sur l'ensemble du produit d'extraction cette fois et les produits de RT ont été dilués à 1/10 pour l'amplification des 5 gènes d'intérêt, à 1/50 pour la luciférase et pour RPL19, et à 1/500 pour le 18S, et donc des Q-PCR réalisées sur $6{,}25.10^{-3}$, $1{,}25.10^{-3}$ et $1{,}25.10^{-4}$ équivalent embryon/µL, respectivement.

L'analyse des transcrits codant pour le gène externe indique que l'ensemble des 6 répliques pour les 4 lots sont tout à fait exploitables pour la suite de l'analyse des transcrits, y compris les 6 répliques du lot *in vivo*. La quantité d'ARNm du gène codant pour SCD1 est significativement différente entre les lots ($P<0{,}05$; Figure 1.C/). Il y a moins de transcrits du gène codant pour SCD1 dans le lot C22:6 que dans les lots mSOF avec ou sans β-ME. Ce résultat est le même quelque soit le gène rapporteur considéré. Pour les autres gènes, aucune différence significative n'a été observée en normalisant par l'un ou l'autre des deux gènes rapporteurs. Seules des tendances sont observées ; elles pourraient peut-être s'avérer significatives avec des répliques supplémentaires. Une moindre quantité de transcrits du gène codant pour l'adipophiline est remarquée dans le lot *in vivo* comparée aux milieux *in vitro* après normalisation par les deux gènes rapporteurs, excepté pour le lot mSOF + 5 % SVF avec 18S comme gène rapporteur. Une plus forte quantité de transcrits du gène codant pour ACC a également été obtenue dans les embryons produits *in vivo* par comparaison aux embryons des lots *in vitro*, et ce quelque soit le gène rapporteur.

Discussion

Ces 3 expériences préliminaires ont permis de se rendre compte de différents problèmes inhérents au modèle d'étude. L'extraction des ARNm à partir de 5 embryons bovins au stade J7 doit être au maximum optimisée afin de pouvoir disposer d'une quantité suffisante d'ADNc pour chacun des gènes d'intérêt étudiés qui sont faiblement présents à ce stade de développement. Elle doit également être répétable d'une réplique à l'autre. C'est pour cette dernière qualité que nous avions choisi de faire l'extraction sur kit standardisé. Or, il s'est avéré que même en utilisant des kits, certaines répliques ont dû être éliminées, ce qui s'est corrigé avec l'apprentissage (aucune réplique n'a dû être éliminée lors de la troisième expérience). Par contre, l'efficacité de l'extraction est difficilement modulable avec le kit utilisé, et nous avons été amenés à éliminer des échantillons car ils sortaient très tard, voire pas du tout pour les transcrits des gènes d'intérêt. Il est donc nécessaire pour la suite de ce travail de thèse d'utiliser une autre technique d'extraction qui permette un meilleur rendement si nous voulons quantifier correctement, c'est-à-dire sans être à la limite de la fiabilité de la technique de QPCR, les ARNm de nos gènes d'intérêt qui sont présents en très faible quantité dans les embryons J7, et ce, sans être obligé d'augmenter de façon inconsidérée le nombre d'embryons dans chaque réplique.

En fonction des gènes rapporteurs internes utilisés pour la normalisation de l'expression des transcrits présents dans les embryons, les conclusions sur l'effet des milieux de développement ne sont pas toujours identiques. Par exemple, dans l'expérience 1, la diminution de la quantité de transcrits des gènes codant pour l'adipophiline et SCD1 dans le lot coculture par rapport au lot mSOF ne s'observe qu'avec la normalisation par RPL19, et non par le 18S. Il semble difficile à la suite des trois expériences préliminaires que nous avons réalisées de choisir un gène standard interne entre les deux testés. Pour la suite de ce travail de thèse, nous avons donc décidé de conserver la double normalisation des données, par le 18S et par RPL19. Dans la littérature, d'autres gènes internes ont été testés, comme la β-actin, la glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), l'histone H2a (Robert et al., 2002 ; Rizos et al., 2004), ou encore une moyenne géométrique de plusieurs gènes, GAPD – SDHA – YWHAZ, (Goossens et al., 2005 ; Murthi et al., 2008). Pour l'heure, aucun référent interne n'a encore réellement remporté la palme. De plus, en fonction du modèle d'étude (ovocyte, embryon, autres cellules, tissus …) ou du problème posé, il peut être totalement différent, d'où la nécessité de vérifier que le gène ou les gènes internes choisis ne varient pas entre les

conditions testées avant toutes conclusions trop hâtives sur des hypothétiques effets des dites conditions.

La quantité totale d'ARN réellement présente dans chaque réplique étant impossible à mesurer avant les RT, et la quantité d'amplicon difficile à normaliser avec un gène rapporteur interne complètement fiable, l'homogénéité de l'échantillonnage des répliques doit être la plus grande possible. Les variations observées dans la quantité des transcrits pour les gènes étudiés soulèvent le problème du nombre de cellules présentes dans les embryons, pourtant choisis à un stade de développement identique. Ce nombre peut varier en fonction des milieux de développement dans lesquels les embryons sont cultivés (Thompson et al., 1998b ; Reis et al., 2003). Afin d'estimer la variabilité en nombre de cellules pour chaque embryon et éviter de fausser la quantification des ARNm, nous avons jugé que l'analyse de la variation du nombre de blastomères présents dans les embryons produits et ce pour chacun des milieux de développement testés devait être faite avant toute chose (voir résultat dans la publication 1).

Malgré les problèmes techniques énoncés ci-dessus, il semble que les transcrits du gène codant pour l'adipophiline tendent à être plus exprimés dans les embryons développés dans les milieux mSOF avec ou sans β-ME et DHA, et complémentés avec 5 % de sérum de veau fœtal que dans les embryons développés en co-culture et *in vivo*, ce qui signifierait que la quantité de gouttelettes lipidiques serait plus importante dans les embryons cultivés dans les premiers milieux cités. Ces résultats restent bien sûr à confirmer dans la suite de notre travail (voir publication 1), et surtout à valider avec les deux types de normalisation, mais déjà, ils corroboreraient ceux de Charpigny et al. (communication personnelle), à partir d'embryons produits *in vitro*, dans le milieu mSOF + sérum et en coculture, sur cellules Véro, et produits *in vivo,* conditions de développement pour lesquels la quantité de transcrits du gène codant pour l'adipophiline décroit respectivement. Il apparaît également que l'expression des transcrits du gène codant pour SCD1 est diminuée après ajout d'un acide gras à longue chaîne comme le DHA dans le milieu de développement *in vitro* et en présence de cellules en coculture, ce qui laisse supposer que ces deux conditions de développement embryonnaire permettraient l'incorporation d'acides gras polyinsaturés dans les embryons, entre J2 et J7. Par conséquent, SCD1 ne serait pas sollicitée ou son activité serait inhibée dans ces embryons, comme c'est le cas dans le foie et les adipocytes suite à une alimentation riche en acides gras polyinsaturés (pour une revue voir Sessler et al., 1996 ; Ntambi, 1999 ; Park et al., 2000 ; Sampath and Ntambi, 2005). Le DHA, mais également l'ALC *t*10, *c*12 (C18 :2) sont spécifiquement connus pour diminuer l'expression des désaturases dans les cellules hépatiques (Park et al., 2000). Il semblerait par contre que dans l'embryon bovin J7, cet effet

ne soit pas retrouvé avec le C18 :2 dans nos conditions expérimentales, ou que le mécanisme de régulation ne soit pas encore mis en place à ce stade de développement. Ces études comparatives sont à reprendre et à compléter dans la suite de notre travail (voir publication 2).

En conclusion, ces expériences préliminaires nous ont permis de voir que l'extraction d'ARN sur kit n'avait pas un assez bon rendement pour analyser ensuite des gènes d'intérêt très faiblement exprimés dans l'embryon à J7, que l'amorçage oligo(dT)15 / random était utilisable pour notre problématique et que ni le 18S ni RPL19 ne s'étaient démarqués comme bon standard interne, ce qui nous faisait les conserver tous les deux pour la suite de notre travail.

Tableau 1. Protocole de production des embryons *in vivo*

Jour	Heure	Intervention
J 0	8h00	Echographie et Pose implant Crestar
J 8	8h00 et 17h00	FSH / LH : 5,5 UI = 5,5 mL (injection intramusculaire)
J 9	8h00 et 17h00	FSH / LH : 4 UI
J 10	8h00 17h00	FSH / LH : 2 UI + prostaglandine (3 mL) FSH / LH : 2 UI + retrait implant
J 11	8h00	FSH / LH : 1 UI
J 12	8h00 et 17h00	Détection de l'oestrus (36h après retrait) **+** Réceptal 2,5 mL
J 13	8h00	+ IA (12h et 24 h après la détection de l'oestrus)
J 20	8h00	Collecte des embryons à J7,5 (J0 = jour de la 1ère IA)

Tableau 2. Protocole d'extraction des ARN totaux des embryons avec le kit picopure

> Casser les membranes	
3 min dans l'eau à 30-37°C et 3 min dans l'azote liquide	x 3
> Extraction des ARN	
Extraction buffer (XB) ARN de luciférase (0,5pg/µL)	50µL 10µL Mélanger doucement (ne pas vortexer) / Incuber 30 min à 42°C Centrifuger 2 min à 3000g à 4°C / Récupérer le surnageant
> Préparation des colonnes (10 min avant la fin de l'incubation échantillon)	
Conditioning buffer (CB)	250µL Incuber 5 min à temp. ambiante / Centrifuger 1min 16000g à 4°C
> Purification des ARN	
Ethanol 70% Wash buffer (W1)	50µL Mélanger doucement (ne pas vortexer) Déposer le tout sur la colonne, goutte à goutte Centrifuger 2 min à 100g à 4°C, puis 30 sec à 16000g à 4°C Eliminer l'éluat 100µL (dépôt goutte par goutte) Centrifuger 1min 8000g à 4°C / Eliminer l'éluat
> Traitement Dnase (kit Qiagen Rnase-free Dnase set)	
   Wash buffer (W1)	Mélanger 95µL de DNAse solution stock + 665µL de buffer RDD Placer 40µL sur la colonne Incuber 15 min à température ambiante 40µL Centrifuger 15 sec à 8000g à 4°C
> Purification des ARN (suite)	
Wash buffer 2 (W2) Wash buffer 2 (W2) Elution buffer (EB)	100µL Centrifuger 1min 8000g à 4°C / Eliminer l'éluat 100µl Centrifuger 2 min 16000g 4°C / Eliminer l'éluat Re-centrifuger 1min 16000g à 4°C Placer la colonne sur un nouveau tube de 0,5mL 10µL (+ 1 µL) Incuber 1min à température ambiante Centrifuger 1min à 1000g à 4°C, puis 1min à 16000g à 4°C

Tableau 3. Amorces utilisées pour amplifier les différents gènes d'intérêt

Gène	Amorce	Séquence (5' --> 3')	Numéro dans Genbank
18S	antisens6	TCGCTCCACCAAC	DQ222453
	sens3	CGGACCAGAGCGAAAGCATTTG	
	antisens4	GAATAACGCCGCCGCATCG	
RPL19	sens	AATCGCCAATGCCAACTC	AY158223
	antisens	CCCTTTCGCTTACCTATACC	
luciferase	sens2	TCATTCTTCGCCAAAAGCACTCTG	X84848
	antisens2	AGCCCATATCCTTGTCGTATCCC	
ACC	sens	TGCTTCCCATTTGCCATC	AJ132890
	antisens	CTGCCATCCTCACGACCT	
FAS	sens2	CACTCCATCCTCGCTCTCC	AY343889
	antisens2	GCCTGTCATCATCTGTCACC	
SCD1	sens3	CTGGCTGGTGAATAGTGCTG	NM_173959
	antisens3	AAGGTGTGGTGGTAGTTGTGG	
Adipophiline	sens	ACAACACACCCCTCAACTGG	AJ011680
	antisens	CTGCCTGCCTACTTCAGACC	
CPT-II	sens	TGTGCCTTCCTTCCTGTCTTGG	NM_001045889
	antisens	CGATGGGGTCTGGGTAAACGA	

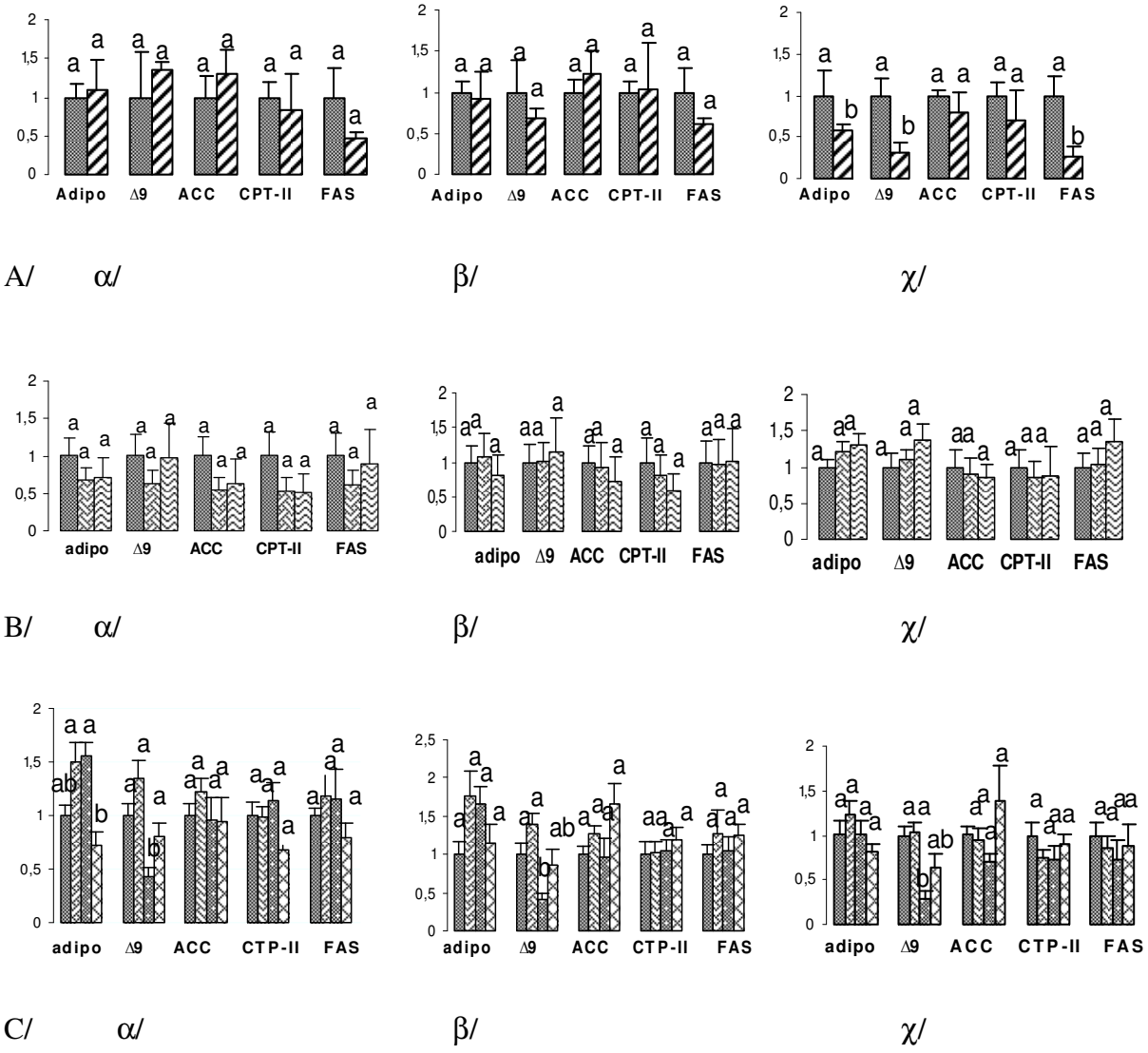


Figure 1 : Variation relative des ARNm en fonction des milieux de développement.

A/ Expérience 1, ▩: mSOF + 5 % SVF ; ▨: coculture. B / Expérience 2, ▩ : mSOF + 5 % SVF ; ▨: mSOF + 5 % SVF + β-mercaptoéthanol (ME) ; ▨ : SOF + 5 % SVF+ β-ME + C18:2. C/ Expérience 3, ▩ : mSOF + 5 % SVF ; ▨: mSOF + 5 % SVF + β-mercaptoéthanol (ME) ; ▩ : SOF + 5 % SVF+ β-ME + C22 :6 ; ▨ : *in vivo*. Les 5 gènes testés codent pour l'adipophiline (adipo), Δ9 (SCD1, désaturase 9), ACC (acétyl-Coenzyme A carboxylase), CPT-II (carnitine palmitoyl transferase Type II) et FAS (fatty acid synthase). La normalisation a été faite par rapport à α/ la luciférase, β/ 18S et χ/ RPL19, puis chaque valeur a été rationalisée par la valeur du lot témoin de base mSOF + SVF. Pour un gène donné, les indices a et b indiquent une différence significative entre les conditions de développement appliquées ($P<0,05$, SYSTAT10, Kruskal-Wallis).

Article 1

Variation of adipophilin mRNA expression in bovine embryos produced in vitro or in vivo

Abdulrahman AL DARWICH, Christine PERREAU, Romain LE ROUX, Jean-Luc TOUZE, Francis DUPONT, Benoît REMY, Gilles CHARPIGNY, Pascal MERMILLOD and Florence GUIGNOT

Article soumis le 03 novembre 2009 à Theriogenology

Elsevier Editorial System(tm) for Theriogenology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Variation of adipophilin mRNA expression in bovine embryos produced in vitro or in vivo

Article Type: Original Research Article

Keywords: Culture environment; Boec; serum; DHA; lipids; gene expression

Corresponding Author: Mrs florence guignot,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Abdulrahman Al darwich

Order of Authors: Abdulrahman Al darwich; Christine Perreau; Romain Le Roux; Jean-Luc Touzé; Francis Dupont; Benoît Remy; gilles charpigny; Pascal Mermillod; florence guignot

Abstract: Bovine embryos cultured in serum-containing media abnormally accumulate lipids droplets, compared to in their vivo counterpart. The objective of this study was to compare the relative transcript abundance of gene encoding for adipophilin, protein associated to lipid accumulation, in bovine blastocysts derived from different in vitro and in vivo development environments. Embryo culture environment effect was also studied on blastocysts cell numbers. Two housekeeping gene were used as internal references, 18S and RPL19. After Hoechst staining, embryo cell counts increased together with developmental stage. The cell number was lower for embryos developed vivo or in coculture with Boec (bovine oviduct epithelial cell), as compared with other groups. The relative adipophilin transcript abundance was not significantly increased after 5% or 10% FCS supplementation in SOF medium ($P>0.05$), however it was significantly lower in Boec coculture compared to mSOF + 10% FCS medium alone, and in in vivo environment compared to mSOF + 5 % FCS + 100µM β-mercaptoethanol with or without 10µM DHA (docosahexaenoic acid, C22:6) media ($P<0.05$). Moreover, a significantly lower level was found in Boec coculture compared to mSOF + 5% FCS medium alone after 18S normalization ($P<0.05$), and in the ewe oviduct environment compared to 5% or 10% FCS supplementation to mSOF after RPL19 normalization ($P<0.05$). In conclusion, our results demonstrate that adipophilin mRNA expression level may be a specific marker for triglyceride accumulation in bovine embryos.

Article 1

Variation de l'expression du gène codant pour l'adipophiline dans des embryons bovins produits *in vitro* ou *in vivo*

Introduction

Les embryons bovins issus de culture *in vitro* sont plus sensibles à la congélation que les embryons produits *in vivo* en partie à cause de leur contenu lipidique globalement plus élevé et de l'enrichissement spécifique en certaines classes de lipides tels que les triglycérides. Les différentes conditions de développement *in vitro* appliquées aux embryons modifient également leur contenu lipidique. Par exemple, l'ajout de sérum dans le milieu de culture *in vitro* augmente l'accumulation des lipides dans les embryons bovins, alors qu'une culture en absence de sérum conduit à la réduction de l'accumulation de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques dans les blastocystes bovins et améliore leur résistance à la cryoconservation. Ces gouttelettes lipidiques sont liées au cytosquelette des cellules par notamment une protéine, l'**adipophiline**, qui est fortement exprimée dans les tissus adipeux et dans les tissus et cellules des mammifères qui synthétisent et/ou stockent des lipides. L'objectif de cette partie de la thèse était d'étudier par RT-QPCR la variation de la quantité de transcrit du gène codant pour l'adipophiline dans des blastocystes bovins développés dans différentes conditions de développement *in vitro*, et *in vivo*. Au préalable, une optimisation des conditions de reverse transcription (RT) a été réalisée. L'effet du milieu de développement des embryons sur le nombre de blastomères a été également étudié.

Plan expérimental - Méthodes

La première expérience citée dans cette publication a été dédiée conjointement à la validation de l'extraction des ARN totaux par le trizol et à l'optimisation des conditions de RT. Trois amorçages de RT ont été testés, des oligo(dT)15 seuls (i), ou additionnés à des amorces hexamériques randomisées (ii) ou à une amorce spécifique du 18S (iii).

Les 3 autres expériences ont été dédiées à l'étude des ARNm de l'adipophiline en fonction des milieux *in vitro* appliqués. Les milieux étudiés sont :

- l'ajout de **10 % de sérum de veau fœtal** (SVF) dans le milieu de développement, versus 0 % (expérience 2)

- **une coculture** sur un pool de cellules d'oviducte bovin préalablement congelées (Boec), versus 5 % SVF et 10 % SVF et un développement embryonnaire précoce dans des **oviductes de brebis *in vivo*** (expérience 3)
- un ajout d'acide gras insaturé, l'acide docosahexaénoïque (**DHA)** (expérience 4), versus 5 % SVF et un développement embryonnaire ***in vivo***.

Principaux Résultats et Conclusions

L'expérience 1 a permis de valider la technique d'extraction par le trizol et de choisir l'amorçage oligo(dT)15 couplé à des amorces hexamériques randomisées pour la reverse transcription, afin d'optimiser l'ensemble des ARN rétrotranscrits, qu'ils soient polyadénylés, comme ceux des gènes d'intérêt testés, ou non, comme l'ARNr 18S utilisé en gène rapporteur.

Le nombre de blastomères comptés dans les blastocystes et les blastocystes expansés est significativement réduit dans les lots coculture et *in vivo*, comparés aux lots 5 et 10 % SVF ($P<0,05$) (figure 18) Globalement, le nombre de blastomères augmente du blastocyste au blastocyste expansé, puis éclos.

Après normalisation par deux gènes rapporteurs internes, le 18S et RPL19, la quantité de transcrits du gène codant pour l'adipophiline est significativement plus faible dans des blastocystes produits *in vivo* et en coculture, comparée à celle des blastocystes issus des lots enrichis en sérum, et avec ou sans DHA ($P<0,05$). Par contre, pour les blastocystes développés dans les oviductes de brebis, un niveau de transcrits significativement plus faible comparé à celui du lot sérum est observé seulement après normalisation par RPL19. Reste donc posé le problème du choix d'un bon standard interne dans ce cas précis.

En conclusion, le gène codant pour l'adipophiline est bien exprimé dans les embryons bovins au stade J7 post insémination. De plus, son expression est modifiée par l'environnement de la culture embryonnaire. Le milieu coculture est le milieu *in vitro* qui mime le mieux le développement *in vivo*, alors qu'un enrichissement en sérum augmente son expression, tout comme il a été déjà rapporté pour la quantité de triglycérides mesurée par HPLC. Par conséquent, le niveau d'expression du gène codant pour l'adipophiline pourrait donc être un **marqueur spécifique** de **l'accumulation de triglycérides** et de la cryo-tolérance d'embryons bovins. Il serait très intéressant de pouvoir étudier la cinétique d'expression de ce gène depuis l'ovocyte jusqu'au stade blastocyste pour essayer de mieux comprendre d'où peut venir ce différentiel expressionnel (voir publication 3), et de confirmer

au niveau fonctionnel, la variation de cette protéine suivant les conditions de développement appliquées aux embryons.

Variation of adipophilin mRNA expression in bovine embryos

produced *in vitro* or *in vivo*

A. Al darwich [a, b, c, d], C. Perreau [a, b, c, d], Le Roux R [a, b, c, d], JL Touzé [a, b, c, d], F. Dupont [a, b, c, d], B. Remy [e], G. Charpigny [f] P. Mermillod [a, b, c, d] and F. Guignot [a, b, c, d, *]

[a] INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

[b] CNRS, UMR6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

[c] Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France

[d] Haras Nationaux, F-37380 Nouzilly, France

[e] Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Physiologie de la Reproduction, B4000 Liège, Belgium

[f] INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy en Josas, France

[*] Corresponding author at: INRA, PRC, 37380 Nouzilly, France. Tel.: +33 2 47 42 77 94; fax: +33 2 47 42 77 43. E-mail address: Florence.guignot@tours.inra.fr

Abstract

Bovine embryos cultured in serum-containing media abnormally accumulate lipids droplets, compared to in their vivo counterpart. The objective of this study was to compare the relative transcript abundance of gene encoding for adipophilin, protein associated to lipid accumulation, in bovine blastocysts derived from different *in vitro* and *in vivo* development environments. Embryo culture environment effect was also studied on blastocysts cell

numbers. Two housekeeping gene were used as internal references, 18S and RPL19. After Hoechst staining, embryo cell counts increased together with developmental stage. The cell number was lower for embryos developed *in vivo* or in coculture with Boec (bovine oviduct epithelial cell), as compared with other groups. The relative adipophilin transcript abundance was not significantly increased after 5% or 10% FCS supplementation in SOF medium ($P>0.05$), however it was significantly lower in Boec coculture compared to mSOF + 10% FCS medium alone, and in *in vivo* environment compared to mSOF + 5 % FCS + 100 µM β-mercaptoethanol with or without 10 µM DHA (docosahexaenoic acid, C22:6) media ($P<0.05$). Moreover, a significantly lower level was found in Boec coculture compared to mSOF + 5% FCS medium alone after 18S normalization ($P<0.05$), and in the ewe oviduct environment compared to 5% or 10% FCS supplementation to mSOF after RPL19 normalization ($P<0.05$). In conclusion, our results demonstrate that adipophilin mRNA expression level may be a specific marker for triglyceride accumulation in bovine embryos.

Keywords*:* Culture environment; Boec; serum; DHA; lipids; gene expression.

1. Introduction

Over more than two decades, preimplantation bovine embryos were well documented in the literature, concluding to higher quality of the embryos derived *in vivo* compared to those produced *in vitro*. Most of the differences between the qualities of *in vitro* and *in vivo*-derived embryos are due to the culture environment during early embryo development [1-3]. This is the case, not only when *in vitro* and *in vivo* culture systems are compared with each other, but also when comparisons are made between different *in vitro* culture systems [1,2,4-7]. Embryo morphological, ultrastructural, physiological, transcriptional and metabolic levels are affected (for a review, see [8]). These differences include darker cytoplasm, lower density

[9], more triglycerides and fewer phosphatidyl choline, and cholesterol esters [10], swollen blastomeres [11], a more fragile zona pellucida [12], reduced intercellular communication [13], a higher incidence of chromosome abnormalities [14,15] and modification of gene expression pattern with serious implications for the normality of blastocyst development [1,16].

Successful cryopreservation of *in vitro* produced (IVP) bovine embryos is essential for their widespread use in the embryo transfer industry. However, IVP embryos are also more sensitive to chilling [9,17,18] and freezing than *in vivo* derived ones [7,19]. Difference in the enzymatic digestion of zona pellucida between *in vivo* and *in vitro* produced embryos could modify their permeability to water and cryoprotective agents. Lipid content of oocytes and embryos is an important parameter linked to their quality and cryotolerance, and the accumulation of intracellular lipids may be at least partly responsible for the higher sensitivity of IVP embryos to freezing [20,21]. Cryopreservation tolerance of bovine IVM/IVF embryos has been increased through removal of embryo cytoplasmic lipid droplets after centrifugation [22-24]. The lipid content can also be influenced by embryo culture environment. Serum supplementation has an influence on triglyceride accumulation and on the changes in the fatty acid composition of oocytes and embryos [25,26]. Addition of serum to culture medium increases lipid accumulation in bovine embryos [27-30], and induces an excess of some fatty acids, such as palmitic, stearic and docosadienoic acids, until the blastocyst stage [31]. Embryo culture in serum-free systems reduced the accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine blastocysts and also improved their resistance to cryopreservation [28,32].

The accumulation of lipids droplets is well associated with the expression of a lipid binding protein, adipophilin, highly expressed in adipose tissue and in a wide range of mammalian cells and tissues that store or synthesize lipids [33,34]. Adipophilin is a 50 kDa protein encoded by a gene initially isolated from differentiating adipocytes [35]. This protein

is generally upregulated with stored lipid during lipid droplet formation, and is present on the surface of lipid droplets in the cell from the earliest time of their synthesis [36]. Recombinant expression of adipophilin in COS-7 cells demonstrated that this protein facilitates the transport of long-chain free fatty acids and may function as a fatty acid carrier protein [37]. Adipophilin increases the uptake of saturated, monounsaturated and polyunsaturated long-chain fatty acids. Furthermore, the expression of adipophilin is induced in adipocyte precursor cells by incubation with long-chain fatty acids regardless of their degree of saturation [38] and leads to lipid droplets accumulation [39].

Analysis of mRNA expression pattern of specific genes involved in preimplantation embryo development and metabolism is a useful tool to assess embryo normality and quality through quantitative RT-PCR. Indeed, real-time RT-PCR has been recognised as a method of choice for sensitive, accurate and reliable study of gene expression [40], even if only small number of cells is available [41]. However, mRNA quantification requires data normalization with endogenous standards. Standards should reflect the quantity of cells in each sample analysed and should not be affected by developmental stages. Housekeeping genes such as β-actin, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and 18S rRNA were commonly used as standards for tissues samples or somatic cells analysis, whereas histone H2a [42-44], geometric mean of 3 reference genes , GAPD – SDHA – YWHAZ [45], have been used for embryo mRNA quantification.

The aim of the present study was to compare the relative abundance of adipophilin transcripts in bovine blastocysts developed under different *in vitro* and *in vivo* environments. The mRNA level was quantified by real time RT-PCR. Three different reverse transcription primings (oligodT, 18S specific primer and random hexamer) were tested on adipophilin

transcripts, but also on transcripts of two other genes encoding for enzymes involved in lipid metabolism, i.e. ACC (acetyl-CoA-carboxylase) and SCD1 (stearoyl-CoA desaturase 1). Normalizations with two different housekeeping genes (RPL19 and 18S) were compared on adipophilin transcripts. The effect of embryo environment was also analysed on cell numbers at blastocyst, expanded blastocysts and hatched blastocyst stages.

2. Materials and Methods

Chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO) unless otherwise indicated.

2.1. Embryo production

Four experiments were performed. For experiments 3 and 4, all animal procedures were performed in accordance with the French law on experimental procedures (authorizations 37-090 and C37-175-2 of the French Ministry of Agriculture).

2.1.1. Experiment 1

2.1.1.1. Oocyte collection and maturation

Bovine ovaries were collected at a local slaughterhouse and cumulus oocyte complexes (COC) were aspirated from 3 to 6 mm follicles. Only COC showing a compact and complete cumulus and an homogeneous dark oocyte cytoplasm were selected and washed three times in Hepes-buffered Tissue Culture Medium-199 (TCM-199). Groups of 50 to 70 COC were then placed into four-well plates (NUNC, Roskilde, Denmark) for *in vitro* maturation (IVM). Each well was containing 500 µL of TCM199 medium supplemented with EGF (10 ng/mL), IGF-I (19 ng/mL), FGF (2.2 ng/mL), hCG (5 IU/mL), PMSG (10 IU/mL), insulin (5 µg/mL), transferrin (5 µg/mL), selenium (5 ng/mL), L-cystein (90 µg/mL), β-

mercaptoethanol (β-ME) (0.1 mM), ascorbic acid (75 µg/mL), glycine (720 µg/mL), glutamine (0.1 mg/mL) and pyruvate (110 µg/mL) [46]. The COC were incubated for 22-24 h at 38.8°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.

2.1.1.2. *In vitro* fertilization (IVF)

At the end of the maturation period, COC were washed in fertilization medium (Tyrode medium supplemented with 25 mM bicarbonate, 10mM lactate, 1mM pyruvate, 6 mg/mL fatty acid free BSA, 100 µg/mL heparin and 40 µg/mL gentamycin) before being transferred in groups of 50 to 70 into four-well dishes containing 250 µL of fertilization medium per well. Motile spermatozoa were obtained by centrifugation of frozen/thawed semen on a discontinuous percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) density gradient (45/90%) and diluted in fertilization medium to obtain a final concentration of 2.10^6 spermatozoa per mL. A 250 µL aliquot of this suspension was added to each well containing COC. COC and spermatozoa were incubated together for 18 h at 38.8°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 in air. Semen from the same bull was used throughout experiments. Day of fertilization was considered as day 0.

2.1.1.3. *In vitro* development (IVD)

After 18 h, presumptive zygotes were completely denuded of cumulus cells by vortexing and washed in culture medium (modified synthetic oviduct fluid, mSOF [47]) supplemented with 5% Fetal Calf Serum (FCS, ref 29167748, MP Biomedicals, Illkirch, France). They were then cultured in groups of 25 in 25 µL microdrop under paraffin oil at 38.8°C for 7 days in a humidified atmosphere of 5% CO_2, 5% O_2 and 90% N_2.

2.1.2. Experiment 2

Presumptive zygotes produced following IVM/IVF were cultured as described in experiment 1 in mSOF, supplemented with either 0% FCS and 3 mg/mL fatty acid free BSA , or with 10% FCS added at day 1. Groups of 20 embryos were collected at expanded blastocyst and hatched blastocyst stages and placed in dry Eppendorf tubes for later analysis. All embryo samples were stored at -80°C.

2.1.3. Experiment 3

IVM/IVF presumptive zygotes were cultured as described in experiment 1 in 4 different culture environments, 1/ mSOF + 5% FCS, 2) mSOF + 10% FCS, 3) coculture with bovine oviduct epithelial cell monolayers (Boec) and 4) developed in the ewe oviduct.

2.1.3.1 Coculture with Boec

The Boec culture was prepared as described previously [48]. After collection from slaughtered cow oviducts, the Boec were multiplied and cryoconserved. Each IVD experiment was performed with the same Boec batch. After warming, the Boec were seeded in 25 µL microdrops with mSOF + 10 % FCS + 8 µL/mL gentamicin + 1.25 µg/mL amphotericin B under paraffin oil at about 10^5 cells/mL and cultured at 38.8°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2, 5% O_2 and 90% N_2. After 5 days of culture, about 80% of confluence of the monolayer was achieved and the embryos were introduced (25 embryos per drop). Half of the culture medium was renewed every 48 h during *in vitro* development with mSOF + 5% FCS + 4 µL/mL gentamicin.

2.1.3.1 *In vivo* development of IVM/IVF presumptive zygotes in the ewe oviduct

IVM/IVF presumptive zygotes were surgically transferred by mid ventral laparotomy into a ligated ewe oviduct (approximately 60 zygotes per oviduct) at 22 h post insemination.

Embryos were recovered from the ewe 6 days later (i.e., Day 7 post insemination) by surgery and flushing of the oviduct with 20 mL of PBS. Recovered embryos were classified morphologically.

2.1.4. Experiment 4

2.1.4.1 *In vitro* produced embryos

IVM/IVF presumptive zygotes were cultured as described in experiment 1 under 2 different culture environments, 1/ mSOF + 5% FCS + 100 µM β-ME, 2) mSOF + 5% FCS + 100 µM β-ME + 10 µM docosahexaenoic acid (DHA cis-4, 7, 10, 13, 16, 19, C22:6) (Matreya, ref 1136), diluted in absolute ethanol. β-ME was used to avoid C22:6 oxidation during culture.

2.1.4.2. *In vivo* produced embryos

Beef cross heifers were synchronized using a Crestar® implant (Intervet, Angers, France) for 10 days. Donors were superovulated with a total of 24 IU FSH/LH (Stimufol, ULg FMV PhR, Belgium) injected intramuscularly every 12h over four days on a decreasing dose schedule (5.5, 5.5, 4, 4, 2, 2 and 1 IU) during the last four days of progestagen treatment (Days 8 to 11). The day of implant removal (Day 10), heifers received 3 mL (22.5 mg) of prostaglandin F2α analogue (Prosolvin, Intervet, France). When the onset of estrus was detected (36 h after implant removal), heifers received 2.5 mL (10 µg) of GnRH (Receptal ®, Intervet) and were inseminated with frozen-thawed semen (48 and 60 h after GnRH injection). The batch of sperm used for artificial insemination was the same than for IVF. Embryos were recovered at Day 7 post insemination by transcervical uterine flushing.

2.2. Hoechst staining and cell counts

Only blastocysts (120-170 µm), expanded blastocysts (170-220 µm) and hatched blastocysts were selected for cell count. They were stained with Hoechst 33342 (1µg per mL of 2.3% w/v sodium citrate solution) after 2 h of alcohol fixation on slide. Stained nuclei were observed using UV light microscopy and cell numbers were counted.

2.3. RNA isolation and reverse transcription

Embryos were placed in dry Eppendorf tubes and stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA was extracted from embryos, after adding 1 pg per embryo of luciferase mRNA (Promega, Charbonnières-les-bains, France) as an exogenous standard, using TriZol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) following the manufacturer's instructions. RNA preparations were incubated with RQ1 DNase (Promega, France) for 10 min at room temperature followed by 37°C for 30 min to avoid contamination with genomic DNA, organic extraction, precipitation and resuspension in water. Reverse transcription was performed on RNA amounts corresponding to 2.5 embryos (experiments 1 and 3), 20 embryos (experiment 2) and 5 embryos (experiment 4). The cDNA was extended from: 1/ oligo(dT)15 primers alone (Promega, France), 25 ng per reaction, RT1, 2/ oligo(dT)15 primers + random primers (Promega, France), 25 ng per reaction for each primer, RT2 or 3/ oligo(dT)15 primers + 18S-RNA-specific primer (5'- TCGCTCCACCAAC - 3'), 1.25 µM per reaction, RT3, during 50 min at 37°C by mouse Moloney leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, France) in a total volume of 20 µL. Parallel negative control reactions were set up without substrate.

2.4. Real time RT-PCR

The quantification of all gene transcripts was carried out by real-time RT-PCR on MyiQCycler apparatus (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, France) using specific

primers (table 1). Reactions were performed in triplicate using a real-time PCR kit provided with SYBR Green fluorophore (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions and using a robotic distributor (Eppendorf). The PCR reaction mixture (20µL) contained 10 µL green supermix 2x buffer, 4.6 µL of ultrafiltered water, 0.20 µM of forward and reverse primers and 5 µL of diluted RT product.

The PCR protocol included an initial step of 95°C (3 min), followed by 40 cycles of 95°C (30 sec), 60°C (30 sec) and 72°C (20 sec), and further by acquisition of the melting curve (fluorescence acquisition every 0.5°C, from 55 to 95°C). The method used for quantification of gene expression was the relative standard curve method; standard curves were obtained from serial dilutions of a pool of cDNA of bovine uterus luminal cells for all genes, except for luciferase (plasmid including the target sequence). In each sample, the median value of PCR replicates was considered and normalized to the exogenous control luciferase to validate the experiment. The gene value was then normalized to the same ratio for RT1 (mean of 5 embryo collections) in experiment 1. In experiments 2, 3 and 4, data for adipophilin encoding gene were normalized to endogenous genes, 18S and RPL19.

2.5 Statistical analysis

Data on mRNA expression assayed by quantitative RT-PCR were compared according to RT (experiment 1) and according to embryo culture environment and endogenous genes (experiments 2, 3 and 4) by using non parametric test (StatXact, Cytel, Cambridge, SYSTAT10, Kruskal-Wallis). The same test was used to compare cell numbers of blastocysts, expanded blastocysts and hatched blastocysts according to embryo culture environment. Differences were considered significant at $P<0.05$. Data are presented as mean ± SEM.

3. Results

3.1. Embryo cell number and culture environment

About 650 blastocysts, expanded blastocysts and hatched blastocysts were collected at Day 7 post IVF from eight different culture media and stained with Hoechst. Culture media were 1/ mSOF + 10% FCS ; 2/ mSOF + 5% FCS ; 3/ mSOF + 0% FCS ; 4/ mSOF + 5% FCS + 100 µM β-ME ; 5/ mSOF + 5% FCS + 100 µM β-ME + 100 µM conjugated linoleic acid trans 10, cis 12 (CLA t10, c12 ; C18:2) ; 6/ mSOF + 5% FCS + 100 µM β-ME + 10 µM C22:6 ; 7: Boec coculture and 8/ *in vivo*. Embryos were obtained in three different experiments, first one, experiment A, (three trials): media 1/, 2/, 3/ and 7/ were assessed, second one, experiment B, (three trials): media 2/, 4/ and 5/, and third one, experiment C, (five trials): media 2/, 4/ and 6/.

Results of cleavage and embryo yield are shown in table 2 and results of cell number counting in each group are shown in figure 1. No embryo has been collected at hatched blastocyst stage in Boec coculture and *in vivo* groups. Cleavage rate was not significantly different between all culture media, except for mSOF + 0% FCS in experiment A (74% vs 59-64%). A significant lower blastocyst yield was obtained at days 7 and 8 in Boec coculture compared to the mSOF + 0, 5, 10% FCS ($P<0.05$). Same result was obtained in culture media with 100 µM β-ME ± 100 µM C18:2 ± 10 µM C22:6 compared to mSOF + 5% FCS ($P<0.05$). The cell number counting was significantly different between the 3 stages of development ($P<0.05$): more blastomeres were found in hatched blastocyts than in blastocysts and expanded blastocysts. Additionaly, the cell number of blastocysts and expanded blastocyst stages was significantly higher in mSOF + 5% FCS or mSOF + 10% FCS media compared to Boec coculture and *in vivo* media ($P<0.05$) (blastocyst stage: 102 ± 11 and 107 ± 10 vs. 81 ± 10 and 78 ± 11 cells, respectively; expanded blastocyst stage: 140 ± 9 and 139 ± 11 vs. 98 ± 14 and 93 ± 6 cells, respectively). No difference was found between the other culture media in the 3 embryo development stages.

3.2. Effect of RT primers choice on cDNA quantification (experiment 1)

Five trials were performed. Independent samples of 93, 80, 74, 72 and 58 embryos (expanded blastocysts and hatched blastocysts) were collected at Day 7 post IVF. RT was performed on 2.5 equivalent embryo in a total volume of 20 µL. Six genes were analysed: luciferase, 18S, RPL19, adipophilin, SCD1 (stearoyl-CoA desaturase 1) and ACC (acetyl-coa-carboxylase). cDNA was diluted to performed Q-PCR amplification on 6.25 10^{-5} equivalent embryos per µL for 18S and on 6.25 10^{-4} for the other genes. Luciferase and target gene/luciferase ratio values normalized to the mean of the same ratio for RT1 are shown in figure 2. 18S ratio was artificially divided by 40 for histogram presentation. A significant difference was observed on 18S/luciferase ratio between RT1 and RT2, RT1 and RT3 ($P<0.05$), but not between RT2 and RT3. Higher efficiency level was obtained for 18S with random primers or 18S-specific primer combined with oligo(dT)15 primers as oligo(dT)15 primers alone. No significant difference was observed for the other genes, except for adipophilin gene between RT1 and RT2.

3.3. Adipophilin and development environment (experiments 2, 3 and 4)

Six trials were performed for each experiment. Six samples of 20 embryos (experiment 2) and six samples of 5 embryos (experiments 3 and 4) were collected at expanded blastocyst and hatched blastocyst stages, except for coculture (seven samples, experiment 3), for the ewe oviduct development (nine samples, experiment 3) and *in vivo* group (eight, experiment 4). RT was performed with oligo(dT)15 primers and random primers. cDNA was diluted to performed Q-PCR amplification on 5 10^{-5}, 62.5 10^{-5} and 1.25 10^{-5} equivalent embryos per µL for 18S in experiments 2, 3 and 4 respectively, and on 5 10^{-3}, 6.25 10^{-3} and 1.25 10^{-3} for the others, i.e. luciferase, RPL19 and Adipophilin. Adipophilin

values normalized to 18S and RPL19 are shown in figure 3. No significant difference was observed between mSOF + 0% FCS and mSOF + 10% FCS groups (figure 3.1), between mSOF + 5% FCS and mSOF + 10% FCS (figure 3.2) and between mSOF + 5% FCS + 100 µM β-ME and mSOF + 5% FCS + 100 µM β-ME + 10 µM C22:6 (figure 3.3) irrespective of the housekeeping gene used as reference ($P>0.05$). A significant lower adipophilin transcript level was found in Boec culture group compared to mSOF + 10% FCS group (figure 3.2) and in *in vivo* group compared to mSOF + 5% FCS + 100 µM β-ME with or without 10 µM C22:6 (figure 3.3) irrespective of housekeeping gene ($P<0.05$). Moreover, a significant lower level was found in Boec culture group compared to mSOF + 5% FCS group but only after 18S normalization ($P<0.05$), and in the ewe oviduct environment compared to mSOF + 5% FCS and mSOF + 10% FCS groups but only after RPL19 normalization ($P<0.05$) (figure 3.2).

4. Discussion

4.1. Blastocyst yield, embryo cell number and culture environment

In this present study, β-ME supplementation and Boec coculture environment reduced significantly blastocyst yield rate, compared to mSOF medium with BSA or FCS alone. In our culture conditions, i.e. mSOF and humidified atmosphere of 5% CO_2, 5% O_2 and 90% N_2, addition of 100 µM β-ME from presumptive zygote stage onwards and during all embryonic preimplantation development seems to have a toxic effect on embryo development. These results are not in agreement with 50 and 100 µM β-ME supplementation effect previously reported on bovine blastocyst development [49,50]. After addition of β-ME at the beginning of *in vitro* development, these authors have found an increase of blastocyst yield and hatching rates [49,50]. However, after cryopreservation, higher *in vitro* survival rate was observed for these embryos (Al Darwich, unpublished), as they acquired a better quality in terms of

cryotolerance after addition of 100 µM β-ME during embryo development. It can also not be maintained that β-ME is really toxic for embryo. Same result was obtained with Boec coculture environment, i.e. lower blastocyst yield rate, but higher *in vivo* survival rate compared to mSOF [51]. So blastocyst yield decrease is not necessarily associated to lower quality and vice versa.

Cell counting on more than 650 embryos cultured in several environments showed that some culture media could affect the number of cell in the embryos. Addition of 5 or 10% of serum in mSOF medium increased the cell number of blastocysts and expanded blastocyts compared to *in vivo* and Boec coculture, but no difference was observed between mSOF media with or without serum. This result was similar to previous results found with Day 7 bovine embryos produced in SOF medium with only 0.3% BSA or 0% FCS supplementation [52], but different to others [31]. Indeed, these last authors have observed a higher cells count for Day 7 blastocysts grown in medium with 0% FCS and 0.4% BSA compared to blastocysts grown in SOF with 5% FCS, 139 ± 5 vs. 100 ± 5 cells respectively, and more expanded blastocysts were found in the first medium. The fact that addition of serum was associated with cell number reduction and apoptosis [53] was not observed in the present study. This difference could be due to the variable serum composition, even between batches. No difference was found on cell number between bovine embryos developed in ewe oviduct and in SOF supplemented with 10% FCS [54]. Compared to the present results, it could be supposed that *in vivo* environment and ewe oviduct have not the same action on embryo cell proliferation, or oocytes origin is most important. It is more reasonable to suppose that compared embryos have not exactly the same development stage. Indeed, it is very important to compare equivalent embryo developmental stages, since as clearly confirmed in the present study, the cell number increased in advanced developmental stages [55]. This observation was taken into account in samples allotment for mRNA analysis in order to minimize the effect of

cell number on expression level study, even if data were normalized with housekeeping gene. In this present study, embryos were selected on development stage and on diameter to minimize the cell number variability.

4.2. Effect of RT primers choice on cDNA quantification

To test 18S as an endogenous reference gene for embryo mRNA quantification, three different RT were performed in the present study. Higher 18S transcript level was obtained with random primers or 18S-specific primer combined with oligo(dT)15 primers compared to oligo(dT)15 primers alone. These results are in agreement with those reported previously [56]. As 18S is a ribosomal RNA, 18s-RNA lacks the 3' poly-A tail found on most mRNA species, and as a consequence, RT using only oligo(dT)15 were poorly efficient. mRNA expression level of the other genes analysed was mainly not affected by the nature of the primers used for the reverse transcription, indicating that random primers and 18S-specific primers do not interfere with oligo(dT)15 primers at the concentration used and that all the genes tested are poly-adenylated. These results were similar to those found on mRNA of a target gene encoding for pancreatitis-associated protein [56], but not similar to those found on histone H2a mRNA, at several developmental stages, from GV oocyte to blastocyst, explained by the exceptional mRNA poly(A) tail lacking [57]. As mRNA could have no or short poly(A) tail or could be deadenylated, oligo(dT)15 and random primers combinations are an efficient method for embryo mRNA priming during RT [43,45]. On the contrary, study of mRNA deadenylation should be performed with oligo(dT) and random primer separately [58-60]. The random primer amount has also a real impact on the RNA detection level [57]. In order to maximize 18S-RNA and target genes mRNA co-amplification, the RT2 method, i.e. oligo(dT)15 and random primers combination, was chosen in the following study.

4. 3. Adipophilin and culture environment

As shown in figure 3, the adipophilin transcript relative abundance was clearly lower in bovine blastocysts produced *in vivo* and with Boec coculture environment as compared with blastocysts produced *in vitro* in a synthetic medium with or without serum, as found previously by Charpigny et al. (personal communication). This adipophilin mRNA expression variation is in agreement with embryo triglyceride contents determined by HPLC [10,61], and in agreement with ultrastructural embryo study [62]. Bovine *in vitro* produced embryos contain much more lipids droplets, particularly in trophoblast cells, than *in vivo* embryos [62], and much more triglycerides (88% of total lipid vs. 40-50%, respectively) [61]. Our results showed that the expression of adipophilin was down-regulated in Day 7 bovine *in vivo* produced blastocysts and in Boec group. This protein is known to be associated to lipids accumulation in several mammalian cells and tissues [33,63]. This indicates that Boec has modified embryo developmental parameters in mSOF with 10% FCS compared to those developed in mSOF with 10% FCS alone, in order to reduce adipophilin mRNA expression at the level observed for *in vivo* produced embryo. Indeed, Boec are known to produce proteins which could regulate embryo development and metabolism, leading to improved viability, i.e. embryotrophic factors such as growth factors, complement component C3 or osteopontin [48,64,65] or antioxidant enzymes like Copper, Zinc Superoxide Dismutase (Cu,Zn-SOD) or Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (GPx-4), protecting the embryos against free radicals toxicity.

Except Boec culture group, no *in vitro* group has induced a modification of adipophilin mRNA expression in bovine blastocysts in our study. The addition of FCS (5% or 10%) did not regulate adipophilin mRNA expression. These results do not correlate with previous studies of embryo lipids composition determined by gas chromatography [25,26,31], by electronic microscopy [28], or by fluorescent lipid staining [29]. All these cited studies

have shown that *in vitro* culture media complemented with 5 or 10% of FCS increased dramatically triglycerides content (34 ng vs. 62 ng for 0% vs. 10% FCS addition respectively, [25]) and lipid droplets accumulation. Intrinsic quality of the oocyte, COC maturation medium and FCS batch variation could account for this discrepancy [1,66]. Similarly, the addition of 10 µM of docosahexaenoic acid (C22:6), a polyunsaturated fatty acid, had not modified adipophilin expression. On the other hand, the addition of the conjugated isomer of linoleic acid (trans-10, cis-12 octadecadienoic acid: t10, c12 CLA), another polyunsaturated fatty acid, allowed fat index reduction in embryos [32]. C22:6 could maybe not interfere with embryo lipid storage, and consequently with embryo cryosurvival as linoleic acid does [67].

The effect of ewe oviduct environment on adipophilin mRNA expression varied according to housekeeping gene normalization as shown in figure 3.2. The adipophilin mRNA expression was significantly down-regulated in ewe oviduct environment, compared with *in vitro* groups (mSOF + 5% or 10% FCS) after RPL19 normalization, whereas only a tendency was observed after 18S normalization. These differential results clearly point out the importance of reference gene choice in embryo mRNA quantification. A geometric mean of these two genes could also be used as previously proposed [45]. In this case, same results as found after normalization with 18S alone were obtained. More samples have to be also analysed to reduce variability. Further experiments should be carried out to clarify this result. However, results obtained after RPL19 normalization were in agreement with the observation of an improved *in vitro* survival following cryopreservation for IVP embryos developed in ewe oviduct as compared with those developed *in vitro* [3,54], since embryo sensitivity to cryopreservation is known to be increased by intracellular lipids accumulation [24,26,68,69]. Energetic nutrients found by IVM/IVF zygotes cultured in ewe oviduct environment may contribute to regulate lipids accumulation and in turn, adipophilin mRNA expression. Moreover, *in vivo* survival rates following OPS vitrification of IVP embryos developed in

ewe oviduct were similar to those of *in vivo* embryo produced (6/10 and 4/6 respectively, Guignot et al., unpublished), and higher than those of embryos developed in mSOF + 5% FCS (1/13). Metabolism of embryos developed in ewe oviduct may be similar to *in vivo* embryos, reinforcing the point that the culture system is the major determinant of blastocysts quality, irrespective of oocyte origin.

5. Conclusion

These results showed that adipophilin mRNA was expressed in Day 7 bovine embryos and that embryo culture environment changes its expression. Adipophilin mRNA expression is down-regulated during development in the ewe oviduct and under Boec coculture, whereas it is up-regulated in mSOF with or without FCS and C22:6 supplementation. Adipophilin expression seems to reflect embryo lipid accumulation previously reported in literature in different embryo culture systems, correlated to embryo cryosurvival. Therefore, adipophilin mRNA expression level may be a specific marker for triglyceride accumulation and cryotolerance in bovine embryo. It would be interesting to further investigate a kinetic of this adipophilin mRNA expression throughout bovine embryo development

Acknowledgements

This study was funded by the French National Institute for Agricultural Research (Nouzilly, France) and supported by the Syrian University of Aleppo through fellowships of A. Al darwich. The authors are grateful to E. Briant and his team at INRA Nouzilly for *in vivo* embryo production, G. Gomot, J. Cognié, L. Ouvrard and their team for embryo production in ewe oviduct and their care to animals. They wish to thank sincerely A. Thelie and R. Dalbies-Tran for skilful help in PCR technique and C. Briant for statistical help.

References

[1] Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. Reprod Domest Anim. 2003;38(4):259-267.

[2] Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. Biol Reprod. 2002;66(3):589-595.

[3] Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. 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. 2002;61(2):234-248.

[4] Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, Schultz RM. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. Biol Reprod. 2000;62(6):1526-1535.

[5] Natale DR, De Sousa PA, Westhusin ME, Watson AJ. Sensitivity of bovine blastocyst gene expression patterns to culture environments assessed by differential display RT-PCR. Reproduction. 2001;122(5):687-693.

[6] Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. Reprod Fertil Dev. 2005;17(1-2):23-35.

[7] Massip A, Mermillod P, Dinnyes A. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. Hum Reprod. 1995;10(11):3004-3011.

[8] Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans ACO. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. Theriogenology. 2006;65(1):137-152.

[9] Pollard JW, Leibo S. P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. Theriogenology 1994;41(3):101-106.

[10] Abd El Razek IM, Charpigny G, Kodja S, Marquant-Le Guienne B, Mermillod P, Guyader-Joly C, Humblot P. Differences in lipid composition between in vivo- and in vitroproduced bovine embryos. Theriogenology. 2000;53(346 abstract.

[11] Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H, de Kruif A. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. Theriogenology. 1992;38(5):905-919.

[12] Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, Boland MP. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. Mol Reprod Dev. 2001;58(2):186-195.

[13] Boni R, Tosti E, Roviello S, Dale B. Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. Biol Reprod. 1999;61(4):1050-1055.

[14] Lonergan P, Pedersen HG, Rizos D, Greve T, Thomsen PD, Fair T, Evans A, Boland MP. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. Biol Reprod. 2004;71(4):1096-1100.

[15] Viuff D, Rickords L, Offenberg H, Hyttel P, Avery B, Greve T, Olsaker I, Williams JL, Callesen H, Thomsen PD. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. Biol Reprod. 1999;60(6):1273-1278.

[16] Tesfaye D, Ponsuksili S, Wimmers K, Gilles M, Schellander K. A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced in vitro or in vivo. Reprod Domest Anim. 2004;39(6):396-404.

[17] Leibo SP. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. Theriogenology. 2008;69(1):37-47.

[18] Martino A, Pollard JW, Leibo SP. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. Mol Reprod Dev. 1996;45(4):503-512.

[19] Thompson JG. Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. Reprod Fertil Dev. 1997;9(3):341-354.

[20] Leibo SP, Pollard JW, Martino A. Chilling and freezing sensitivity of “reassembled” in vitro-derived bovine embryos Theriogenology. 1995;43(265.

[21] Seidel GE, Jr. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. Theriogenology. 2006;65(1):228-235.

[22] Ushijima H, Yamakawa H, Nagashima H. Cryopreservation of bovine IVM/IVF embryos at early cleavage stage following removal of cytoplasmic lipid droplets Theriogenology. 1996;45(159 (Abstr.).

[23] Tominaga K, Shimizu M, Ooyama S, Izaike Y. Effect of lipid polarization by centrifugation at different developmental stages on post-thaw survival of bovine in vitro produced 16-cell embryos. Theriogenology. 2000;53(8):1669-1680.

[24] Diez C, Heyman Y, Le Bourhis D, Guyader-Joly C, Degrouard J, Renard JP. Delipidating in vitro-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. Theriogenology. 2001;55(4):923-936.

[25] Ferguson EM, Leese HJ. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. J Reprod Fertil. 1999;116(2):373-378.

[26] Sata R, Tsujii H, Abe H, Yamashita S, Hoshi H. Fatty Acid Composition of Bovine Embryos Cultured in Serum-Free and Serum-Containing Medium during Early Embryonic Development. Reprod Fertil Dev 1999;45(97-103.

[27] Abe H, Hoshi H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. J Reprod Dev. 2003;49(3):193-202.

[28] Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. Mol Reprod Dev. 2002;61(1):57-66.

[29] Leroy JL, Genicot G, Donnay I, Van Soom A. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with nile red: a practical approach. Reprod Domest Anim. 2005;40(1):76-78.

[30] Cho SR, Cho SK, Lee SL, Lee HJ, Choe SY, Rho GJ. Enhanced cryosurvival of bovine blastocysts produced in vitro in serum-free medium. J Assist Reprod Genet. 2002;19(10):487-492.

[31] Reis A, Rooke JA, McCallum GJ, Staines ME, Ewen M, Lomax MA, McEvoy TG. Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro. Reprod Fertil Dev. 2003;15(5):275-284.

[32] Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, Horta AE, Portugal PV, Bessa RJ, Silva JC, Pereira MS, Marques CC. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). Anim Reprod Sci. 2007;98(3-4):293-301.

[33] Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. Cell Tissue Res. 1998;294(2):309-321.

[34] Phillips SA, Choe CC, Ciaraldi TP, Greenberg AS, Kong AP, Baxi SC, Christiansen L, Mudaliar SR, Henry RR. Adipocyte differentiation-related protein in human skeletal muscle: relationship to insulin sensitivity. Obes Res. 2005;13(8):1321-1329.

[35] Jiang HP, Serrero G. Proc. Natl. Acad. Sci. . USA, 1992;7856-7860.

[36] Imamura M, Inoguchi T, Ikuyama S, Taniguchi S, Kobayashi K, Nakashima N, Nawata H. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002;283(4):E775-783.

[37] Gao J, Serrero G. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. J Biol Chem. 1999;274(24):16825-16830.

[38] Gao J, Ye H, Serrero G. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids. J Cell Physiol. 2000;182(2):297-302.

[39] Larigauderie G, Furman C, Jaye M, Lasselin C, Copin C, Fruchart JC, Castro G, Rouis M. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24(3):504-510.

[40] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. 2000;25(2):169-193.

[41] Fink L, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. Nat Med. 1998;4(11):1329-1333.

[42] 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(5):1465-1472.

[43] Rizos D, Gutierrez-Adan A, Moreira P, O'Meara C, Fair T, Evans AC, Boland MP, Lonergan P. Species-related differences in blastocyst quality are associated with differences in relative mRNA transcription. Mol Reprod Dev. 2004;69(4):381-386.

[44] Boelhauve M, Sinowatz F, Wolf E, Paula-Lopes FF. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. Biol Reprod. 2005;73(4):737-744.

[45] Goossens K, Van Poucke M, Van Soom A, Vandesompele J, Van Zeveren A, Peelman LJ. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. BMC Dev Biol. 2005;5(27.

[46] Donnay I, Faerge I, Grondahl C, Verhaeghe B, Sayoud H, Ponderato N, Galli C, Lazzari G. Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. Theriogenology. 2004;62(6):1093-1107.

[47] 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(4):683-700.

[48] Mermillod P, Vansteenbrugge A, Wils C, Mourmeaux JL, Massip A, Dessy F. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. Biol Reprod. 1993;49(3):582-587.

[49] Caamano JN, Ryoo ZY, Thomas JA, Youngs CR. beta-mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine in vitro-matured/in vitro-fertilized embryos. Biol Reprod. 1996;55(5):1179-1184.

[50] Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Takahashi H, Okano A. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. Biol Reprod. 2002;66(3):562-567.

[51] Rodriguez-Dorta N, Cognie Y, Gonzalez F, Poulin N, Guignot F, Touze JL, Baril G, Cabrera F, Alamo D, Batista M, Gracia A, Mermillod P. Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified in vitro produced goat embryos. Theriogenology. 2007;68(6):908-913.

[52] Thompson JG, Allen NW, McGowan LT, Bell AC, Lambert MG, Tervit HR. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. Theriogenology. 1998;49(6):1239-1249.

[53] Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. J Reprod Fertil. 1999;117(1):97-105.

[54] Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. Theriogenology. 2000;54(5):659-673.

[55] Imai K, Matoba S, Dochi O, Shimohira I. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryo. J Vet Med Sci. 2002;64(10):887-891.

[56] Zhu LJ, Altmann SW. mRNA and 18S-RNA coapplication-reverse transcription for quantitative gene expression analysis. Anal Biochem. 2005;345(1):102-109.

[57] Vigneault C, Gilbert I, Sirard MA, Robert C. Using the histone H2a transcript as an endogenous standard to study relative transcript abundance during bovine early development. Mol Reprod Dev. 2007;74(6):703-715.

[58] Lequarre AS, Traverso JM, Marchandise J, Donnay I. Poly(A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. Biol Reprod. 2004;71(2):425-431.

[59] Bettegowda C, Foss CA, Cheong I, Wang Y, Diaz L, Agrawal N, Fox J, Dick J, Dang LH, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Pomper MG. Imaging bacterial infections with radiolabeled 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(4):1145-1150.

[60] Thelie A, Papillier P, Pennetier S, Perreau C, Traverso JM, Uzbekova S, Mermillod P, Joly C, Humblot P, Dalbies-Tran R. Differential regulation of abundance and deadenylation of maternal transcripts during bovine oocyte maturation in vitro and in vivo. BMC Dev Biol. 2007;7(125.

[61] Charpigny G, Guesnet P, Marquant-LeGuiene B, Heyman Y, Mermillod P, Humblot P. Fatty acid composition of triglycerides, phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines of bovine embryos. BRG. 2003;4(159–172.

[62] Abe H, Otoi T, Tachikawa S, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. Anat Embryol (Berl). 1999;199(6):519-527.

[63] Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. J Lipid Res. 1997;38(11):2249-2263.

[64] Lee YL, Lee KF, Xu JS, He QY, Chiu JF, Lee WM, Luk JM, Yeung WS. The embryotrophic activity of oviductal cell-derived complement C3b and iC3b, a novel function of complement protein in reproduction. J Biol Chem. 2004;279(13):12763-12768.

[65] Goncalves RF, Staros AL, Killian GJ. Oviductal fluid proteins associated with the bovine zona pellucida and the effect on in vitro sperm-egg binding, fertilization and embryo development. Reprod Domest Anim. 2008;43(6):720-729.

[66] Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. Reproduction. 2001;122(1):131-138.

[67] Hochi S, Kimura K, Hanada A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. Theriogenology. 1999;52(3):497-504.

[68] Dobrinsky JR. Cellular approach to cryopreservation of embryos. Theriogenology. 1996;45(1):17-26.

[69] Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Murakami M, Kikkawa Y, Suzuki T. Cryopreservation of mature bovine oocytes following centrifugation treatment. Cryobiology. 1997;34(1):36-41.

Illustrations Captions

Table 1. Primers sequences

Table 2. Cleavage and embryo yield rates obtained in eight different media

Within a column, means without a common superscript differ (P < 0.05, Chi2 test).

Figure 1. Cell number of embryos developed in eight different media.

[a, b] Different superscripts indicate significant difference (P<0.05: Kruskal-Wallis test) between media at a given development stage.

Number of analysed embryos is indicated in each bar. ⬚ : mSOF + 10% FCS ; ▩ : mSOF + 5% FCS ; ▧ : mSOF + 0% FCS ; ▨ : mSOF + 5%FCS + 100 µM β-ME ; ▨ : mSOF + 5% FCS + 100 µM β-ME + 100 µM C18:2 ; ▩ : mSOF + 5 % FCS + 100 µM β-ME + 10 µM C22:6 ; ▨ : Boec coculture and ▨ : *in vivo*.

A significant difference was observed between the 3 stages of development (P<0.05): more blastomeres were found in hatched blastocyts than in blastocysts and expanded blastocysts.

The cell number was significantly higher for blastocysts and expanded blastocyst stages in mSOF + 5% and + 10% FCS media compared to coculture and *in vivo* environment (P<0.05).

No different was found between the other culture media in the 3 embryo development stages.

Figure 2. Profile of selected transcripts according to different RT.

[a, b] Different superscripts indicate significant difference (P<0.05: Kruskal-Wallis test) between three RT. 18S ratio was artificially divided for histogramme presentation. ☐ : RT1: oligo-$(dT)_{15}$ primer; ☐ : RT2, oligo-$(dT)_{15}$ primer and random primer; ■: RT3, oligo(dT)15 primer and 18S-RNA-specific primer.

Luciferase and target gene/luciferase values normalized to the mean of the same ratio for RT1. A significant difference was observed on 18S/luciferase ratio between RT1 and RT2, RT1 and RT3 ($P<0.05$), but not between RT2 and RT3. No significant difference was observed for the other genes, except for adipophilin gene between RT1 and RT2.

Figure 3. Variation of adipophilin mRNA in bovine embryos according to different media.

[a, b, c] Different superscripts indicate significant difference ($P<0.05$: Kruskal-Wallis test) between media. Adipophilin values were normalized to 18S and to RPL19. 1/ ▧ : mSOF + 0% FCS; ⬚: mSOF + 10% FCS. 2/ ▩ : mSOF + 5% FCS; ⬚ : mSOF + 10% FCS; ▨ : Boec culture; ▧ : Ewe oviduct. 3/ ▩ : mSOF + 5%FCS + 100 µM β-ME; ▩ : mSOF + 5% FCS + 100 µM β-ME + 10 µM C22:6; ▩ : *in vivo.*

Lower adipophilin transcripts were found in Boec culture group compared to mSOF + 10% FCS group (figure 3.2) and in *in vivo* group compared to mSOF + 5% FCS + 100 µM β-ME with or without 10 µM C22:6 (figure 3.3) irrespective of housekeeping gene ($P<0.05$). Moreover, lower transcripts were found in Boec culture group compared to mSOF + 5% FCS group but only after 18S normalization ($P<0.05$), and in the ewe oviduct environment compared to mSOF + 5% FCS and mSOF + 10% FCS groups but only after RPL19 normalization ($P<0.05$) (figure 3.2). No significant difference was observed between the other media.

Table 1.

gene	primer	sequence (5' --> 3')	Genbank accession
18S	**As6 RT**	TCGCTCCACCAAC	DQ222453
	S3	CGGACCAGAGCGAAAGCATTTG	
	As4	GAATAACGCCGCCGCATCG	
RPL19	**S**	AATCGCCAATGCCAACTC	AY158223
	As	CCCTTTCGCTTACCTATACC	
luciferase	**S2**	TCATTCTTCGCCAAAAGCACTCTG	X84848
	As2	AGCCCATATCCTTGTCGTATCCC	
ACC	**S1**	TGCTTCCCATTTGCCATC	AJ132890
	As1	CTGCCATCCTCACGACCT	
SCD1	**S3**	CTGGCTGGTGAATAGTGCTG	NM_173959
	As3	AAGGTGTGGTGGTAGTTGTGG	
Adipophilin	**S**	ACAACACACCCCTCAACTGG	AJ011680
	As	CTGCCTGCCTACTTCAGACC	

Table 2.

Culture medium	Experiment A, 3 trials				Experiment B, 3 trials				Experiment C, 5 trials			
	COCs (n)	Cleavage % (n)	Blastocyst yield		COCs (n)	Cleavage % (n)	Blastocyst yield		COCs (n)	Cleavage % (n)	Blastocyst yield	
			Day 7 % (n)	Day 8 % (n)			Day 7 % (n)	Day 8 % (n)			Day 7 % (n)	Day 8 % (n)
mSOF +BSA + 0% FCS	359	74 (265) [a]	36 (131) [a]	40 (144) [a]								
mSOF +BSA + 10% FCS	328	59 (192) [b]	27 (89) [b]	29 (94) [b]								
Boec coculture	353	59 (207) [b]	13 (45) [c]	20 (70) [c]								
mSOF + 5% FCS	280	64 (180) [b]	28 (79) [b]	32 (89) [b]	199	69 (138) [a]	40 (79) [a]	41 (81) [a]	571	59 (336) [a]	18 (101) [a]	21 (121) [a]
mSOF + 5% FCS + β-ME					220	67 (148) [a]	22 (48) [b]	26 (58) [b]	580	56 (324) [a]	11 (62) [b]	16 (95) [b]
mSOF + 5% FCS + β-ME + 100µM C18:2					326	66 (216) [a]	17 (55) [b]	26 (22) [b]				
mSOF + 5%FCS + β-ME+10µM C22:6									587	54 (317) [a]	11 (67) [b]	15 (90) [b]

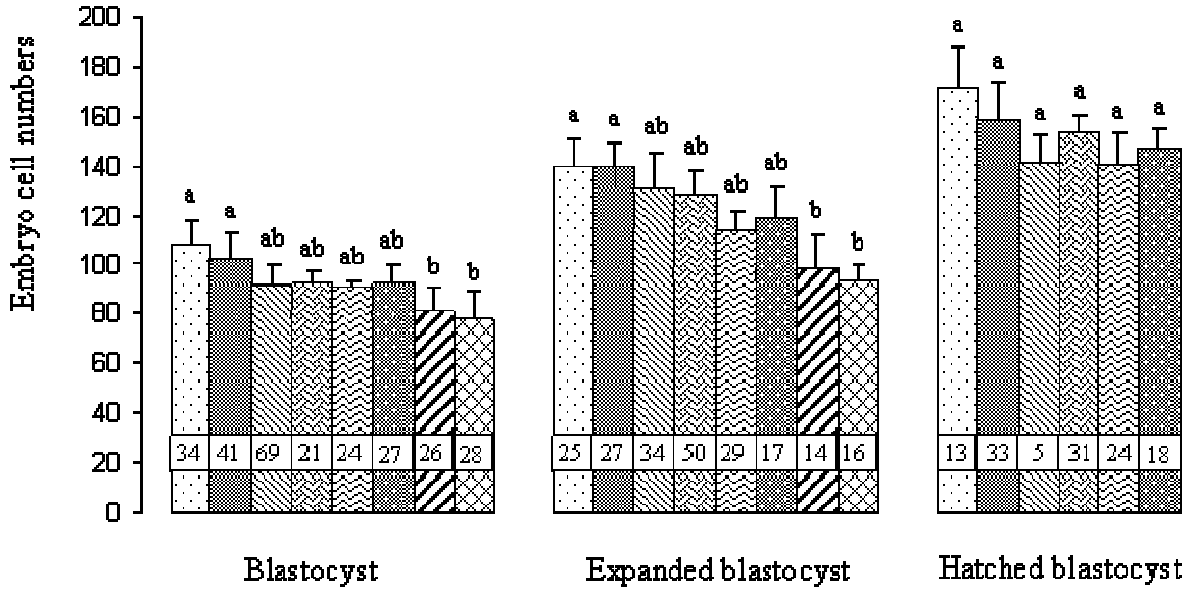

Embryo cell numbers
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
a a ab ab ab ab b b
34 41 69 21 24 27 26 28
Blastocyst
a a ab ab ab b b
25 27 34 50 29 17 14 16
Expanded blastocyst
a a a a a
13 33 5 31 24 18
Hatched blastocyst

Figure 1.

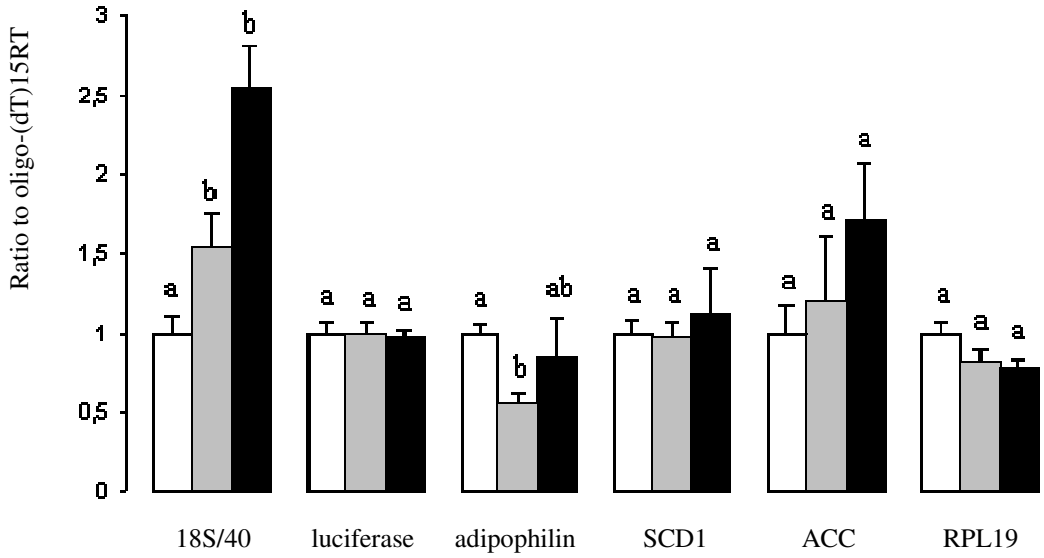
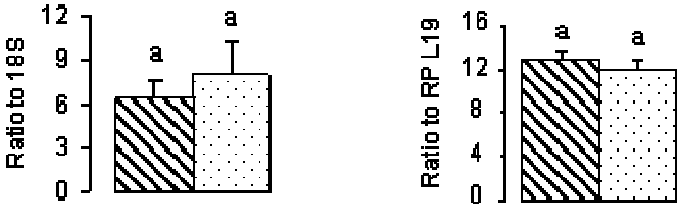
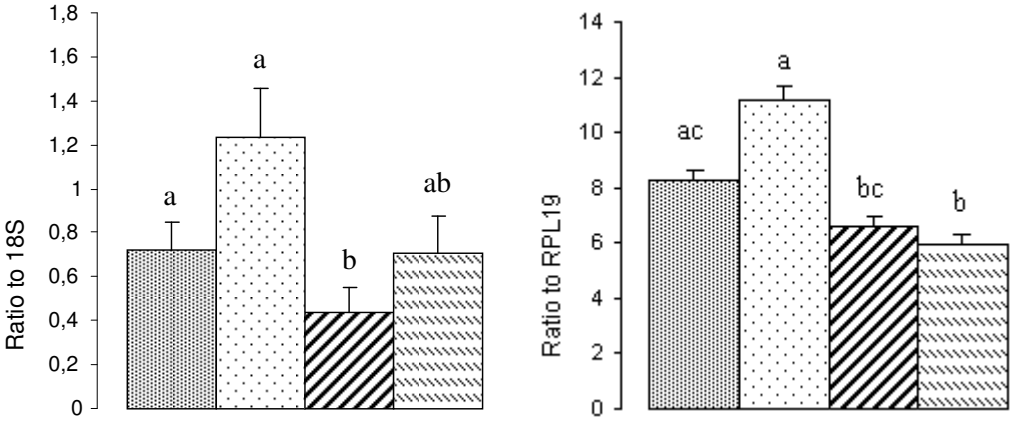

Ratio to oligo-(dT)15RT
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
a
b
b
a
a
a
a
b
ab
a
a
a
a
a
a
a
a
a
18S/40
luciferase
adipophilin
SCD1
ACC
RPL19

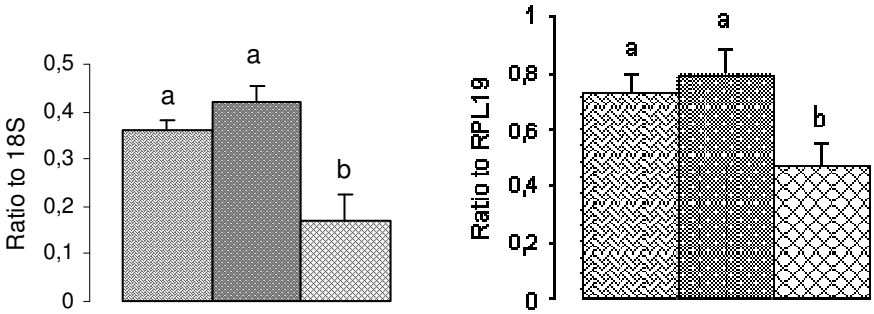
Figure 2.



3.1. Experiment 2



3.2. Experiment 3



3.3. Experiment 4

Figure 3.

Aticle 2

Effect of fatty acid supplementation on embryo cryoresistance, gene expression and AMPKα phosphorylation in IVF-derived bovine embryos

Abdulrahman AL DARWICH, Christine PERREAU, Marie Hélène PETIT, Pascal PAPILLIER, Joëlle DUPONT, Pascal MERMILLOD and Florence GUIGNOT

Article soumis le 16 octobre 2009 à Domestic Animal Endocrinology

Elsevier Editorial System(tm) for Domestic Animal Endocrinology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Effect of fatty acid supplementation on embryo cryoresistance, gene expression and AMPKα phosphorylation in IVF-derived bovine embryos

Article Type: Original Research Paper

Keywords: Embryo culture environment; PUFA; SCD1; FADS2; SREBP1

Corresponding Author: Mrs Florence Guignot, Ph.D

Corresponding Author's Institution: INRA

First Author: Abdulrahman Al darwich

Order of Authors: Abdulrahman Al darwich; Christine Perreau; Marie-Hélène Petit; Pascal Papillier; Joëlle Dupont; Pascal Mermillod; Florence guignot

Abstract: The objectives of the present study were to evaluate the effect of conjugated linoleic acid (CLA t10, c12, C18:2), linolenic acid (C18:3) and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6) supplementation on in vitro bovine embryo development, embryo survival after cryoconservation, gene expression and AMPKα phosphorylation. Control groups with mSOF ± 100µM β-mercaptoethanol (β-ME) were performed. Effect of co-culture with bovine oviduct epithelial cell (Boec) monolayers, serum supplementation and embryo development in the ewe oviduct were also tested on gene expression. Experiments 1 and 2: a significant lower d 7 embryo survival was found with 100µM C22:6 and 100µM C18:2 supplementation compared to 1µM C22:6 and 100µM β-ME supplementation ($P<0.05$). C18:3 supplementation had no effect on d 7 embryo survival, but 100µM C18:3 has significantly increased d 8 embryo survival compared to 100µM β-ME supplementation ($P<0.05$). Experiments 3 and 4: SCD1 and FADS2 mRNA decrease significantly after 10µM C22:6 and 100µM C18:2 supplementation, respectively, compared to all other supplementations ($P<0.05$). A significant lower SREBP1 transcript level was found with 100µM C18:2, 10µM C22:6 and 10µM C18:3 supplementations compared to groups without fatty acid supplementation, as for ACC mRNA after 10µM C22:6 supplementation compared to mSOF group. FAS, adipophilin, ACSL1, DGAT, CPT-II mRNAs expression and AMPKα phosphorylation were not modified with PUFA supplementation. Experiment 5: SCD1 and FAS mRNA decrease significantly in Boec group compared to serum supplementation, as SCD1 mRNA in ewe oviduct group. In conclusion, this study showed that a PUFA supplementation with C18:2, C18:3 or C22:6 in bovine culture development for six d and coculture with Boec down-regulate mRNA expression of proteins involved in lipid metabolism in d 7-8 embryo, i.e. ACC, SCD1 and FADS2 desaturases, probably through SREBP1 mRNA regulation, indicating a modification of saturated / unsaturated fatty acid balance in bovine blastocyst.

Article 2

Effet de l'ajout d'acides gras sur la cryorésistance, l'expression génique et la phosphorylation de l'AMPKα dans les embryons bovins

Introduction

Le niveau d'accumulation des gouttelettes lipidiques dans des blastocystes bovins produits *in vitro* et leur cryo-résistance sont dépendants des conditions de développement, notamment de la présence de sérum dans le milieu, mais aussi de l'ajout d'acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique conjugué, ALC trans10, cis12. Dans de nombreux tissus, les acides gras essentiels comme les acides linoléique et linolénique, ou encore les acides gras polyinsaturés à longue chaîne carbonée, sont bien connus pour moduler l'expression de gènes et l'activité d'enzymes impliqués dans le métabolisme lipidique, via des médiateurs clés comme des facteurs de transcription, des récepteurs nucléaires ou l'AMPK. L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets de l'ajout de deux acides gras essentiels, l'**acide linoléique conjugué** (ALC t10, c12, C18: 2) et l'**acide linolénique** (C18: 3), et d'un acide gras polyinsaturé à longue chaîne, l'**acide docosahexaénoïqu**e (**DHA**, C22: 6) dans le milieu de développement *in vitro* d'embryons bovins, sur la survie de ces embryons après cryoconservation par vitrification OPS, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique embryonnaire par RT-QPCR, et la phosphorylation d'AMPKα par western blot. L'effet de la coculture a également été évalué sur l'expression de SCD1 (stearoyl-CoA desaturase) et FAS (fatty acid synthase).

Plan expérimental - Méthodes

Les deux premières expériences ont consisté à tester différentes concentrations d'acides gras 1, 10 et 100 µM, sur le taux de production embryonnaire et la survie *in vitro* des embryons après vitrification et dégel, afin de choisir une concentration optimum pour les analyses des transcrits (expérience 3) et de la phosphorylation d'AMPKα (expérience 4). Une cinquième expérience a été réalisée pour évaluer l'effet de la coculture sur Boec, versus 5 % SVF, 10 % SVF, et un développement embryonnaire précoce dans des oviductes de brebis *in vivo*. Un antioxydant, le β-mercaptoethanol (β-ME) à 100 µM a été ajouté aux milieux enrichis en lipides.

Les gènes testés codent pour **SCD1** (stearoyl-CoA desaturase 1), **FADS2** (fatty acid desaturase 2), **ACC** (acetyl-CoA-carboxylase), **FAS** (fatty acid synthase), **ACSL1** (acyl-CoA synthetase long-chain family member 1), **DGAT1** (diacylglycerol O-acyltransferase 1),

l'**adipophiline** (lipoprotéine), **CPT-II** (carnitin palmitoyltransferase-II) et **SREBP1** (sterol regulatory element-binding transcription factor 1). La normalisation a été faite par rapport à la moyenne géométrique des deux gènes rapporteurs internes, le 18S et RPL19, puis par rapport aux valeurs obtenues pour le lot mSOF + 5 % SVF.

Principaux Résultats et Conclusions

Les résultats des deux premières expériences donnent des taux de survie très élevés pour les embryons témoins, c'est-à-dire développés avec 5 % de sérum, et indiquent que les taux de blastocystes et de survie *in vitro* n'ont pas été affectés par l'ajout des acides gras durant la culture d'embryons. Seule une diminution du taux de développement à J7 après ajout de 10 µM C22: 6 et 100 µM C18:2, et une baisse du taux de survie des embryons après ajout de C22:6 et C18:2 à la dose de 100 µM ont été observées. L'ajout de 100µM β-ME a significativement réduit le taux de blastocystes à J7 et J8, mais amélioré le taux de survie *in vitro* des embryons J7 ($P<0,05$) sur l'ensemble des deux expériences.

Les concentrations d'acides gras retenues sont 10 µM pour le C18:3 et C22:6 et 100 µM pour le C18 :2.

Les résultats de l'étude des transcrits montrent que l'expression de SCD1 et FADS2 est significativement réduite après ajout de 10 µM C22:6 et 100 µM C18:2, respectivement, comparés aux autres milieux de culture ($P<0,05$). Le niveau de la transcription dans les embryons pour SREBP1 est significativement plus faible après ajout de 100 µM C18: 2, 10 µM C22: 6 et 10 µM C18: 3 comparé aux milieux sans ajout d'acide gras, ainsi que pour ACC après ajout de 10 µM C22 :6 comparé au milieu mSOF témoin ($P<0,05$). Les quantités de transcrits pour l'adipophiline, ACSL1, DGAT, CPT-II et la phosphorylation d'AMPKα n'ont pas été modifiées après ajout des trois acides gras polyinsaturés testés. Le niveau de transcrits pour SCD1 et FAS dans les embryons développés en coculture est significativement réduit comparé à celui des embryons produits dans un milieu enrichi en sérum ($P<0,05$).

En conclusion, cette étude montre que l'ajout de 100 µM C18:2, 10 µM C18:3 ou 10 µM C22:6 pendant six jours dans le milieu de culture *in vitro* ne modifie pas le taux de survie *in vitro* des embryons après vitrification et dégel, mais régule l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique des embryons bovins à J7-J8, comme ACC, SCD1 et FADS2, et ce, probablement via la régulation de SREBP1. Ce résultat est le signe d'une modification dans le ratio acides gras saturés / insaturés dans l'embryon bovin, qui pourrait sans aucun doute avoir un lien avec une modification de perméabilité des membranes et par conséquence avoir une incidence sur la cryoconservation

des embryons. Pour le milieu coculture, un mécanisme identique est fortement probable, mais reste à vérifier.

Effect of fatty acid supplementation on embryo cryoresistance, gene expression and AMPKα phosphorylation in IVF-derived bovine embryos

A. Al darwich [a, b, c, d], C. Perreau [a, b, c, d], M.H. Petit [a, b, c, d], P. Papillier [a, b, c, d], J. Dupont [a, b, c, d], P. Mermillod [a, b, c, d], F. Guignot [a, b, c, d, *]

[a] INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

[b] CNRS, UMR6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

[c] Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France

[d] Haras Nationaux, F-37380 Nouzilly, France

[*] Corresponding author. INRA, PRC, 37380 Nouzilly, France. Tel.: +33 2 47 42 77 94; fax: +33 2 47 42 77 43. *E-mail address*: Florence.guignot@tours.inra.fr

Abstract

The objectives of the present study were to evaluate the effect of conjugated linoleic acid (CLA t10, c12, C18:2), linolenic acid (C18:3) and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6) supplementation on in vitro bovine embryo development, embryo survival after cryoconservation, gene expression and AMPKα phosphorylation. Control groups with mSOF ± 100µM β-mercaptoethanol (β-ME) were performed. Effect of co-culture with bovine oviduct epithelial cell (Boec) monolayers, serum supplementation and embryo development in the ewe oviduct were also tested on gene expression. Experiments 1 and 2: a significant lower d 7 embryo survival was found with 100µM C22:6 and 100µM C18:2 supplementation compared to 1µM C22:6 and 100µM β-ME supplementation ($P<0.05$). C18:3 supplementation had no effect on d 7 embryo survival, but 100µM C18:3 has significantly

increased d 8 embryo survival compared to 100µM β-ME supplementation ($P<0.05$). Experiments 3 and 4: SCD1 and FADS2 mRNA decrease significantly after 10µM C22:6 and 100µM C18:2 supplementation, respectively, compared to all other supplementations ($P<0.05$). A significant lower SREBP1 transcript level was found with 100µM C18:2, 10µM C22:6 and 10µM C18:3 supplementations compared to groups without fatty acid supplementation, as for ACC mRNA after 10µM C22:6 supplementation compared to mSOF group. FAS, adipophilin, ACSL1, DGAT, CPT-II mRNAs expression and AMPKα phosphorylation were not modified with PUFA supplementation. Experiment 5: SCD1 and FAS mRNA decrease significantly in Boec group compared to serum supplementation, as SCD1 mRNA in ewe oviduct group. In conclusion, this study showed that a PUFA supplementation with C18:2, C18:3 or C22:6 in bovine culture development for six d and coculture with Boec down-regulate mRNA expression of proteins involved in lipid metabolism in d 7–8 embryo, i.e. ACC, SCD1 and FADS2 desaturases, probably through SREBP1 mRNA regulation, indicating a modification of saturated / unsaturated fatty acid balance in bovine blastocyst.

Keywords: Embryo culture environment; PUFA; SCD1; FADS2; SREBP1

1. Introduction

In vitro produced bovine embryos (IVP) are more sensitive to chilling and cryopreservation than those in vivo-derived. Lower density, excessive lipid droplets and triglycerides, and fewer phosphatidyl choline and cholesterol esters were found in embryos in vitro produced as compared to in vivo counterparts (Abe et al., 1999; Charpigny et al., 2003). The embryo lipid content is influenced by embryo culture environment, as serum supplementation (Ferguson and Leese, 1999). Addition of serum to culture medium increases lipid accumulation in bovine embryos (Reis et al., 2003; Leroy et al., 2005a). Moreover, in

vitro serum-free systems, linoleic acid-albumin and conjugated linoleic acid supplementation improved bovine embryo resistance after cryopreservation (Abe et al., 2002; Pereira et al., 2007). Essential fatty acids (linoleic and linolenic acids), conjugated linoleic acids, and long chain polyunsatured fatty acids (PUFA) are well known to alter membrane lipid composition, cellular metabolism, signal transduction and gene expression regulation in various tissues, including liver, heart, adipocyte and brain (for a review, see (Sampath and Ntambi, 2005). PUFA and their various metabolites modulate gene transcription through transcription mediators, the nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor or the liver X receptor and the transcription factors sterol-regulatory element binding protein (SREBP). Moreover, PUFA enhance hepatic AMPK phosphorylation. No data is available in embryo on gene expression regulation and AMPK phosphorylation induced by PUFA or their metabolites. The objectives of the present study were to evaluate the effect of essential fatty acids (conjugated linoleic and linolenic acids) and docosahexaenoic acid (DHA) supplementation on embryo development, embryo survival after cryopreservation, gene expression and AMPKα phosphorylation. Effects of co-culture with bovine oviduct epithelial cell (Boec) monolayers were also tested on gene expression.

2. Materials and Methods

Chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO) unless otherwise indicated.

2.1. Embryo production

All animal procedures were performed in accordance with the French law on experimental procedures (authorizations 37-090 and C37-175-2 of the French Ministry of Agriculture).

2.1.1. Oocyte collection and maturation

Bovine ovaries were collected at a local slaughterhouse and cumulus oocyte complexes (COC) were aspirated from 3 to 6 mm follicles. Only COC showing a compact and complete cumulus and an homogeneous dark oocyte cytoplasm were selected and washed three times in Hepes-buffered Tissue Culture Medium-199 (TCM-199). Groups of 50 to 70 COCs were then placed into four-well plates (NUNC, Roskilde, Denmark) for in vitro maturation (IVM). Each well was containing 500 µL of TCM199 medium supplemented with EGF (10 ng/mL), IGF-I (19 ng/mL), FGF (2.2 ng/mL), hCG (5 IU/mL), PMSG (10 IU/mL), insulin (5 µg/mL), transferrin (5 µg/mL), selenium (5 ng/mL), L-cystein (90 µg/mL), ß-mercaptoethanol (β-ME) (0.1 mM), ascorbic acid (75 µg/mL), glycine (720 µg/mL), glutamine (0.1 mg/mL) and pyruvate (110 µg/mL) (Donnay et al., 2004). The COC were incubated for 22-24 h at 38.8°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.

2.1.2. In vitro fertilization (IVF)

At the end of the maturation period, COC were washed in fertilization medium (Tyrode medium supplemented with 25 mM bicarbonate, 10 mM lactate, 1 mM pyruvate, 6 mg/mL fatty acid free BSA, 100 µg/mL heparin and 40 µg/mL gentamycin) before being transferred in groups of 50 to 70 into four-well dishes containing 250 µL of fertilization medium per well. Motile spermatozoa were obtained by centrifugation of frozen/thawed semen on a discontinuous percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) density gradient (45/90%) and diluted in fertilization medium to obtain a final concentration of 2.10^6 spermatozoa per ml. A 250 µL aliquot of this suspension was added to each well containing COC. Spermatozoa and COC were incubated together for 18 h at 38.8°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 in air. Semen from the same bull was used throughout experiments. Day of fertilization was considered as d 0.

2.1.3. In vitro development (IVD)

After 18 h, presumptive zygotes were completely denuded of cumulus cells by vortexing and washed in culture medium (modified synthetic oviduct fluid, mSOF), supplemented with 5% Fetal Calf Serum (FCS, ref 29167748, MP Biomedicals, Illkirch, France). They were then in vivo or in vitro cultured in different culture environments according to experiments. In vitro cultures were performed in groups of 25 in 25 µL microdrop under paraffin oil at 38.8°C for 7 d in a humidified atmosphere of 5% CO_2, 5% O_2 and 90% N_2. The cleavage rate was assessed at d 2 post fertilization.

2.1.3.1. Experiments 1, 2, 3 and 4

Three polyunsaturated fatty acids have been added to embryo culture medium, the docosahexaenoic acid (DHA cis-4, 7, 10, 13, 16, 19, C22:6) (Matreya, ref 1136), the conjugated linoleic acid trans 10, cis 12 (CLA t10, c12 ; C18:2) (Matreya, ref 1249-1) and the linolenic acid (cis-9, 12, 15 ; C18: 3) (Matreya, ref 1026).

The PUFA concentration was preliminary tested on cleavage and blastocyst rate, and on embryo survival after cryopreservation (experiments 1 and 2). C18: 3 and C22: 6 were tested at 1, 10 and 100µM, whereas C18:2 was tested at 100µM as realized previously. (Pereira et al., 2007). All PUFA were diluted in absolute ethanol. β-ME was added to avoid fatty acids oxidation during culture. In experiment 1, six different culture environments were also tested, 1) mSOF + 5% FCS, 2) mSOF + 5%FCS+ 100µM β-ME, 3-4-5) mSOF + 5%FCS + 100µM β- ME + 1-10-100µM C22:6 and 6) mSOF + 5%FCS+ 100µM β-ME + 100µM C18:2. In experiment 2, five different media were tested, 1) mSOF + 5% FCS, 2) mSOF + 5% FCS + 100µM β-ME and 3-4-5) mSOF + 5% FCS + 100µM β-ME + 1-10-100µM C18:3. In both experiments, d 7 and d 8 embryos were cryopreserved.

Results of experiments 1 and 2 had allowed to choose optimal concentration of C18:3 and C22:6 for gene expression and AMPKα phosphorylation assessment (experiments 3 and

4). Five media were tested, 1) mSOF + 5% FCS, 2) mSOF + 5% FCS+ 100µM β-ME, 3) mSOF + 5% FCS + 100µM β-ME + 100µM C18:2, 4) mSOF + 5% FCS + 100µM β-ME + C22:6 at chosen concentration and 5) mSOF + 5% FCS + 100µM β-ME + C18:3 at chosen concentration too. Expanded and hatched blastocyst were collected at d 7 and d 8 and placed in dry Eppendorf tubes for RNA extraction (group of 5 embryos, experiment 3) and for phosphorylation assessment (groups of 7 to 15 embryos, experiment 4). All embryo samples were stored at -80°C.

2.1.3.2. Experiment 5

Presumptive zygotes were cultured under 4 different environments: 1/mSOF + 5% FCS, 2) mSOF + 10% FCS, 3) co-culture with bovine oviduct epithelial cell monolayers (Boec) and 4) developed in the ewe oviduct. This experiment was devoted to gene expression assessment. Expanded and hatched blastocysts were collected at d 7 and d 8, grouped by 5 and stored at -80°C until RNA extraction.

Boec culture was prepared as described previously (Mermillod et al., 1993). After collection from slaughtered cow oviducts, the Boec were multiplied and cryoconserved. Each IVC experiment was performed with the same Boec batch. After warming, the Boec were seeded in 25 µL microdrops with mSOF + 10% FCS + 8 µL/mL gentamicin + 1.25 µg/mL amphotericin B under paraffin oil at about 10^5 cells/mL and at 38.8°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2, 5% O_2 and 90% N_2. After 5 d of culture, about 80% of confluence of the monolayer was achieved and the presumptive zygotes were introduced (25 embryos per drop) until d 7 post insemination. Half of the culture medium was renewed every 48 h during in vitro development with mSOF + 5% FCS + 4 µL/mL gentamicin.

In vivo development of IVM/IVF presumptive zygotes in the ewe oviduct was performed surgically. Presumptive zygotes were transferred by mid ventral laparotomy to the ligated ewe oviduct (approximately 60 zygotes per oviduct) at 22 h post insemination.

Embryos were recovered from the ewe 6 d later (i.e. d 7 post insemination) by surgery and flushing of the oviduct with 20 ml of PBS and classified.

2.2. Open Pulled Straw (OPS) vitrification, warming and survival assessment

The OPS vitrification method was applied according to the method described by Vajta et al. (Vajta et al., 1998) on blastocysts and expanded blastocysts at d 7 and d 8. All equilibrations were performed at 34–35°C. Briefly, embryos were washed twice in Hepes-buffered TCM199 solution supplemented with 20% new-born calf serum (NBCS) for 5 min. They were then equilibrated in a freezing solution consisting of 7.5% ethylene glycol (EG) and 7.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) dissolved in Hepes-buffered TCM199–NBCS for 3 min. They were then transferred with approximately 1 or 2 mL of solution into a 20 mL droplet of 18% EG, 18% DMSO and 0.4 M sucrose in Hepes-buffered TCM199–NBCS. Embryos were drawn up together in another 1–2 mL drop, loaded by capillarity into the narrow end of OPS and plunged into liquid nitrogen. The time between the contact of the embryos with the concentrated cryoprotectant solution and the liquid nitrogen did not exceed 30 s. For warming, straws were held in air for 5 s before the narrow end was immerged in 500 µL of Hepes-buffered TCM199–NBCS with 0.2 M sucrose. After 1 min, embryos were transferred for 4 min in new Hepes-buffered TCM199–NBCS with 0.2 M sucrose, followed by 4 min within 0.1 M sucrose and by 4 min without sucrose. After cryoprotectant removal, embryos were cultured in 500 µL of mSOF + 15% FCS at 38.8°C for 3 d in a humidified atmosphere of 5% CO_2, 5% O_2 and 90% N_2. After 72 h, embryo survival was evaluated by blastocyst re-expansion and hatching.

2.3. RNA isolation and reverse transcription

Embryos were placed in dry Eppendorf tubes and stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA was extracted from embryos, after adding 1 pg per embryo of

luciferase mRNA (Promega, Charbonnières-les-bains, France) as an exogenous standard, using TriZol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) following the manufacturer's instructions. RNA preparations were incubated with RQ1 DNase (Promega, France) for 10 min at room temperature followed by 37°C for 30 min to avoid contamination with genomic DNA, followed by organic extraction, precipitation, and resuspension in water. Reverse transcription was performed on RNA amounts corresponding to 5 embryos. The cDNA was extended from oligo(dT)15 primers (Promega, France) and random primers (Promega, France), 25 ng per reaction for each primer, during 50 min at at 37°C by mouse Moloney leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, France) in a total volume of 20 µL. Parallel negative control reactions were set up without substrate.

2.4. Real time RT-PCR

Nine target genes were analysed: genes encoding Δ9 desaturase (stearoyl-CoA desaturase, SCD1), Δ6 desaturase (fatty acid desaturase 2, FADS2), ACC (acetyl-CoA-carboxylase), FAS (fatty acid synthase), ACSL1 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 1), DGAT1 (diacylglycerol O-acyltransferase 1), adipophilin (lipoprotein), CPT-II (Carnitin palmitoyltransferase-II) and SREBP1 (sterol regulatory element-binding transcription factor 1). Three control genes were chosen: exogenous luciferase and endogenous 18S and RPL19 (ribosomal protein L19).

The quantification of all gene transcripts was carried out by real-time RT-PCR on MyiQCycler apparatus (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, France) using specific primers (table 1). Reactions were performed in triplicate using a real-time PCR kit provided with SYBR Green fluorophore (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions and using a robotic distributor (Eppendorf). The PCR reaction mixture (20µL) contained 10 µL green supermix 2x buffer, 4.6 µL of ultrafiltered water, 0.20 µM of forward and reverse primers and 5 µL of diluted RT product.

The PCR protocol included an initial step of 95°C (3 min), followed by 40 cycles of 95°C (30 s), 60°C (30 s) and 72°C (20 s), and further by acquisition of the melting curve (fluorescence acquisition every 0.5°C, from 55 to 95°C). The method used for quantification of genes expressions was the relative standard curve method; standard curves were obtained from serial dilutions of a pool of cDNA of bovine uterus luminal cells for all genes, except for luciferase (plasmid including the target sequence). In each sample, the median value of PCR replicates was considered and normalized to the exogenous control luciferase to validate the experiment. Median values of target gene were then normalized to geometric mean value of two endogenous genes, 18S and RPL19, and finally normalized to the same ratio in mSOF + 5% FCS medium. Data are presented as mean ± SEM.

2.5. Western Blot

Western blotting was performed to assess phosphorylation of AMPKα on Thr172 residue. Lysates of embryos were prepared on ice in 10 µL of lysis buffer (10mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, and 0.5% Igepal) containing various protease inhibitors (2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml leupeptin, and 10 µg/ml aprotinin) and phosphatase inhibitors (100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM sodium orthovanadate). Lysates were centrifuged at 13 000 *g* for 20 min at 4°C. Cell extracts were then submitted to electrophoresis on 10% (w/v) SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. The proteins were then electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell, Ecquevilly, France) for 2 h at 80 V. Membranes were incubated for 1 h at room temperature with Tris-buffered saline (TBS) (2 mM Tris-HCl, pH 8.0; 15 mM NaCl, pH 7.6) containing 5% nonfat dry milk powder and 0.1% Tween 20 to saturate nonspecific sites. Then, membranes were incubated overnight at 4 C with appropriate antibodies (final dilution, 1:500 for pAMPKα and 1:1000 for total AMPKα, 1:5000 for vinculin) in TBS containing 0.1% Tween 20 and 5% nonfat dry milk powder. After washing

in TBS-0.1% Tween 20, the membranes were incubated for 2 h at room temperature with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit (AMPK) or anti-mouse (vinculin) IgG (final dilution, 1:5000; Diagnostic Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) in TBS-0.1% Tween 20. After washing in TBS-0.1% Tween 20, the signal was detected by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). Bands densities were estimated by using the software Scion Image (4.0.2 version). The results are expressed as the intensity signal in arbitrary units after normalization allowed by the presence of vinculin or AMPKα total (for AMPKα phosphorylation), as an internal standard.

2.6. Statistical analysis

Comparisons among dose effect (1, 10, 100) on post-warming embryo survival were performed using the Chi-square test. Data on mRNA expression assayed by quantitative RT-PCR were compared according to embryo culture environment with a non parametric test (SYSTAT10, Kruskal-Wallis). This test was also used for AMPKα phosphorylation and protein levels. All differences were considered significant at $P<0.05$.

3. Results

3.1. In vitro embryo survival after 22:6, 18:3 and 18:2 supplementation, vitrification and warming

Four and five trials were performed for experiments 1 and 2, respectively. Results of cleavage, embryo yield and embryo survival rate are shown in tables 2 and 3. Altogether 4351 COC were in vitro matured / fertilized and 711 embryos d 7-8 were vitrified and assessed after in vitro survival. No significant difference was observed on the cleavage and d 7-8 blastocyst rates for all the tested concentrations of C22:6 (table 2) and C18:3 (table 3). A tendency to have more embryos at d 8 was just observed with decreasing C18:3 supplement ($P=0.1$). Compared to fatty acid supplementation control group, i.e. 100µM β-ME

supplementation group, 1µM C18:3 supplement has significantly increased cleavage rate, and 10µM C22:6 and 100µM C18:2 supplements have significantly reduced the d 7 blastocyst rate (table 2, $P<0.05$).

A significant lower d 7 embryo survival was found with C22:6 and C18:2 groups at 100µM compared to 1µM C22:6 and 100µM β-ME supplementation groups (table 2, $P<0.05$). No significant effect of C18:3 supplementation was found on d 7 embryo survival (table 3). Day 8 embryo survival was significantly increased with 100µM C18:3 compared to 100µM β-ME supplementation group ($P<5\%$). No difference was found with the other culture group.

Results of experiments 1 and 2 summarized (not shown in table) indicate that 100µM β-ME supplementation has significantly reduced cleavage and d 7 and 8 blastocyst rates ($P<0.03$), but increased the d 7 embryo survival compared to 5% FCS supplementation ($P<0.03$).

According to results, 10µM dose was chosen for C22:6 and C18:3 for gene expression analysis, higher PUFA level than 100µM dose inducing cell apotose and cell growth decrease (Barascu et al., 2006). For C18:2, dose tested by Pereira et al. (Pereira et al., 2007) was even so kept.

3.2. Gene expression

Three trials were performed for each experiment. Six samples of 5 embryos (experiments 3 and 5) were collected, except for coculture (seven samples) and the ewe oviduct development (nine samples) in experiment 5. cDNAs were diluted to performed Q-PCR amplification on 1.25 10^{-5} and 62.5 10^{-5} equivalent embryos per µL for 18S, and on 1.25 10^{-3} and 6.25 10^{-3} for the other genes in experiments 3 and 5, respectively. Ratio to mSOF + 5% FCS medium after normalisation to 18S and RPL19 were shown in figures 1 and 2. SCD1 and FADS2 transcript abundance was significantly lower in 10µM C22:6 and in 100µM C18:2 supplementation groups, respectively, compared to all the other groups (figure 1). Moreover,

a significant lower SCD1 transcript level was found in Boec and ewe oviduct groups compared to 5% and 10% FCS supplementation groups (figure 2). A significant lower SREBP1 transcript level was found in 100µM C18:2, 10µM C22:6 and 10µM C18:3 supplementation groups compared to all the groups without fatty acid supplementation, as for ACC mRNA after 10µM C22:6 supplementation compared to mSOF group (figure 1). In addition, a significant lower FAS transcript level was found in Boec culture group compared to 5%, 10% FCS supplementation and ewe oviduct group (figure 2) ($P<0.05$). No significant difference was observed for the other genes.

3.3. Measurement of AMPKα phosphorylation and protein levels

Four trials were performed for experiment 4. Six samples of 7, 7, 8, 10, 10 and 15 embryos were collected in each culture. Results are shown in figure 3. AMPK phosphorylation was assessed by evaluating the phosphorylated AMPKα / total AMPKα ratio. No significant difference of ratio pAMPKα / total AMPKα was observed between each culture medium ($P>0.05$). No significant difference was also observed on total AMPKα level after vinculin normalisation (data not shown). AMPKα phosphorylation and total AMPKα levels assessed in d 7 and d 8 expanded / hatched blastocysts were not affected after 6 d of fatty acid supplementation.

4. Discussion

4.1. Embryo development and survival after fatty acid supplementation

In this present study, embryo development and embryo survival after cryopreservation were first evaluated in response to fatty acid supplementation at several doses. Results show that blastocyst yield and embryo survival after cryopreservation were not affected by fatty acid supplementation during embryo culture, except a decrease on d 7 with 10µM C22:6 and 100µM C18:2, and with C22:6 and C18:2 at 100µM dose on blastocyst development rate and

on embryo survival rate, respectively. These results were not in agreement to those found on morula (Hochi et al., 1999) and on blastocyst (Pereira et al., 2007) with linoleic acid-albumin and conjugated linoleic acid supplementation, respectively. Embryos survival rate was widely improved after 100µM 12t, 10c C18:2, same CLA isomer as in the present study, 35% vs 64% (Pereira et al., 2007). Main difference between these studies was the cryopreservation technique applied. Fatty embryos are more sensible to chilling and freezing than fatty-free embryos, and slow freezing do not avoid cold shock and ice crystal formation, contrary to vitrification (for a review, see (Massip, 2001)). Physical changes of lipids submitted to freezing temperatures are among the major causes of cellular cryodamages Very high embryo survival rate obtained in our study, also with embryo developed with serum alone, compared to study of Pereira (70% vs 35-49% respectively) is evidence. To estimate survival rate, embryo transfer in recipient remains the conclusive test. Moreover, 100µM β-ME supplementation had widely improved the embryo survival rate after cryopreservation. Beneficial effects of β-ME addition to in vitro culture medium have been already reported on subsequent embryo development to the blastocyst stage and on frozen-thawed blastocysts development through protective effects against oxidative stress (Feugang et al., 2004; Hashem et al., 2006). This low weight thiol compound with a reducing power, at used concentration between 10 to 500 µM in the literature, interacts directly with some oxidized radicals and can chelate metallic ions. This antioxidant supplementation could have minimized or hided the fatty acid effect on embryo survival rate, as vitrification. Several previous investigations showed an effect of PUFA in vitro, on post-thawing embryo survival after arachidonic acid (C20:4n-6) and eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n-3) supplementation in oocyte maturation medium (Marques et al., 2007), or in diet included EPA and DHA supplements, on oocyte membrane integrity following chilling (Zeron et al., 2002). All these positive effects of PUFA were not found in our experimental conditions.

4.2. Gene expression after fatty acid supplementation

Fatty acid supplementation in embryo culture medium has down-regulated gene expression in d 7-8 embryos, i.e. ACC and SCD1 after 10µM DHA supplementation, FADS2 after 100µM C18:2 supplementation and SREBP1 after the three tested PUFA supplementations. The (n-3) and (n-6) PUFA have a role in the control of adipogenesis as well as physiologic events that reduce gene expression of many enzymes involves in lipid metabolism. They repress stearoyl-Coa desaturases, key enzymes involved in synthesis of monounsaturated fatty acid as regulation of this process in liver and adipocytes reducing SCD mRNA stability and enzyme activity (Bretillon et al., 1999; Choi et al., 2000). C22:6, C20:4, C18:2 t10, c12 and C18:3 specially repressed SCD1 mRNA expression, but not oleic acid (18:1, n-9). In bovine embryo, only DHA has repressed SCD1 transcript compared to C18:3 and C18:2, as though fatty acid with short chain were not efficient. In contrast, only short chain of fatty acid has down-regulated FADS2 desaturase transcript, and exclusively at high concentration (100µM), as if a dose effect was limitant. Decrease of SCD1 transcript was also obtained in Boec or ewe oviduct environment (figure 2). It could be supposed that mechanism of expression regulation could be similar to DHA supplementation. The oviduct epithelial cells synthesizes a variety of lipids, cholesterol, triglycerides or phospholipids (Henault and Killian, 1993b) suggesting that the oviductal epithelium may be very active in lipid metabolism. By regulation of membrane fluidity, high concentration of phospholipids present in Boec lipid droplets, i.e. sphingomyelin and phosphatidylcholines (Henault and Killian, 1993b) may play a similar role as DHA supplementation found in our study. The modification observed in SCD mRNA expression should have an effect on saturated and unsatured fatty acid levels, and contributes to change membrane fluidity and cryoresistance. It could consequently explain the increase in post-thawing survival rate of embryo produced in ewe or with Boec (Rizos et al., 2001; Rodriguez-Dorta et al., 2007) compared to media supplemented

with serum inducing excessive accumulation of a few familiar saturated fatty acids, i.e. palmitic and stearic acids until the blastocyst stage (Reis et al., 2003).

The repressing lipogenic gene expression is induced by PUFA through different transcription mediators, i.e. SREBP (for a review, see (Sampath and Ntambi, 2005)). SREBP is a transactivator and act on genes containing sterol response elements (SREs). In bovine embryo, SREBP1 mRNA was already present at d 7-8 and the expression was down-regulated by PUFA, DHA, C18:3 and also C18:2, the shortest and more saturated fatty acid added in embryo culture medium, as reported in literature for several tissues and adult cells. SREBP mRNA inhibition is dependent on chain length and degree of desaturation. C20:4 (n-6) and C18:2 t10, c12 suppress SREBP1 maturation in a dose dependent post-translational manner in adipocyte and liver but not 18:1 (n-9) (Xu et al., 1999), inducing down-regulated synthesis of fatty acid as ACC, FAS, LPL (Dentin et al., 2005; Bionaz and Loor, 2008). Down-regulation of FAS mRNA by PUFA supplementation was not observed in embryo, whereas ACC mRNA was down-regulated by DHA supplementation. This mechanism of regulation should probably take time and only the first enzyme required for fatty acid synthesis is regulated in d 7-8 bovine embryo. Supplementation level could also be not enough high compared to PUFA presents in Boec, as FAS mRNA was down regulated in Boec compared to control medium with SOF.

Adipophilin, ACSL1, DGAT and CPT-II mRNAs expression was not modified with PUFA supplementation, as if fatty acid storage and mitochondrial fatty acid oxidation were not altered in bovine embryo. DGAT mRNA was already found unchanged after n-3 or n-6 PUFA diet (Ikeda et al., 1998; Botham et al., 2003), but our results did not agree with reduction of cytoplasmic lipids droplets number observed after C18:2 t10, c12 supplementation (Pereira et al., 2007). Several other in vitro studies have shown that treatment with CLA isomers reduce triglyceride content in adipocytes (Park et al., 1999). In diet, conjugated DHA and CLA decrease also triglycerol and cholesterol in liver (Tsuzuki et

al., 2006). PUFAs are known to be involved in fatty acid synthesis suppression through inhibition of SREBP in the liver (Kim et al., 1999), as well as lipoprotein lipase activity (Park et al., 1999). CPTs activity, i.e. CPT-I particularly involved in mitochondrial energy homeostasis, was also known to be upregulated in liver and adipose tissue by PUFA diet (Ikeda et al., 1998; Morash et al., 2009). In contrast, DHA down-regulates CPT-II expression in brain tissue (Kothapalli et al., 2007). Other genes encoding CPT-I or enzymes involved in lipids transport (FATP, FAT), or transcription factors of the nuclear family (PPAR, RXR) may be analysed to eventually see potential modification induced by PUFA supplementation on embryonic fatty acid storage and oxidation.

4.3. AMPKα phosphorylation after fatty acid supplementation

In the present study, AMPKα phosphorylation and total AMPKα level were not affected by fatty acid supplementation. Fatty acids have various actions within cells such as activating cellular signalling pathways and regulating gene expression. However, the mechanisms by which fatty acids transduce their signal within cells remain elusive. AMPK has been suggested to play a role mediating the actions of fatty acids in cells. Indeed, the activation of AMPK is associated to the inhibitions of ACC, FAS and Spot14 expression in rat liver by polyunsaturated fatty acids (Suchankova et al., 2005). Long chain n-3 PUFA diet, i.e. EPA, C20:5 and DHA, C22:6, upregulate AMPK activity in rats (Suchankova et al., 2005). Furthermore, DHA increases via the acute activation of AMPK glucose uptake in pig (Gabler et al., 2009). Several studies show that AMPK is involved in the regulation of the transcription factor SREBP1 (Awazawa et al., 2009; Yang et al., 2009). In our study, we have shown that DHA supplementation decreases SREBP1 expression in d 7 and d 8 embryos, it could be thus supposed that AMPKα might mediate this embryonic down-regulation. We observed no effect of DHA on AMPKα phosphorylation and protein levels in these embryos at this stage. However, we can not conclude that AMPKα is not involved in the DHA effect

on SREBP1 since the timing to detect variation of AMPKα phosphorylation was maybe too late. It would be interesting to investigate AMPKα phosphorylation at early stages and used specific inhibitors of AMPKα to determine the role of this kinase in the fatty acid-induced gene expression in embryos.

5. Conclusion

This study showed that C18:2, C18:3, C22:6 supplementation in bovine culture media as Boec and in ewe oviduct cultures during 6 d down-regulates mRNA expression of proteins related to lipid metabolism in d 7 – 8 embryo, i.e. SCD1 and FADS2, probably through SREBP1 mRNA regulation, indicating a modification of saturated / unsaturated fatty acid balance in bovine blastocyst. This modification should contribute to interfere on membrane fluidity. No effect was detected at d 7-8 on AMPKα phosphorylation and on in vitro survival of vitrified embryo. Further experiments are needed to assess AMPKα phosphorylation at earlier stage of bovine embryo development and to study the impact of fatty supplementation on in vivo embryo survival after freezing.

Acknowledgements

This study was funded by the French National Institute for Agricultural Research (Nouzilly, France) and supported by the Syrian University of Aleppo through fellowships of A. Al darwich. Appreciation is expressed to J.L. Touzé, G. Gomot, J. Cognié, L. Ouvrard and their team for embryo production in ewe oviduct and their care to animals, A. Thelie for skilful help in PCR technique and E. Baeza, E. Blesbois, I. Donnay, C. Leroux, V. Maillard and N. Rideau for advices in lipid metabolism.

References

[1] Abe H, Otoi T, Tachikawa S, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. Anat Embryol (Berl). 1999;199(6):519-527.

[2] Charpigny G, Guesnet P, Marquant-LeGuiene B, Heyman Y, Mermillod P, Humblot P. Fatty acid composition of triglycerides, phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines of bovine embryos. BRG. 2003;4:159–172.

[3] Ferguson EM, Leese HJ. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. J Reprod Fertil. 1999;116(2):373-378.

[4] Leroy JL, Genicot G, Donnay I, Van Soom A. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with nile red: a practical approach. Reprod Domest Anim. 2005;40(1):76-78.

[5] Reis A, Rooke JA, McCallum GJ, Staines ME, Ewen M, Lomax MA, McEvoy TG. Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro. Reprod Fertil Dev. 2003;15(5):275-284.

[6] Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. Mol Reprod Dev. 2002;61(1):57-66.

[7] Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, Horta AE, Portugal PV, Bessa RJ, Silva JC, Pereira MS, Marques CC. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). Anim Reprod Sci. 2007;98(3-4):293-301.

[8] Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. Annu Rev Nutr. 2005;25:317-340.

[9] Donnay I, Faerge I, Grondahl C, Verhaeghe B, Sayoud H, Ponderato N, Galli C, Lazzari G. Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. Theriogenology. 2004;62(6):1093-1107.

[10] Mermillod P, Vansteenbrugge A, Wils C, Mourmeaux JL, Massip A, Dessy F. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. Biol Reprod. 1993;49(3):582-587.

[11] Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol Reprod Dev. 1998;51(1):53-58.

[12] Barascu A, Besson P, Le Floch O, Bougnoux P, Jourdan ML. CDK1-cyclin B1 mediates the inhibition of proliferation induced by omega-3 fatty acids in MDA-MB-231 breast cancer cells. Int J Biochem Cell Biol. 2006;38(2):196-208.

[13] Hochi S, Kimura K, Hanada A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. Theriogenology. 1999;52(3):497-504.

[14] Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals. Reprod Domest Anim. 2001;36(2):49-55.

[15] Feugang JM, de Roover R, Moens A, Leonard S, Dessy F, Donnay I. Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. Theriogenology. 2004;61(1):71-90.

[16] Hashem A, Hossein MS, Woo JY, Kim S, Kim JH, Lee SH, Koo OJ, Park SM, Lee EG, Kang SK, Lee BC. Effect of potassium simplex optimization medium and NCSU23 supplemented with beta-mercaptoethanol and amino acids of in vitro fertilized porcine embryos. J Reprod Dev. 2006;52(5):591-599.

[17] Marques C, Baptista M, Vasques M, Horta A, Pereira R. Effect of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on bovine oocyte in vitro maturation and subsequent embryo development and freezability. Reprod Dom Anim. 2007;42:108–109.

[18] Zeron Y, Sklan D, Arav A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. Mol Reprod Dev. 2002;61(2):271-278.

[19] Bretillon L, Chardigny JM, Gregoire S, Berdeaux O, Sebedio JL. Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro. Lipids. 1999;34(9):965-969.

[20] Choi Y, Kim YC, Han YB, Park Y, Pariza MW, Ntambi JM. The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. J Nutr. 2000;130(8):1920-1924.

[21] Henault MA, Killian GJ. Synthesis and secretion of lipids by bovine oviduct mucosal explants. J Reprod Fertil. 1993;98(2):431-438.

[22] Rizos D, Ward F, Boland MP, Lonergan P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. Theriogenology. 2001;56(1):1-16.

[23] Rodriguez-Dorta N, Cognie Y, Gonzalez F, Poulin N, Guignot F, Touze JL, Baril G, Cabrera F, Alamo D, Batista M, Gracia A, Mermillod P. Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified in vitro produced goat embryos. Theriogenology. 2007;68(6):908-913.

[24] Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. J Biol Chem. 1999;274(33):23577-23583.

[25] Bionaz M, Loor JJ. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. BMC Genomics. 2008;9:366.

[26] Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. Biochimie. 2005;87(1):81-86.

[27] Botham KM, Zheng X, Napolitano M, Avella M, Cavallari C, Rivabene R, Bravo E. The effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids delivered in chylomicron remnants on the transcription of genes regulating synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein by the liver: modulation by cellular oxidative state. Exp Biol Med (Maywood). 2003;228(2):143-151.

[28] Ikeda I, Cha JY, Yanagita T, Nakatani N, Oogami K, Imaizumi K, Yazawa K. Effects of dietary alpha-linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in rats. Biosci Biotechnol Biochem. 1998;62(4):675-680.

[29] Park Y, Storkson JM, Albright KJ, Liu W, Pariza MW. Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. Lipids. 1999;34(3):235-241.

[30] Tsuzuki T, Kawakami Y, Nakagawa K, Miyazawa T. Conjugated docosahexaenoic acid inhibits lipid accumulation in rats. J Nutr Biochem. 2006;17(8):518-524.

[31] Kim HJ, Takahashi M, Ezaki O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. J Biol Chem. 1999;274(36):25892-25898.

[32] Morash AJ, Bureau DP, McClelland GB. Effects of dietary fatty acid composition on the regulation of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2009;152(1):85-93.

[33] Kothapalli KS, Anthony JC, Pan BS, Hsieh AT, Nathanielsz PW, Brenna JT. Differential cerebral cortex transcriptomes of baboon neonates consuming moderate and high docosahexaenoic acid formulas. PLoS One. 2007;2(4):e370.

[34] Suchankova G, Tekle M, Saha AK, Ruderman NB, Clarke SD, Gettys TW. Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. Biochem Biophys Res Commun. 2005;326(4):851-858.

[35] Gabler NK, Radcliffe JS, Spencer JD, Webel DM, Spurlock ME. Feeding long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids during gestation increases intestinal glucose absorption potentially via the acute activation of AMPK. J Nutr Biochem. 2009;20(1):17-25.

[36] Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kaneko K, Okazaki Y, Bardeesy N, Ohnishi S, Nagai R, Kadowaki T. Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2009;382(1):51-56.

[37] Yang J, Craddock L, Hong S, Liu ZM. AMP-activated protein kinase suppresses LXR-dependent sterol regulatory element-binding protein-1c transcription in rat hepatoma McA-RH7777 cells. J Cell Biochem. 2009;106(3):414-426.

Illustrations Captions

Table 1. Primers sequences

Table 2. Effect of 1-10-100µM C22:6 and 100µM C18:2 supplementation during in vitro embryo development on d 7–8 embryo yield and on embryo in vitro survival rate at 72h after vitrification / warming.

Within a column, means without a common superscript differ ($P < 0.05$, Chi2 test).

Table 3. Effect of 1-10-100µM C18:3 supplementation during in vitro embryo development on d 7–8 embryo yield and on embryo in vitro survival rate at 72h after vitrification / warming.

Within a column, means without a common superscript differ ($P < 0.05$, Chi2 test).

Figure 1. Effect of fatty acids supplementation on gene expression

[a, b] Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$: Kruskal-Wallis test) between media.

Target gene values were normalized to geometric mean value of 18S and RPL19, and then to the same ratio in mSOF + 5% FCS medium (mean ± SEM).

SCD1, FADS2, SREBP1 and ACC mRNA level decrease significantly after PUFA supplementation ($P< 0.05$).

□ : mSOF + 5% FCS ; ▩ : mSOF + 5%FCS + 100µM β-ME ; ▨ : mSOF + 5% FCS + 100µM β-ME + 100µM C18:2 ; ▩ : mSOF + 5% FCS + 100µM β-ME + 10µM C22:6 ; ▨ : mSOF + 5% FCS + 100µM β-ME + 10µM C18 :3.

Figure 2. Variation of SCD1 and FAS mRNA in bovine embryos according to different media.

[a, b] Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$: Kruskal-Wallis test) between media. Target gene values were normalized to geometric mean value of 18S and RPL19, and then to the same ratio in mSOF + 5% FCS medium (mean ± SEM).

SCD1 and FAS mRNA level decrease significantly in Boec group, and SCD1 mRNA level in ewe oviduct group ($P< 0.05$).

▨ : mSOF + 5% FCS ; ▨ : m SOF + 10% FCS ; ▨ : Boec culture ; ▨ : Ewe oviduct.

Figure 3. Effect of fatty acids supplementation on AMPKα phosphorylation in d 7 - 8 bovine embryo.

Results are expressed as the means ± SEM of the pAMPKα/totalAMPKα ratio.

[a, b] Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$: Kruskal-Wallis test).

No significant difference of ratio pAMPKα / total AMPKα was observed between each culture medium ($P>0.05$).

Table 1. Primers sequences

gene	primer	sequence (5' --> 3')	Genbank accession
18S	S3	CGGACCAGAGCGAAAGCATTTG	DQ222453
	As4	GAA TAACGCCGCCGCATCG	
RPL19	S	AATCGCCAATGCCAACTC	AY158223
	As	CCCTTTCGCTTACCTATACC	
luciferase	S2	TCATTCTTCGCCAAAAGCACTCTG	X84848
	As2	AGCCCATATCCTTGTCGTATCCC	
ACC	S1	TGCTTCCCATTTGCCATC	AJ132890
	As1	CTGCCATCCTCACGACCT	
FAS	S2	CACTCCATCCTCGCTCTCC	AY343889
	As2	GCCTGTCATCATCTGTCACC	
SCD1	S3	CTGGCTGGTGAATAGTGCTG	NM_173959
	As3	AAGGTGTGGTGGTAGTTGTGG	
Adipophilin	S	ACAACACACCCCTCAACTGG	AJ011680
	As	CTGCCTGCCTACTTCAGACC	
CPT-II	S	TGTGCCTTCCTTCCTGTCTTGG	NM_001045889
	As	CGATGGGGTCTGGGTAAACGA	
DGAT1	S2	TCCACTCCTGCCTGAACGC	NM_174693
	As2	GCTGCCCACTTGCTGCTG	
FADS2	S1	CTGAGGAAGACCGCTGAGGAC	NM_001083444
	A1	GATGACGAACTTGTGGACGATGTG	
ACSL1	S1	TGACTGTTGCTGGAGACTGG	NM_001076085
	A1	TGTGCTTCTTCCTGTCGATG	
SREBP1	S1	CCGTTTCTTCGTGGATGG	NM_001113302
	A1	ATGCTGGAGCTGATGGAG	

Table 2.

Culture medium	COCs	Cleavage %	Blastocyst yield		Vitrified / warmed embryo		In vitro survival rate after 72 h	
	(n)	(n)	d 7 % (n)	d 8 % (n)	d 7 (n)	d 8 (n)	d 7 % (n)	d 8 % (n)
mSOF + 5% FCS	265	67.5 (179) [ab]	26.4 (70) [a]	29.8 (79) [a]	42	23	83.3 (35) [ab]	60.9 (14) [a]
mSOF + 5% FCS + β-ME	256	64.4 (165) [ab]	24.7 (63) [ab]	26.6 (68) [a]	34	32	97.1 (33) [a]	71.9 (23) [ab]
mSOF + 5% FCS + β-ME + 1µM C22:6	312	68.6 (214) [ab]	18.3 (57) [bc]	25 (78) [a]	27	32	96.3 (26) [a]	87.5 (27) [b]
mSOF + 5% FCS + β-ME + 10µM C22:6	288	62.5 (180) [a]	15.6 (45) [c]	26.6 (75) [a]	27	27	88.8 (24) [ab]	77.7 (21) [ab]
mSOF + 5% FCS + β-ME + 100µM C22:6	309	65.4 (202) [ab]	20.4 (63) [abc]	27.8 (86) [a]	38	26	78.9 (30) [b]	61.5 (16) [ac]
mSOF + 5% FCS + β-ME + 100µM C18:2	317	70 (222) [b]	16 (51) [c]	27.1 (86) [a]	33	35	78.8 (26) [b]	71.4 (25) [ab]

Table 3.

Culture medium	COC (n)	Cleavage % (n)	Blastocyst yield		Vitrified / warmed embryo		In vitro survival rate after 72 h	
			d 7 % (n)	d 8 % (n)	d 7 (n)	d 8 (n)	d 7 % (n)	d 8 % (n)
mSOF + 5% FCS	520	61.3 (319) [ab]	19.8 (103) [a]	23.8 (124) [a]	64	16	67.2 (43) [a]	56.2 (9) [ab]
mSOF + 5% FCS + β-ME	583	55.6 (324) [a]	11 (64) [b]	15.6 (91) [b]	30	16	76.6 (23) [a]	43.7 (7) [a]
mSOF + 5% FCS + β-ME + 1µM C18:3	489	63 (308) [b]	15.5 (76) [ac]	20 (98) [ab]	47	34	80.8 (38) [a]	61.8 (21) [ab]
mSOF + 5% FCS + β-ME + 10µM C18:3	525	58.7 (308) [ab]	12.4 (65) [bc]	17.1 (90) [b]	37	36	83.8 (31) [a]	63.9 (23) [ab]
mSOF + 5% FCS + β-ME + 100µM C18:3	487	60.4 (294) [ab]	11.9 (58) [bc]	16.6 (81) [b]	33	22	75.7 (25) [a]	77.3 (17) [b]

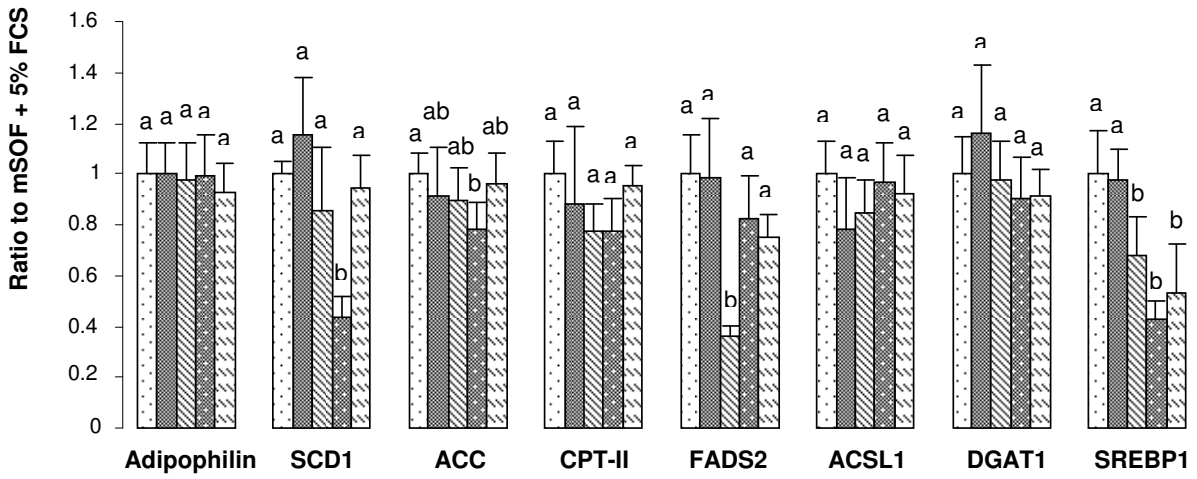

Ratio to mSOF + 5% FCS
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Adipophilin
SCD1
ACC
CPT-II
FADS2
ACSL1
DGAT1
SREBP1

Figure 1.

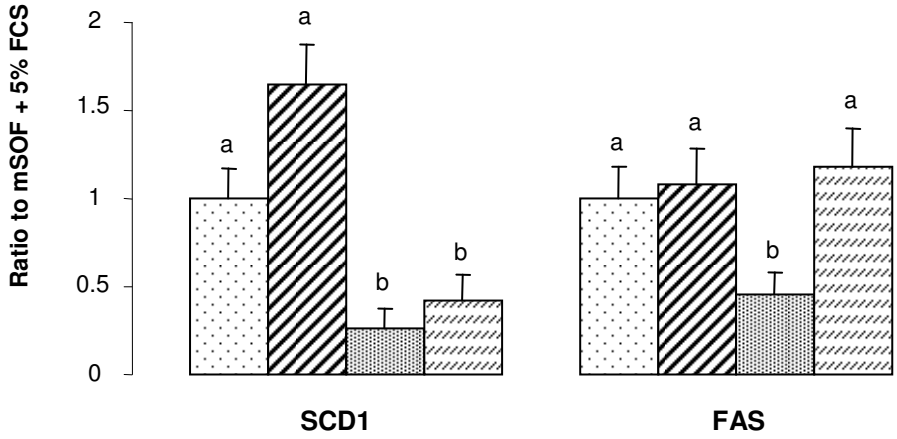


Figure2.

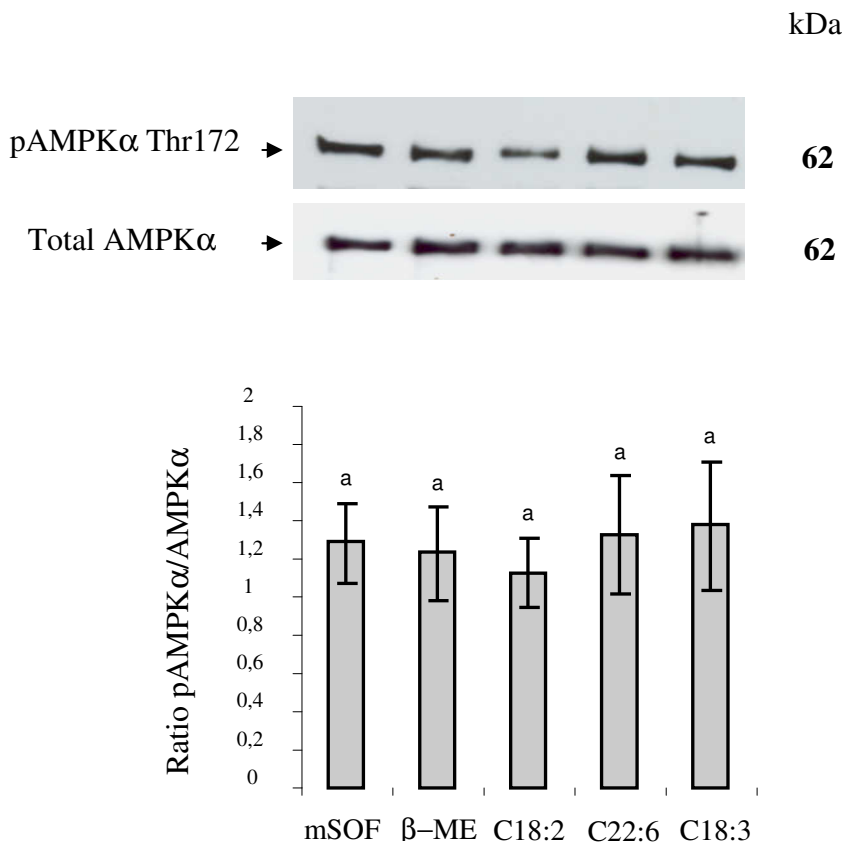

kDa
pAMPKα Thr172
62
Total AMPKα
62
Ratio pAMPKα/AMPKα
2
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
a
a
a
a
a
mSOF
β–ME
C18:2
C22:6
C18:3

Figure 3.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Effet du milieu coculture sur cellules congelées d'oviducte bovin (BOEC) sur la survie *in vivo* d'embryons bovins vitrifiés

Introduction

Suite aux résultats obtenus sur l'expression de gènes en rapport avec le stockage des lipides (publication 1 : transcrit du gène codant l'adipophiline) et en rapport avec la fluidité membranaire (publication 2 : transcrit du gène codant SCD1), en fonction de différents milieux de développement appliqués, nous avons voulu tester un de ces milieux de développement sur la viabilité *in vivo* des embryons après gel / dégel. Parmi les milieux de développement *in vitro* testés, le milieu coculture sur cellules congelées d'oviducte bovin (Boec) a été choisi. Comparé au milieu mSOF enrichi avec 10 % de SVF, il induit à la fois une baisse des transcrits du gène codant pour l'adipophiline et de ceux du gène codant pour SCD1. De plus, précédemment, ce même pool de cellules a permis d'améliorer les taux de mise bas et la survie embryonnaire *in vivo* d'embryons caprins vitrifiés (Guignot et al., 2006b). Aucune analyse transcriptionnelle sur les embryons caprins n'avait été faite en parallèle.

L'effet positif de la coculture sur la survie embryonnaire après gel dégel a déjà été rapportée, et ce pour de nombreuses supports cellulaires (Rizos et al., 2001 ; Gomez et al., 2008), mais ce sont généralement des travaux qui évaluent la survie embryonnaire *in vitro* pour des raisons de coût expérimentaux, ce qui ne donne qu'un aperçu de ce que pourrait être une survie *in vivo*. Nous avons eu l'opportunité de pouvoir réaliser cette expérience de survie *in vivo*.

L'objectif de cette partie de ma thèse a donc été de tester l'effet de la coculture sur la survie *in vivo* d'embryons bovins, après gel, dégel et transfert dans des receveuses, par comparaison à des embryons produits *in vivo* et des embryons produits *in vitro* dans le milieu mSOF enrichi de 5 % de SVF. Pour réaliser ces expériences, deux techniques de cryoconservation ont été appliquées : la vitrification classique et la vitrification rapide (OPS, open pulled straw).

Matériels et Méthodes

1. Production des embryons *in vivo*

Les embryons *in vivo* ont été produits à partir de génisses superovulées. Les détails expérimentaux se trouvent dans l'article 1. Les embryons ont été collectés à J7,5 post insémination. Morulae et blastocystes ont été retenus pour la vitrification.

2. Production des embryons *in vitro*

Les embryons *in vitro* ont été produits à partir de complexes ovocytes-cumulus (COCs) ponctionnés sur des ovaires prélevés à l'abattoir. Les embryons ont été cultivés soit dans le milieu témoin mSOF + 5 % SVF, soit sur un tapis de cellules d'oviducte bovin (coculture). Les détails de la production des embryons *in vitro* se trouvent dans l'article 1. Seuls les blastocystes, blastocystes expansés et blastocystes éclos ont été sélectionnés à J7 post FIV (fécondation *in vitro*) et vitrifiés.

3. Vitrification

Les embryons ont été cryoconservés soit par vitrification classique (expérience de transfert 1), soit par vitrification rapide (expérience de transfert 2).

a. Expérience 1 : vitrification classique

La technique utilisée est celle décrite par Mermillod et al. (1997) et modifiée par Guignot et al. (2006a). Les embryons sont conservés à température ambiante pendant 5 min dans du PBS complété avec 20% de sérum de veau nouveau-né (NBCS). Ils sont vitrifiés en trois étapes à température ambiante comme suit : 1/ 10 % de glycérol (G) pendant 5 min, 2/ 10 % G et 20 % d'ethylène glycol (EG) 5 min, et 3/ 25 % G, 25 % EG et 0,4 M sucrose 30 s dans du PBS - NBCS. Au cours de la dernière étape, les embryons sont rapidement aspirés dans le centre d'une paillette en plastique de 0,25 mL (IVM, L'Aigle, France) avec 20 à 30 µL de la solution de vitrification. Les embryons sont séparés de deux segments de PBS - NBCS enrichis de galactose 0,8 M (environ 90 ml chacun) par deux bulles d'air. Les paillettes sont scellées et immédiatement plongées dans l'azote liquide.

Lors du réchauffement, les paillettes sont tenues 5 s dans l'air, puis plongées 15 s dans un bain-marie à 22°C. Une extrémité des paillettes est ensuite coupée et ces dernières sont placées dans un pistolet de transfert d'embryons (IMV, L'Aigle, France).

b. Expérience 2 : vitrification rapide (OPS)

La technique appliquée est celle décrite par Vajta et al. (1998). Les détails expérimentaux sont repris dans l'article 2.

5. Transfert d'embryons

Les transferts ont été réalisés sur des génisses Charolaises âgées de 5 à 6 ans, synchronisées par la pose d'un implant Crestar® (Intervet, Angers, France) et d'une surcharge de 2 mL de PGf2α. Sept jours après la détection de l'œstrus, les embryons ont été transférés par les voies naturelles (un embryon par receveuse) dans la corne utérine de l'animal à l'aide d'un pistolet de transfert. La gestation a été diagnostiquée par échographie, 21 et 46 jours après la détection d'oestrus.

6. Analyse statistique

Les comparaisons entre milieux de développement après gel, dégel d'embryons ont été effectuées à l'aide du test chi carré. La différence entre les lots testés est donnée significative pour une probabilité P inférieure à 5 %.

Résultats et discussion

Un total de 83 embryons a été décongelé et transféré sur les deux expériences. Les résultats de transfert sont repris dans le tableau 1.

Pour la première expérience, sur 54 génisses transférées, 2/18 étaient gestantes à 21 jours dans le lot coculture, 1/15 dans le lot *vivo* et 0/21 dans le lot mSOF + 5 % SVF ce qui correspond à des taux de gestation de 11 %, 6 % et 0 % respectivement. A 46 jours, une seule receveuse dans le lot *in vivo* était encore gestante (6 %). Les transferts ont été réalisés au mois de juin. Or, il a fait très chaud à cette époque : la vague de chaleur pourrait expliquer le mauvais résultat obtenu, surtout pour le lot d'embryons *in vivo*, lot témoin positif. Une deuxième expérience de transfert a alors été réalisée, cette fois en février, avec les mêmes receveuses.

Pour la deuxième expérience, sur 29 génisses transférées, 2/10 étaient gestantes à 21 jours dans le lot coculture, 1/9 dans le lot vivo et 2/10 dans le lot mSOF + 5 % SVF avec un taux de gestation de 20 %, 11 % et 20 % respectivement. Une seule receveuse dans le lot coculture (10 %) était encore gestante à 46 jours. De nouveau, avec cette deuxième production

d'embryons, vivo comme vitro, les taux de gestation ont été très mauvais, même avec le lot d'embryons *in vivo*.

Aucune différence significative n'a pu bien sûr être observée entre les trois milieux de développement embryonnaire étudiés et pour les deux expériences. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces mauvais résultats. Outre le problème des grosses chaleurs rencontré peu de temps après le première transfert, les lots de génisses receveuses ou la méthodologie de transfert pourraient être également en cause. Les techniques de vitrification mises en place ne peuvent, quant à elles, pas être réellement suspectées : ces deux techniques ont été validées dans notre laboratoire depuis longtemps sur l'espèce bovine, et sur d'autres espèces également. Par contre, la dégradation d'un des cryoprotecteurs utilisés pourrait être mis en cause, comme le laisse à penser une observation faite dans notre laboratoire sur une autre espèce, peu de temps après la réalisation de nos transferts, mais sans pour autant que la preuve en soit formellement établie.

En conclusion, nous pouvons dire que pour des raisons inconnues, par deux fois, les transferts ont donné de mauvais résultats, même avec les embryons produits *in vivo*. Nous n'avons donc pas pu conclure concernant l'effet de la coculture sur la survie embryonnaire *in vivo* d'embryons bovins vitrifiés.

Table 1 : Taux de gestation obtenus après transfert d'embryons bovins vitrifiés

Technique de cryoconservation	Milieu de culture	Receveuses (n)	Femelles gestantes n (%) 21 jours	46 jours
Vitrification classique (experience 1)	mSOF + 5 % SVF	21	0	0
	coculture (Boec)	18	2 (11,11)	0
	in vivo	15	1 (6,6)	1 (6,6)
OPS (experience 2)	mSOF + 5% SVF	10	2 (20)	0
	coculture (Boec)	10	2 (20)	1 (10)
	in vivo	9	1 (11, 11)	0

Article 3

Effect of culture environment on gene expression profiling of bovine preimplantation embryo

Abdulrahman AL DARWICH, Christine PERREAU, Pascal PAPILLIER, Jean-Luc TOUZE, Francis DUPONT, Benoît Rémy, Pascal MERMILLOD and Florence GUIGNOT

article en préparation

Article 3

Effet du milieu de culture sur la cinétique d'expression génique au cours du développement embryonnaire préimplantatoire bovin

Introduction

L'analyse globale du transcriptome tout comme celle de gènes candidats montre clairement des modifications d'expression génique en fonction des conditions de développement *in vitro* et *in vivo* des embryons. Les conditions de maturation des ovocytes, altèrent également l'expression de certains gènes dans l'embryon. Ces altérations du profil d'expression pourraient être une réponse de l'embryon pour compenser les conditions de culture sous ou sub optimales qui lui sont imposées. L'analyse des profils d'expression des gènes associés au développement de l'embryon précoce s'avère donc être un moyen très utile pour évaluer la normalité des embryons. L'objectif de ce travail était d'étudier par RT-QPCR, dans l'espèce bovine, l'**évolution de l'expression génique** au cours de la maturation ovocytaire et du développement embryonnaire préimplantatoire, après ajout d'**acide docosahexaénoïqu**e (**DHA**, C22: 6) ou seulement de sérum dans le milieu de développement *in vitro*, et de comparer le profil d'expression génique des embryons obtenus *in vivo* et *in vitro* au stade blastocyste. Les gènes étudiés ont été choisis en fonction de leur rôle dans le métabolisme lipidique, au niveau du stockage des triglycérides, de la synthèse des AG, des lipides complexes et notamment des triglycérides, de la désaturation des AG, de la régulation de la lipogenèse et de l'oxydation mitochondriale via des catalyseurs membranaires.

Plan expérimental – Méthodes

La cinétique d'expression génique a été faite à partir de sept stades de maturation / développement : **ovocytes immatures**, **ovocytes maturés**, **stade 2 cellules**, **stade 5-8 cellules**, **morula**, **blastocyste** et **blastocyste expansé**. Après fécondation, les zygotes ont été mis en développement dans le milieu mSOF enrichi, soit par 5 % de sérum de veau fœtal et 100 µM d'anti-oxydant (β-mercaptoéthanol), soit en plus par 10 µM de DHA. Pour chaque stade, l'analyse des transcrits a été faite à partir de 5 ovocytes ou embryons. En parallèle, des embryons *in vivo* ont été produits et collectés à J7,5 post insémination.

Les gènes testés codent pour **SCD1** (stearoyl-CoA desaturase)**, FADS2** (fatty acid desaturase 2), **ACC** (acetyl-CoA-carboxylase), **ACSL1** (acyl-CoA synthetase long-chain

family member 1), **DGAT1** (diacylglycerol O-acyltransferase 1), l'**adipophiline** (lipoprotein), **CPT-II** (carnitin palmitoyltransferase-II) et **SREBP1** (sterol regulatory element-binding transcription factor 1). La normalisation a été faite par rapport à la moyenne géométrique des deux gènes rapporteurs internes, le 18S et RPL19, puis par rapport au stade ovocyte immature.

Principaux Résultats et Conclusions

Les résultats de cette expérience montrent que le stade de développement comme le milieu dans lequel les embryons sont cultivés modifient nettement le profil d'expression génique. Plusieurs profils ont été mis en évidence. Un niveau relatif de transcrits assez stable jusqu'au stade 5-8 cellules (SREBP1), ou jusqu'au stade morula (ASCL1), avant une chute importante au-delà. Un niveau déclinant progressivement jusqu'au stade 5-8 cellules (ACC, DGAT1, CPT-II), puis une chute au-delà. Une variante pour le profil de l'adipophiline, avec une remontée entre l'ovocyte mature et le stade 5-8 cellules. A l'opposé de ces profils, un niveau très bas, voire indétectable, avant une augmentation très importante à partir du stade 5-8 cellules (SCD1 et FADS2). L'ajout de DHA régule la quantité de transcrits pour SCD1, FADS2 et SREBP1 dès le stade 5-8 cellules ($P<0,05$). Les blastocystes *in vivo* ont une quantité relative de transcrits plus faible pour l'adipophiline, plus élevée pour SCD1 et qui tend à être plus élevée pour SREBP1, comparée à celle des embryons *in vitro* sans ajout de DHA, alors qu'aucune modification n'a été observée pour les autres transcrits, ACSL1, DGAT, ACC et CPT-II sans ajout de DHA également.

En conclusion, la faible expression des gènes codant pour les enzymes de la synthèse des AG et des triglycérides, et de l'oxydation mitochondriale des lipides observée à partir du stade morula, ainsi que la forte expression du gène en relation avec le stockage des triglycérides jusqu'au stade 5-8 cellules semblent indiquer que l'accumulation de triglycérides dans les embryons bovins *in vitro* ne serait pas directement due à une incorporation des AG présents dans le milieu de développement, en l'occurrence le sérum, mais plus à un manque de dégradation des AG déjà présents dans les stades plus précoces du développement, oocytes, stade 5-8 cellules. Cette absence de dégradation pourrait être le résultat d'un blocage induit par un ou des composants du sérum (facteur de croissance, insuline, glucose), ou la conséquence fonctionnelle du faible nombre de mitochondries présentes dans les embryons produits *in vitro*. Il serait intéressant d'essayer de lever le verrou de cette dégradation à l'aide de facteurs lipolytiques et de voir les conséquences sur l'expression génique et la cryorésistance des embryons. La forte expression jusqu'au stade morula du gène en relation

notamment avec une synthèse de novo de lipides complexes indique tout de même une incorporation possible des lipides issus du milieu de développement. La supplémentation en DHA confirme les résultats obtenus dans la publication 2. L'ajout de DHA dans le milieu de culture *in vitro* d'embryon bovin régule l'expression des transcrits de SCD1 et FADS2, dès le stade 5-8 cellules, via probablement la régulation de SREBP1. La faible cryorésistance des embryons produits *in vitro* en présence de sérum semble être le résultat d'une plus faible expression d'un gène codant pour une enzyme impliquée dans l'activité de désaturation des lipides, ce qui pourrait faire de ce gène un marqueur de la résistance au froid des embryons. La confirmation au niveau fonctionnel de ces résultats reste à faire.

Effect of culture environment on gene expression profiling of bovine preimplantation embryo

A. Al darwich [a, b, c, d], C. Perreau [a, b, c, d], P.Papillier [a, b, c, d], JL Touzé [a, b, c, d], F. Dupont [a, b, c, d] , B Rémy [e], P. Mermillod [a, b, c, d] and F. Guignot [a, b, c, d, *]

[a] INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

[b] CNRS, UMR6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

[c] Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France

[d] Haras Nationaux, F-37380 Nouzilly, France

[e] Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Physiologie de la Reproduction, B-4000 Liège, Belgium

[*] Corresponding author at: INRA, PRC, 37380 Nouzilly, France. Tel.: +33 2 47 42 77 94; fax: +33 2 47 42 77 43. E-mail address: Florence.guignot@tours.inra.fr

Abstract

The aim of this study was to evaluate the variation of gene expression throughout bovine preimplantation development, i.e. from immature oocyte until hatched blastocyst stage, and the effects of docosahexaenoic acid (DHA) *in vitro* supplementation on this gene expression compared to serum supplementation alone. Blastocysts produced *in vitro* and *in vivo* were also compared. Seven stages were studied: immature and matured oocytes, 2 cell and 5-8 cell stages, morula, blastocyst and hatched blastocyst. After fertilization, presumptive

zygotes were *in vitro* developed for 6 days in mSOF + 5% FCS + 100µM β-mercaptoethanol with or without 10µM of DHA. At each stage, five oocytes or embryos were collected for mRNA analysis by RT-QPCR. Analysed genes characterize important processes of lipid accumulation (adipophilin), fatty acid and triglyceride synthesis (ACC, acetyl-Coenzyme A carboxylase; ACSL1, long-chain acyl-CoA synthetase 1; DGAT1, diacylglycerol acyltransferase), desaturation (SCD1, stearoyl-CoA desaturase 1; FADS2, fatty acid desaturase 2), regulation, (SREBP1, sterol regulatory element binding transcription factor 1) and lipid mitochondrial degradation (CPT-II, carnitine palmitoyl transferase Type II). Results demonstrate that the relative transcript abundance was significantly affected by developmental stage for all tested genes and by culture environment for SCD1, FADS2 and SREBP1 ($P<0.05$). Adipophilin mRNA decreased dramatically from morula stage onwards, compared to endogenous genes. It remained low until hatched blastocyst stage, as ACC, DGAT1 and CPT-II mRNA. DHA supplementation down regulated SREBP1, SCD1 and FADS2 mRNA expression from 5-8 cell stages onwards. *In vivo* blastocysts contained significantly more SCD1 mRNA than the *in vitro* counterpart. In conclusion, triglyceride accumulation in blastocysts *in vitro* produced results maybe in lipid degradation lack, and not directly in fatty acid uptake from serum present in culture environment, and their higher cryosensitivity results maybe in unsaturated fatty acid decrease.

Keywords: DHA; adipophilin; ACSL1; CPT-II; SCD1; SREBP1;

1. Introduction

In many species, as cattle, the early embryo development is supported by maternal RNAs and proteins synthesized in immature oocytes during oogenesis, until activation of the embryonic genome at 8–16 cell stage in cattle (Memili and First, 2000). The substitution of maternally derived mRNA by the embryonic mRNA is called the maternal-to-embryonic

transition (MET). The MET step in embryogenesis is crucial as demonstrated by developmental block in embryos at the 16-cell stage after incubation with α-amanitin, an inhibitor of newly synthesized mRNA transcripts (Plante et al., 1994; Memili et al., 1998). Even if transcriptional events have been reported at earlier stages (Barnes and First, 1991; Memili et al., 1998; Natale et al., 2000), major transcriptional burst occurs after MET. After MET, the embryo takes control of its own destiny. There is a large body of evidence demonstrating that culture media can perturb gene expression of developing embryo in domestic species besides embryo morphology and physiology (for a review, see Wrenzycki et al., 2005). This is the case, not only when one compares *in vitro* and *in vivo* culture systems (Tesfaye et al., 2004), but also when comparisons of different *in vitro* culture systems are made (Doherty et al., 2000; Natale et al., 2001; Rizos et al., 2002a; Lonergan et al., 2003c; Fair et al., 2004). Moreover, modification of embryo constitutive genes induced by culture environment can result in an alteration of foetal and postnatal growth and developmental characteristics (Lonergan et al., 2006). So, changes in transcript abundance between *in vitro* and *in vivo* embryos may help to assess the normality of *in vitro* produced embryos as well as to optimise the *in vitro* culture conditions (Wrenzycki et al., 2005).

A major difference between embryos produced *in vivo* and *in vitro* (IVP) is the embryo lipid content (Abe et al., 1999; Charpigny et al., 2003), often induced by serum addition (Abe et al., 2002; Leroy et al., 2005a), which could be correlated to the higher sensitivity to chilling found in IVP embryo (Leibo, 2008). Excessive lipid droplets and triglycerides, and fewer phospholipids were found in IVP embryos (Charpigny et al., 2003). Recently, triglyceride accumulation was found to be correlated to a specific mRNA marker in bovine embryo, adipophilin mRNA (Al Darwich et al., publication 1). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) as conjugated linoleic acids (CLA, C18:2) reduced lipid droplets accumulation

in bovine embryos after *in vitro* culture supplementation, and improved bovine embryo resistance after cryopreservation (Pereira et al., 2007). Supplementation with arachidonic acid (C20:4n-6) and eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n-3) in oocyte maturation medium (Marques et al., 2007), or supplementation with EPA and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3) in diet (Zeron et al., 2002) had increased post-thawing embryo survival and oocyte membrane integrity following chilling respectively. In bovine blastocysts, 5 days of *in vitro* DHA supplementation modified the expression of gene involved in lipid metabolism as SCD1 (stearoyl-CoA desaturase 1) and ACC (acetyl-CoA-carboxylase), and in lipid metabolism regulation as SREBP1 (sterol regulatory element-binding transcription protein 1) compared to IVP control embryos without DHA supplementation (Al darwich et al., publication 2). SREBP1 is a very important key factor activating directly the expression of more than 30 genes dedicated to the synthesis and uptake of fatty acids, triglycerides, cholesterol and phospholipids (Brown and Goldstein, 1997; Sakakura et al., 2001; Sampath and Ntambi, 2005). ACSLs (long-chain acyl-CoA synthetase) are enzymes involved in fatty acid transport, membrane lipids remodeling and de novo complex lipids synthesis by producing long acyl-CoA esters that regulate various physiological processes (Tong et al., 2006; Soupene and Kuypers, 2008), while DGATs (diacylglycerol acyltransferase) play a specific role in the regulation of triglycerids synthesis (Cases et al., 1998). Another difference between embryos produced *in vivo* and *in vitro* is the volume density of mitochondria (Crosier et al., 2001), which is reduced in IVP embryos. These difference could also be correlated to lipid accumulation throught modification of CPTs activity (carnitine palmitoyl transferase), as these enzymes catalyse mitochondrial fatty acid oxidation and are very important in lipids metabolism (McGarry and Brown, 1997). No data are available on the expression profiling of genes encoding all these mentioned proteins in bovine embryo in relation to *in vitro* culture environment and particularly with PUFA supplementation.

The objective of this study focused on the variation of gene expression throughout bovine preimplantation development, i.e. from immature oocyte until hatched blastocyst stage, and on the effects of *in vitro* docosahexaenoic acid all cis-4, 7, 10, 13, 16, 19 (DHA) supplementation on this gene expression. Gene expression of embryos produced *in vivo* was also compared their *in vitro* counterparts. The set of genes analyzed characterizes several important processes including lipid storage, lipid synthesis and desaturation, lipid metabolism regulation and mitochondrial lipid degradation via transferase activity: adipophilin, SCD1 (stearoyl-CoA desaturase 1), FADS2 (fatty acid desaturase 2) ACC (acétyl-Coenzyme A carboxylase), ACSL1 (long-chain acyl-CoA synthetase 1), DGAT1 (diacylglycerol acyltransferase), SREBP1 (sterol regulatory element binding transcription factor 1), CPT-II (carnitine palmitoyl transferase Type II).

2. Materials and Methods

Chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO) unless otherwise indicated.

2.1. Embryo production

All animal procedures were performed in accordance with the French law on experimental procedures (authorizations 37-090 and C37-175-2 of the French Ministry of Agriculture).

2.1.1. Oocyte collection and *in vitro* maturation (IVM)

Ovaries from adult cows were collected at a slaughterhouse and oocyte-cumulus complexes (COC) were aspirated from 3 to 6 mm follicles, selected based on morphological

criteria, *in vitro* matured for 22-24 h as previously described (Al darwich et al., publication 1). Immature oocytes at germinal vesicle stage and *in vitro* matured metaphase II oocytes (polar body extrusion was verified) were denuded by mechanical treatment until separation of oocytes from surrounding somatic cells. Absence of cumulus cell was checked visually under a stereomicroscope. Groups of 5 oocytes were placed in dry Eppendorf tubes and stored frozen at -80°C until RNA extraction.

2.1.2. *In vitro* fertilization (IVF) and developpement (IVD)

At the end of the maturation period, COC were *in vitro* fertilized as previously described (Al darwich et al., publication 1). Day of fertilization was considered as day 0. After 18 h, presumptive zygotes were completely denuded of cumulus cells by vortexing and developped for 7 days as previously described (Al darwich et al., publication 1) in two different culture environments: 1) mSOF, modified synthetic oviduct fluid (Holm et al., 1999) + 5% Fetal Calf Serum (FCS, ref 29167748, MP Biomedicals, Illkirch, France) + 100µM β-mercaptoethanol (ME), 2) mSOF + 5 % FCS + 100µM β-ME + 10µM docosahexaenoic acid (DHA cis-4, 7, 10, 13, 16, 19, C22:6) (Matreya, ref 1136), diluted in absolute ethanol. Cleavage was assessed at day 2 post fertilization. Groups of 5 embryos were collected over preimplantation development: zygote (single cell, day 0), 2-cell embryos (day 2), 5 to 8-cell embryos (day 3), morulae (day 5), blastocysts (day 7) and hatched blastocysts (day 8). All embryo samples were stored frozen at -80°C until RNA extraction.

2.2. *In vivo* produced embryos

Beef cross heifers were synchronized, superovulated and inseminated as previously described (Al darwich et al., publication 1). Embryos were recovered at day 7.5 post insemination by transcervical uterine flushing

2.3. RNA isolation and reverse transcription

After adding 1 pg per oocyte / embryo of luciferase mRNA (Promega, Charbonnières-les-bains, France) as an exogenous standard, total RNA was extracted from oocytes and embryos using TriZol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), incubated with RQ1 DNase (Promega, France) to avoid contamination with genomic DNA and reverse transcripted with oligo(dT)15 primers and random primers (Promega, France) as described previously (Al darwich et al., publication 2). Parallel negative control reactions were set up without substrate.

2.4. Real time RT-PCR

The quantification of all gene transcripts was carried out by real-time RT-PCR on MyiQCycler apparatus (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, France) using specific primers (table 1). Reactions were performed in triplicate using a real-time PCR kit provided with SYBR Green fluorophore (Bio-Rad) as described previously (Al darwich et al., publication 2). Briefly, the PCR protocol included an initial step of 95°C (3 min), followed by 40 cycles of 95°C (30 sec), 60°C (30 sec) and 72°C (20 sec). Quantification and normalisation of the gene expression were done as proposed previously (Al darwich et al., publication 2). Briefly, median values of target gene were normalized to luciferase to validate experiments. Then, to compare gene expression between embryos produced *in vivo* and vitro, median values of target gene were normalized to the geometric mean value of two endogenous genes, 18S and RPL19, and finally normalized to the same ratio for immature oocytes. Data are presented as mean ± SEM.

2.5. Statistical analysis

Data on mRNA expression assayed by quantitative RT-PCR were tested according to embryo development stage and embryo *in vitro* culture environment by an analysis of variance after log transformation with SAS software (GLM procedure of SAS; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Data on mRNA expression of blastocysts produced *in vivo* and *in vitro* were also compared with this variance analysis. Differences between means were compared with Student-Newman-Keuls test. All differences were considered significant at $P<0.05$.

3. Results

Six trials were performed and 6 samples of 5 oocytes / embryos were collected for immature oocyte (IO) and *in vitro* matured oocytes,(MO) and for the two different IVD environments: 2-cell, 5 to 8-cell, morulae, blastocysts and hatched blastocysts stages. Eight samples of 5 embryos were collected *in vivo*. cDNAs were diluted to performed Q-PCR amplification on $1.25\ 10^{-5}$ equivalent embryos per µL for 18S, and on $1.25\ 10^{-3}$ for luciferase, RPL19 and interest genes. Ratios to immature oocyte stage after normalization endogenous genes were shown in Figure 1. Transcripts for SCD1, FADS2, adipophilin, CPT-II, ACC, DGAT1, ACSL1 and SREBP1 were detected throughout oocyte maturation and preimplantation development from the 2-cell to hatched blastocysts stage.

A high variability induced by trials was observed ($P<0.05$). It was included in statistical analysis model. The transcript abundance was significantly affected by developmental stage for all tested genes and by culture environment for SCD1, FADS2 and SREBP1 ($P<0.05$). Five distinct profiles have been observed (figure 1).

Adipophilin profile. A high level was observed during maturation until 5-8 cell embryos and it decreased strongly from the morula stage onwards ($P<0.05$). Moreover, it was reduced during maturation and increased during first cleavages ($P<0.05$) to reach same level as in

immature oocytes. No significant variation was observed between advanced embryonic stages.

ACC, CPT-II and DGAT1 profiles. For the two culture media, the mRNA level decreased progressively from immature oocytes until 5-8 cell embryos ($P<0.05$). From the morula stage onwards, it was significantly reduced compared to 5-8 cell stage ($P<0.05$). No effect of medium was observed for these three mRNAs at all development stages, except at 5-8 cells for DGAT1 and CPT-II and at hatched blastocyst stage for DGAT1 and ACC. Higher CPT-II mRNA level was found in blastocyst stage compared to morula stage with DHA supplementation ($P<0.05$).

ACSL1 profile. The transcript level remained quite stable until morula stage and decreased at blastocyst stages ($P<0.05$).

SCD1 and FADS2 profiles. The transcript abundance increased significantly from the 5-8 cells stage to hatched blastocyst stage in mSOF culture environment and was significantly higher compared to counterpart stage in DHA supplementation, except however at morula stage, as it did not vary throughout embryo development in DHA culture environment and remained low. SCD1 and FADS2 mRNA levels were even very low or not detected for many samples at several early developmental stages, particularly at 2 cell stage.

SREBP1 profile. In mSOF IVD medium, the transcript level remained stable during ovocyte maturation and first cleavages, but it decreased from the morula stage onwards. Contrary, IVD medium supplemented with DHA, it already decreased at 5-8 cells stage and continued to decline progressively. At blastocyst stage, significantly higher transcript level was found in mSOF compared to DHA supplementation ($P<0.05$).

3.2. mRNA level in blastocysts produced *in vivo* and *in vitro*

The adipophilin and SCD1 mRNA levels were significantly lower and higher, respectively, in blastocysts produced *in vivo* compared to embryos produced *in vitro*, with or without DHA supplementation (figure 1) ($P<0.05$). The FADS2 and SREBP1 mRNA abundance were not different between *in vivo* and mSOF *in vitro* groups, but was significantly reduced with DHA supplementation ($P<0.05$). For DGAT1 and ACSL1, mRNA level was higher in blastocysts produced in DHA culture environment than in *in vivo* blastocysts ($P<0.05$). No difference was observed for ACC and CPT-II transcripts.

4. Discussion

For the first time, changes in relative transcript abundance of genes involved in lipid metabolism throughout oocyte maturation and preimplantation development after PUFA supplementation, i.e. DHA, in IVD medium were analysed in bovine embryo. Results demonstrated clearly the effect of developmental stage and culture environment on gene expression. The set of genes analyzed in this study characterizes several important processes of lipid accumulation (adipophilin), fatty acid and triglyceride synthesis (ACC, ACSL1, DGAT1), desaturation (SCD1, FADS2), regulation, (SREBP1) and mitochondrial degradation via carnitine acyl transferase catalysis (CPT-II). Different mRNA profiles have been observed throughout the early preimplantation period.

4.1. Profiles of genes involved in lipids storage, synthesis and degradation

ACC, DGAT1 and CPT-II profiles reflected the degradation of maternal transcripts between immature oocytes and 5-8 cell stage at the same rate as endogenous gene mRNA degradation as most frequently observed. After adipophilin mRNA degradation during maturation, according to triglycerides decrease observed in *in vivo* and *in vitro* matured oocyte compared to immature counterpart (Ferguson and Leese, 1999; Kim et al., 2001), the expression of this gene increased already at 2 cell stage, probably corresponding to early

transcription activation previously reported (Barnes and First, 1991; Vigneault et al., 2009). Transcription of these four genes declined dramatically after MET compared to endogenous gene mRNA, indicating maybe that triglyceride and fatty acid synthesis, triglyceride storage and mitochondrial degradation were not very active in bovine embryo *in vitro* produced at this developmental stage. Contrary to precited genes, mRNA expression of ACSL1 was constant from immature oocyte until morula stage and decreased slightly at blastocyst stages. These results indicated that, until morula stage, de novo complex lipids synthesis, phospholipids remodelling and / or fatty acid transport should be very important, but not at blastocyst stage. Moreover, ACC, DGAT1, CPT-II and ACSL1 mRNA level was not different between blastocysts produced *in vivo* and *in vitro* in mSOF, but triglyceride storage was even so higher in embryo produced *in vitro* as adipophilin mRNA abundance found in embryos produced *in vivo* was compared. All these results suggest that the excessive lipid droplets and high triglyceride level reported previously in bovine embryo *in vitro* produced (Abe et al., 1999; Abd El Razek et al., 2000; Charpigny et al., 2003) maybe a consequence of lipid degradation lack during early embryonic development and not only direct result of triglyceride embryonic synthesis and, fatty acid uptake and accumulation, from serum or other nutriments present in IVD medium until blastocyst stage, but also a consequence. It will be interesting to investigate factors increasing lipolyse activity during oocytes maturation and embryonic development to determine if this lipid metabolic way could be directly involved in triglyceride accumulation difference observed between bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. Except an increase at 5-8 cell stage for DGAT1 and CPT-II, DHA supplementation had not regulated gene expression profile of these five genes throughout oocyte maturation and preimplantation development, according to our previous results on blastocyst stage (Al Darwich et al., publication 2), but contrary to fat embryo index reduction obtained with CLA, t10, c12 supplementation in IVD medium and evaluated with Nomarsky microscopy in

bovine embryos (Pereira et al., 2007). These authors suggested that CLA could reduce lipid accumulation through decrease of fatty acid synthesis and uptake, as reported on adipocytes (Peterson et al., 2003; Granlund et al., 2005). This observation was not found with DHA on mRNA expression. DHA should perhaps not be involve in embryo lipid storage as linoleic acid (Hochi et al., 1999). Addition of 10 µM of DHA has only down upregulated ACSL1 and DGAT1 mRNA expression in embryo produced *in vitro* compared with the same *in vivo*

4.2. Profiles of genes involved in lipids desaturation

Profiles of SCD1 and FADS2, key enzymes involved in synthesis of mono and polyunsaturated fatty acid, reflected the major transcriptional activation occurs after MET. Except at morula stage, transcription of these two genes increased considerably after MET compared to endogenous genes mRNA, indicating embryos needs of unsaturated fatty acid at this development stage. Indeed, the polyunsaturated fatty acids are essential components of membrane lipids and early embryo cell division is associated to a very important increase of membrane surface area. Between one cell and four cell stage, a 74% increase in membrane surface area was reported (Haster, 1989). Blastocyst stage is followed by an increase of cells number and size, whereas these kinds of change in morula are perhaps not so important, as showed by mRNA expression found in this study. In human, embryos which succeed development beyond the 4 cell stage have significantly higher concentration of unsaturated fatty acids, i.e. linoleic and oleic acids, and lower concentration of total saturates fatty acids than embryos which failed to develop past the 4 cell stage (Haggarty et al., 2006). DHA supplementation had significantly down regulated SCD1 and FADS2 mRNA expression level from 5-8 cell stage onwards, like other PUFA such as CLA isomer, EPA or arachidonic acid in liver and adipocytes (Sessler et al., 1996; Bretillon et al., 1999; Choi et al., 2000; Park et al., 2000). This PUFA could be directly incorporated into the embryo membranes during *in*

vitro culture and reduce polyunsaturated fatty acid needs and, consequently, desaturase activity in cells. This mechanism could probably explain increase of bovine embryo cryoresistance after CLA, arachidonic acid, EPA or DHA supplementation in culture medium or diet observed previously (Zeron et al., 2002; Pereira et al., 2007; Marques et al., 2007). At blastocyst stage, the SCD1 mRNA expression is significantly up regulated *in vivo* compared to *in vitro*, providing an indication on the high monoinsaturated fatty acid activity in embryo produced *in vivo*, probably in relation to their higher cryoresistance compared to embryo produced *in vitro* in mSOF IVD medium with only serum supplementation, i.e. without PUFA supplementation (Abe et al., 2002; Reis et al., 2005; Pereira et al., 2007).

4.3. Profiles of gene involved in lipids metabolism regulation

The expression results of gene encoding SREBP1, transcriptional mediator activating lipogenic gene expression, demonstrated that this gene was already expressed in bovine oocyte. Its expression profile was relatively high and invariant before MET in mSOF medium, whereas it decreased after MET. Except at morula stage, DHA supplementation had down regulated SREBP1 expression from 5-8 cell stage onwards. The down regulation of SREBP1 mRNA observed at blastocyst stage in this present study confirms our previous results (Al Darwich et al., publication 2). All these results are agreed to effect of n-3 and n-6 PUFA, chain length and degree of unsaturation dependent, previously found on SREBP in adipocyte and liver and in different cell lines (Worgall et al., 1998; Xu et al., 1999; Hannah et al., 2001; Granlund et al., 2005). PUFA have been shown to modulate lipogenic gene transcription by interacting with several nuclear factors, hepatic nuclear factor, liver X receptors, peroxisome proloferators-activated receptors and also by regulating SREBP1 (Jump, 2002). In DHA supplementation medium, decreases of SCD1, FADS2 and SREBP1 mRNA level were observed at the same stage (figure 1). So, in bovine embryo, DHA

supplementation added to IVD medium at day 1 post IVF and during 7 days could probably down regulated SCD1 and FADS2 expression through SREBP1 mRNA regulation, and already at 5-8 cell stage (Day 2 post IVF). No significant difference in expression of SREBP1 mRNA was observed in blastocysts produced *in vivo* and *in vitro* in mSOF IVD medium with only serum supplementation. Only a tendency was observed (P=0.0868, figure 1), indicating probably that SREBP1 expression is not the only key factor down regulating SCD1 mRNA expression, according to low SREBP1 mRNA level found in hatched blastocyst obtained in mSOF IVD medium with serum only, whereas SCD1 and FADS2 mRNA level still increase. Further experiments are needed to assess other key mediators as nuclear factors expression or AMPKα phophorylation in early stage of bovine embryo development

CONCLUSION

This study showed that mRNA expression of genes involved in lipid metabolism (adipophilin, ACC, ACSL1, DGAT1, CPT-II, SCD1, FADS2 and SREBP1) was significantly affected,by developmental stage in bovine, from immature oocyte until hatched blastocyst stage, and by embryo culture environment, i.e. DHA vs only serum supplementation. Moreover, adipophilin, ACSL1, DGAT1, SCD1, FADS2 and SREBP1 mRNA expression was different between blastocyst *in vivo* and *in vitro* produced, with or without DHA supplementation. Further experiments are required to assess if lipid degradation lack may be partly responsible of triglyceride accumulation and if other key mediators may be involved in regulation of fatty acid desaturation as SREBP1 did probably. It will be also interesting to further follow the expression of these target genes in earlier *in vivo* developmental stage.

Acknowledgements

This study was funded by the French National Institute for Agricultural Research (Nouzilly, France). The authors are grateful to C. Audouin, E. Briant and their team at INRA Nouzilly for *in vivo* embryo production. They wish to thank sincerely A. Thelie and R. Dalbies-Tran for skilful help in PCR technique, M. Vidament and D Guillaume for statistical help and V. Maillard, J. Dupont and N. Rideau for advices in lipid metabolism.

REFERENCES

Abd El Razek, I.M., Charpigny, G., Kodja, S., Marquant-Le Guienne, B., Mermillod, P., Guyader-Joly, C., Humblot, P., 2000. Differences in lipid composition between in vivo- and in vitroproduced bovine embryos. Theriogenology 53, 346 abstract.

Abe, H., Otoi, T., Tachikawa, S., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H., 1999. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. Anat Embryol (Berl) 199, 519-527.

Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H., 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. Molecular reproduction and development 61, 57-66.

Barnes, F.L., First, N.L., 1991. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. Molecular reproduction and development 29, 117-123.

Brasaemle, D.L., Dolios, G., Shapiro, L., Wang, R., 2004. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. The Journal of biological chemistry 279, 46835-46842.

Bretillon, L., Chardigny, J.M., Gregoire, S., Berdeaux, O., Sebedio, J.L., 1999. Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro. Lipids 34, 965-969.

Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell 89, 331-340.

Cases S, Smith SJ, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Novak S, Collins C, Welch CB, Lusis AJ, Erickson SK, Farese RV. 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A **95:**13018–13023.

Charpigny, G., Guesnet, P., Marquant-LeGuiene, B., Heyman, Y., Mermillod, P., Humblot, P., 2003. Fatty acid composition of triglycerides, phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines of bovine embryos. BRG 4, 159–172.

Choi, Y., Kim, Y.C., Han, Y.B., Park, Y., Pariza, M.W., Ntambi, J.M., 2000. The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. J. Nutr. 130, 1920-1924.

Crosier, A.E., Farin, P.W., Dykstra, M.J., Alexander, J.E., Farin, C.E., 2001. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. Biology of reproduction 64, 1375-1385.

Doherty, A.S., Mann, M.R., Tremblay, K.D., Bartolomei, M.S., Schultz, R.M., 2000. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. Biology of reproduction 62, 1526-1535.

Fair, T., Gutierrez-Adan, A., Murphy, M., Rizos, D., Martin, F., Boland, M.P., Lonergan, P., 2004. Search for the bovine homolog of the murine ped gene and characterization of its messenger RNA expression during bovine preimplantation development. Biology of reproduction 70, 488-494.

Ferguson, E.M., Leese, H.J., 1999. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. Journal of reproduction and fertility 116, 373-378.

Granlund, L., Pedersen, J.I., Nebb, H.I., 2005. Impaired lipid accumulation by trans10, cis12 CLA during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. Biochimica et biophysica acta 1687, 11-22.

Haggarty, P., Wood, M., Ferguson, E., Hoad, G., Srikantharajah, A., Milne, E., Hamilton, M., Bhattacharya, S., 2006. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. Human reproduction (Oxford, England) 21, 766-773.

Hannah, V.C., Ou, J., Luong, A., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2001. Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. The Journal of biological chemistry 276, 4365-4372.

Haster, P.M., pratt and Martin, A., Georg, 1989. Organisation and assembly of the surface membrane during early cleavage of the mouse embryo Roux Arch Develop Biol 193, 170-178.

Hochi, S., Kimura, K., Hanada, A., 1999. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. Theriogenology 52, 497-504.

Holm, P., Booth, P.J., Schmidt, M.H., 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.

Jump, D.B., 2002. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. Curr. Opin. Lipidol. 13, 155-164.

Kim, J.Y., Kinoshita, M., Ohnishi, M., Fukui, Y., 2001. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. Reproduction (Cambridge, England) 122, 131-138.

Leibo, S.P., 2008. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. Theriogenology 69, 37-47.

Leroy, J.L., Genicot, G., Donnay, I., Van Soom, A., 2005. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with nile red: a practical approach. Reprod. Domest. Anim. 40, 76-78.

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

Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Moreira, P.M., Pintado, B., de la Fuente, J., Boland, M.P., 2003. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. Biology of reproduction 69, 1424-1431.

Marques, C., Baptista, M., Vasques, M., Horta, A., Pereira, R., 2007. Effect of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on bovine oocyte in vitro maturation and subsequent embryo development and freezability. Reprod Dom Anim 42, 108–109.

McGarry, J.D., Brown, N.F., 1997. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. European journal of biochemistry / FEBS 244, 1-14.

Memili, E., Dominko, T., First, N.L., 1998. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. Molecular reproduction and development 51, 36-41.

Memili, E., First, N.L., 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. Zygote (Cambridge, England) 8, 87-96.

Natale, D.R., De Sousa, P.A., Westhusin, M.E., Watson, A.J., 2001. Sensitivity of bovine blastocyst gene expression patterns to culture environments assessed by differential display RT-PCR. Reproduction (Cambridge, England) 122, 687-693.

Natale, D.R., Kidder, G.M., Westhusin, M.E., Watson, A.J., 2000. Assessment by differential display-RT-PCR of mRNA transcript transitions and alpha-amanitin sensitivity during bovine preattachment development. Molecular reproduction and development 55, 152-163.

Park, Y., Storkson, J.M., Ntambi, J.M., Cook, M.E., Sih, C.J., Pariza, M.W., 2000. Inhibition of hepatic stearoyl-CoA desaturase activity by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. Biochimica et biophysica acta 1486, 285-292.

Pereira, R.M., Baptista, M.C., Vasques, M.I., Horta, A.E., Portugal, P.V., Bessa, R.J., Silva, J.C., Pereira, M.S., Marques, C.C., 2007. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). Anim. Reprod. Sci. 98, 293-301.

Peterson, D.G., Matitashvili, E.A., Bauman, D.E., 2003. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased trans-10, cis-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. J. Nutr. 133, 3098-3102.

Plante, L., Plante, C., Shepherd, D.L., King, W.A., 1994. Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. Molecular reproduction and development 39, 375-383.

Reis, A., McCallum, G.J., McEvoy, T.G., 2005. Accumulation and distribution of neutral lipid droplets is non-uniform in ovine blastocysts produced in vitro in either the presence or absence of serum. Reproduction, fertility, and development 17, 815-823.

Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M.P., Arroyo-Garcia, R., Pintado, B., de la Fuente, J., Gutierrez-Adan, A., 2002. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. Biology of reproduction 66, 589-595.

Sakakura, Y., Shimano, H., Sone, H., Takahashi, A., Inoue, N., Toyoshima, H., Suzuki, S., Yamada, N., 2001. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 286, 176-183.

Sampath, H., Ntambi, J.M., 2005. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. Annu. Rev. Nutr. 25, 317-340.

Sessler, A.M., Kaur, N., Palta, J.P., Ntambi, J.M., 1996. Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. The Journal of biological chemistry 271, 29854-29858.

Soupene, E., Kuypers, F.A., 2008. Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J 233, 507-521.

Tesfaye, D., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Gilles, M., Schellander, K., 2004. A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced in vitro or in vivo. Reprod. Domest. Anim. 39, 396-404.

Tong, F., Black, P.N., Coleman, R.A., DiRusso, C.C., 2006. Fatty acid transport by vectorial acylation in mammals: roles played by different isoforms of rat long-chain acyl-CoA synthetases. Arch. Biochem. Biophys. 447, 46-52.

Vigneault, C., Gravel, C., Vallee, M., McGraw, S., Sirard, M.A., 2009. Unveiling the bovine embryo transcriptome during the maternal-to-embryonic transition. Reproduction (Cambridge, England) 137, 245-257.

Worgall, T.S., Sturley, S.L., Seo, T., Osborne, T.F., Deckelbaum, R.J., 1998. Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein. The Journal of biological chemistry 273, 25537-25540.

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. Reproduction, fertility, and development 17, 23-35.

Xu, J., Nakamura, M.T., Cho, H.P., Clarke, S.D., 1999. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. The Journal of biological chemistry 274, 23577-23583.

Zeron, Y., Sklan, D., Arav, A., 2002. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. Molecular reproduction and development 61, 271-278.

Illustrations Captions

Table 1. Primers sequences

Figure 1. Evolution of adipophilin, DGAT1, ACC, CPT-II, SCD1, FADS2, SREBP1 and ACSL1 transcripts during oocytes maturation and embryo development.

Target gene values were normalized to geometric mean value of 18S and RPL19, and then to the same ratio for immature oocytes (mean ± SEM).

[a, b, c, d, e, f] Different superscripts indicate significant difference ($P<0.05$: variance analysis after log transformation) between *in vitro* media and throughout oocyte maturation and preimplantation development.

[***a***, ***b***] Different bold, italic and underlined superscripts indicate significant difference between blastocysts produced *in vivo* or *in vitro* ($P<0.05$; variance analysis after log transformation).

IO : immature oocyte, MO : matured oocyte ; : 2 c : 2 cell stage, 5/8 c : 5-8 cell stage, M : morula, B : blastocyst ; HB : hatched blastocyst ; IVM : *in vitro* maturation ; IVD : *in vitro* development.

⁘ : IO ; ▩ : MO ; ■: mSOF + 5% FCS + 100µM β-ME ; □ : mSOF + 5% FCS + 100µM β-ME + 10µM DHA ; ⊠ : *in vivo*.

The transcript abundance was significantly affected by developmental stage for all tested genes and by culture environment for SCD1, FADS2 and SREBP1 ($P<0.05$).

Table 1. Primers sequences

gene	primer	sequence (5' --> 3')	Genbank accession
18S	S3	CGGACCAGAGCGAAAGCATTTG	DQ222453
	As4	GAA TAACGCCGCCGCATCG	
RPL19	S	AATCGCCAATGCCAACTC	AY158223
	As	CCCTTTCGCTTACCTATACC	
luciferase	S2	TCATTCTTCGCCAAAAGCACTCTG	X84848
	As2	AGCCCATATCCTTGTCGTATCCC	
Adipophilin	S	ACAACACACCCCTCAACTGG	AJ011680
	As	CTGCCTGCCTACTTCAGACC	
ACC	S1	TGCTTCCCATTTGCCATC	AJ132890
	As1	CTGCCATCCTCACGACCT	
DGAT1	S2	TCCACTCCTGCCTGAACGC	NM_174693
	As2	GCTGCCCACTTGCTGCTG	
CPT-II	S	TGTGCCTTCCTTCCTGTCTTGG	NM_001045889
	As	CGATGGGGTCTGGGTAAACGA	
ACSL1	S1	TGACTGTTGCTGGAGACTGG	NM_001076085
	As1	TGTGCTTCTTCCTGTCGATG	
SCD1	S3	CTGGCTGGTGAATAGTGCTG	NM_173959
	As3	AAGGTGTGGTGGTAGTTGTGG	
FADS2	S1	CTGAGGAAGACCGCTGAGGAC	NM_001083444
	As1	GATGACGAACTTGTGGACGATGTG	
SREBP1	S1	CCGTTTCTTCGTGGATGG	NM_001113302
	As1	ATGCTGGAGCTGATGGAG	

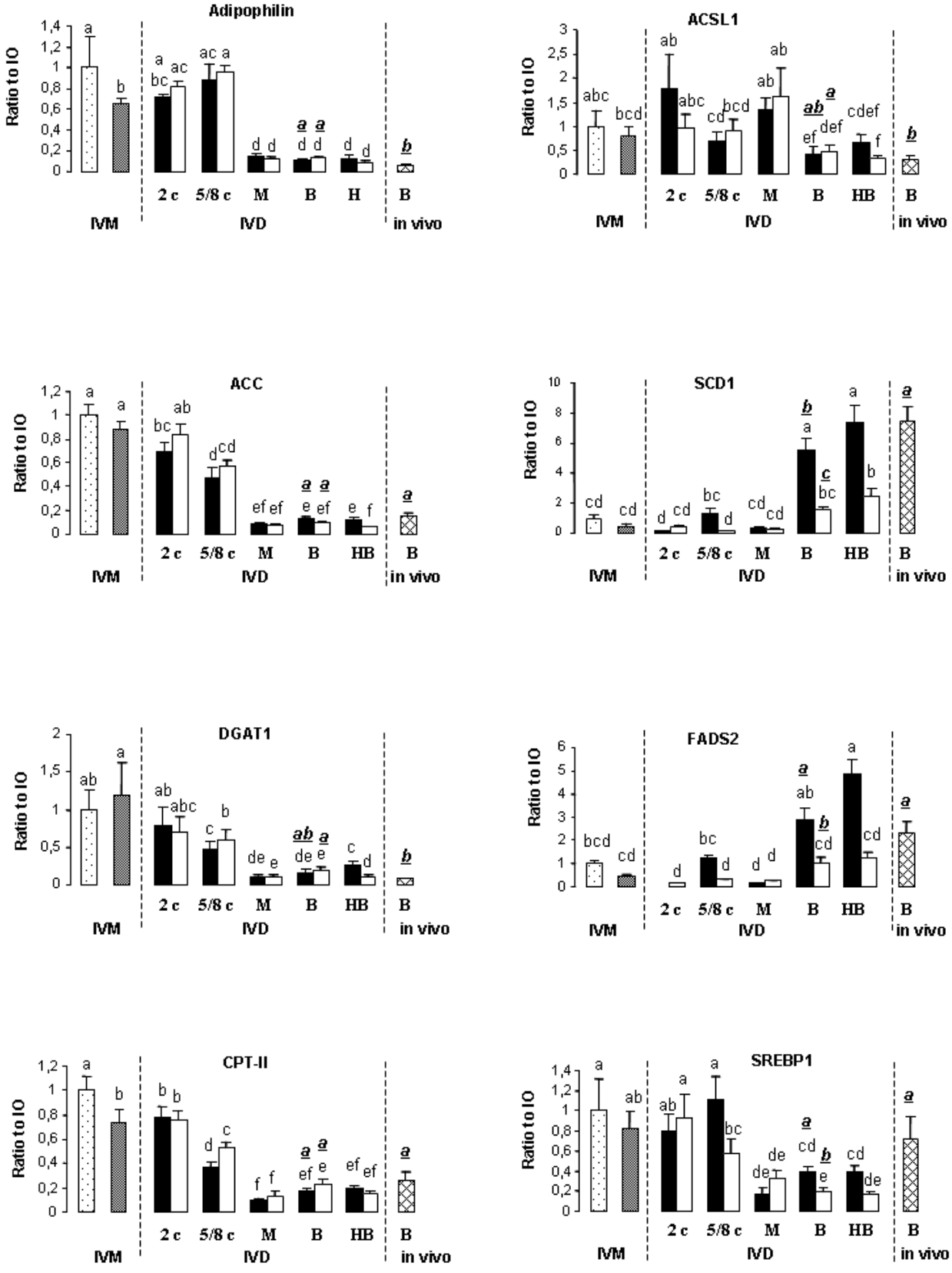

Adipophilin
ACSL1
ACC
SCD1
DGAT1
FADS2
CPT-II
SREBP1
Ratio to IO
2 c
5/8 c
M
B
H
HB
IVM
IVD
in vivo

Figure 1.

DISCUSSION GENERALE

Pour mieux comprendre les mécanismes responsables de la moindre cryorésistance des embryons bovins *in vitro* comparée à celle des embryons produits *in vivo*, qui freine leur plus large utilisation sur le terrain, nous avons choisi une approche transcriptomique avec l'étude de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique puisque ces deux catégories d'embryons n'ont pas les mêmes teneurs en triglycérides et phospholipides et que cette différentielle est sûrement à mettre en relation avec leur différence de cryorésistance. L'avènement, depuis quelques années, des techniques de biologie moléculaire, a rendu possible cette approche, qui se veut originale pour le modèle « embryon bovin jour 7 post insémination » quant à la problématique de recherche et aux gènes d'intérêt étudiés pour lesquels elles ont été mises en œuvre.

1. Mise au point des techniques de RT-QPCR et validation d'une méthode d'analyse des résultats de quantification des transcrits

Trois expériences préliminaires ont été réalisées dans le but d'estimer l'efficacité de la RT-QPCR et la répétabilité entre répliques pour des gènes embryonnaires qui pouvaient être très faiblement exprimés, donc dans le but de voir les limites de cette technique pour le modèle « embryon bovin J7/J8 post fécondation ». Nous avons été confrontés à un premier problème qui est le rendement de l'extraction des ARN totaux à partir de 5 embryons bovins au stade J7, tel que l'échantillonnage a été défini. Il n'était en effet guère concevable de pouvoir regrouper plus de 5 embryons par condition expérimentale. L'extraction devait donc être optimisée au maximum afin de pouvoir disposer d'une quantité suffisante d'ADNc pour la réalisation des QPCR sur chacun des gènes d'intérêt étudiés qui se sont révélés être en effet très faiblement présents. Le kit commercial, choisi au départ pour permettre de s'affranchir d'un effet opérateur, n'a pas permis de répondre à l'exigence inhérente au modèle. Les amplicons d'ADNc pour les gènes d'intérêt étaient détectés très tardivement, voire pas du tout. Une autre technique d'extraction à meilleur rendement a donc dû être utilisée pour la suite du travail de thèse. L'extraction par le trizol a en effet permis, à partir de la même quantité d'embryons J7, à savoir 5 embryons, de quantifier correctement les transcrits d'intérêt retenus dans ce travail de thèse.

Les quantités d'ARN totaux extraits étant difficiles voire même impossibles à mesurer de façon fiable avant la rétrotranscription, un ou des gènes endogènes doivent être conjointement étudiés pour normaliser la quantification des transcrits des gènes d'intérêt en

fonction du nombre de blastomères présents dans l'échantillon. Le 18S, ARN ribosomale, est un référentiel endogène qui peut être utilisé pour le modèle « embryon J7 », une augmentation de 18S étant corrélée positivement à un accroissement du nombre de cellules. Par contre, pour amplifier un ARNr, les conditions de RT doivent être modifiées et optimisées par rapport à un amorçage classique en oligo(dT) qui reconnait quasi exclusivement les ARNm polyadénylés. Des 3 RT qui ont été testées, l'amorçage conjoint d'oligo(dT)15 et d'hexamères randomisés a permis, pour notre modèle, une bonne amplification du 18S, sans affecter le niveau d'expression des ARNm pour les autres gènes analysés, indiquant que l'amorçage oligo(dT)15 à la concentration utilisée n'interfèrait pas avec le mélange d'hexamères randomisés. Cette combinaison d'amorces de RT a été retenue pour les études à suivre.

Lors de ces expériences préliminaires, nous avons voulu tester deux rapporteurs internes, le gène codant pour le 18S et celui codant pour RPL19, aucun gène interne n'étant bien précisément retenu dans la littérature pour le modèle embryon. En fonction des gènes rapporteurs internes utilisés pour la normalisation de l'expression des transcrits présents dans les embryons, nous avons vu que les conclusions sur l'effet des milieux de développement n'étaient pas toujours identiques. La double normalisation des données, par le 18S et par RPL19 a été conservée pour la suite de l'étude, ce qui nous a permis de tester ultérieurement une normalisation sur la moyenne géométrique de ces deux rapporteurs, tout comme proposé par ailleurs (Goossens et al., 2005 ; Murthi et al., 2008). Cette normalisation nous est apparue comme un bon pis-aller pour notre modèle, et à même été retenue pour la comparaison entre d'autres modèles, les modèles « ovocytes », « deux cellules », « 5-8 cellules », ou encore « morula ».

Même si la quantité d'amplicons entre deux échantillons peut être comparée après normalisation par rapport à la moyenne géométrique des deux gènes rapporteurs internes, il est préférable de minimiser, autant que faire se peut, la variabilité due à l'échantillonnage en le choisissant le plus homogène possible. Il est donc souhaitable de choisir des embryons à des stades de développement identiques. En plus, pour notre étude, avant toute analyse de transcrits, nous avons jugé qu'il était nécessaire d'estimer la variation du nombre de blastomères présents dans les embryons produits et ce, pour chacun des milieux de développement testés. Les résultats montrent qu'à stade de développement équivalent, le nombre de cellules peut être significativement plus élevé, notamment entre les lots d'embryons développés en présence de 5 et 10 % de sérum contre des embryons développés en coculture ou *in vivo*, et que bien sûr, du stade blastocyste aux stades blastocyste expansé et blastocyste éclos, le nombre de cellules augmente significativement pour tous les lots testés.

Dans toutes nos expériences, les embryons ont donc été sélectionnés en fonction de leur stade de développement et de leur diamètre pour minimiser la variabilité du nombre de cellules, même si les données ont été ensuite normalisées avec un rapporteur interne.

Ces mises au point techniques et méthodologiques réalisées, nous avons pu commencer à chercher des marqueurs géniques de la cryorésistance des embryons, notamment en relation avec le stockage des triglycérides et la fluidité membranaire.

2. Transcription du gène codant pour l'adipophiline et milieu environnemental

Chez les mammifères, plusieurs protéines sont connues pour s'associer spécifiquement aux gouttelettes lipidiques et contrôler l'utilisation des triglycérides, ce sont la périlipine, TIP47 et l'adipophiline. Nous avons étudié l'évolution de l'expression génique de cette dernière par RT-QPCR dans des blastocystes bovins produits *in vivo* et *in vitro,* soit avec ajout de sérum seul à 5 ou 10 % dans le milieu mSOF, soit avec ajout de sérum à 5 % et d'un acide gras polyinsaturé, le DHA (C22 :6) à 10 µM, soit en coculture sur tapis de cellules d'oviductes (Boec), soit dans des oviductes de brebis. Nous avons également fait un suivi de cette expression au cours de la maturation ovocytaire et durant tout le développement préimplantoire embryonnaire pour deux conditions de développement, avec ajout de sérum seul à 5 % et avec ajout de sérum à 5 % et de DHA à 10 µM.

La quantité relative de transcrits n'a pas varié en fonction du pourcentage de sérum ajouté dans le milieu de développement. Par contre, elle a été significativement plus faible dans les blastocystes produits *in vivo* et en coculture, comparée à celle des embryons produits dans le milieu supplémenté en sérum. Ce résultat indique que la présence de cellules dans le milieu de développement a dû modifier la composition du milieu mSOF enrichi en sérum pour se rapprocher de conditions de développement *in vivo*, qui s'est traduit par cette sous expression du gène à un niveau équivalent à celui des embryons *in vivo*. En effet, les cellules d'oviductes, tout comme d'autres types cellulaires, sont connues pour produire des protéines embryotrophes, comme des facteurs de croissance, qui pourraient réguler le développement et le métabolisme embryonnaire, et ainsi améliorer la viabilité des embryons. Cette variation de l'expression du gène codant pour l'adipophiline est en accord avec des résultats obtenus précédemment par HPLC qui soulignent la richesse en triglycérides des embryons produits *in vitro*, comparés à celle des *in vivo* (Charpigny et al., 2003), et également en accord avec une étude ultrastructurale de l'embryon indiquant la présence de très larges gouttelettes lipidiques dans des embryons *in vitro* (Abe et al., 1999). Le niveau d'expression des gènes codant pour

l'adipophiline pourrait donc être un marqueur spécifique de l'accumulation de triglycérides et, par voie de conséquence, de la cryotolérance des embryons bovins.

Les différences d'expression que nous avons obtenues avec les embryons développés dans les oviductes de brebis et ceux produits avec 10 % de sérum ne sont pas identiques en fonction du gène de ménage considéré et, si la moyenne géométrique des gènes rapporteurs est prise en compte, il n'y a plus de différence significative d'expression à cause notamment d'une grande variabilité entre les répliques expérimentales. Ce résultat paraît étrange, car les zygotes cultivés dans les oviductes de brebis devraient être dans des conditions environnementales très proches des vraies *in vivo* pour sous exprimer le gène codant pour l'adipophiline, par opposition au milieu *in vitro* enrichi en sérum. En effet, ces conditions de développement nous avaient permis auparavant d'obtenir, après gel et dégel, un taux de survie embryonnaire *in vivo* après transfert équivalent à celui obtenu pour des embryons *in vivo*. Avant toute conclusion hâtive sur l'expression du gène codant pour l'adipophiline, il serait prudent de refaire l'expérience. Nous voyons bien, encore avec cet exemple, la difficulté d'analyser des données de RT-QPCR et que la quantification relative du transcrit peut être vraiment très dépendante du ou des référentiels choisis.

Après ajout de DHA à 10 µM, l'expression du gène codant pour l'adipophiline n'a par contre pas été modifiée, aussi bien au stade blastocyste que pendant tout le développement embryonnaire. Il semblerait que cet acide gras à longue chaîne polyinsaturée n'ait pas les mêmes effets que l'isomère t10, c12 de l'acide linoléique conjugué, acide gras également polyinsaturé, mais pas de même degré d'insaturation et à plus courte chaîne carbonée. En effet, ajouté au milieu de développement, celui-ci permet de réduire l'indice lipidique dans les embryons bovins (Pereira et al., 2007) et d'améliorer le taux de survie des embryons *in vitro* (Hochi et al., 1999 ; Pereira et al., 2007). Le DHA ne pourrait peut-être pas agir sur le stockage des triglycérides. Dans une autre expérience, nous avons ajouté l'isomère t10, c12 de l'acide linoléique conjugué, et tout comme pour le DHA, nous n'avons pas obtenu de régulation de l'expression des ARNm de l'adipophiline. La réduction de l'indice lipidique obtenu par Peirera et al. (2007) doit passer par un autre mécanisme que celui de la régulation de l'expression du gène codant pour l'adipophiline au vu des résultats obtenus dans notre étude.

La cinétique d'expression du gène codant pour l'adipophiline pendant la maturation et le développement embryonnaire précoce montre clairement un effet du stade de développement. Après une baisse au stade ovocytes matures, nous avons observé des quantités de transcrits relativement importantes jusqu'au stade 5-8 cellules, et ensuite une

chute brutale jusqu'au stade blastocyste par comparaison avec la variation des ARNs des gènes rapporteurs. Cette observation dans les ovocytes est tout à fait en accord avec le niveau de triglycérides qui est rapporté dans la littérature. Cette quantité très importante de triglycérides, lipides majoritairement représentés dans l'ovocyte immature, constitue une réserve énergétique fondamentale pour le développement ultérieur de l'embryon. D'après notre étude sur l'expression génique, nous pouvons supposer que l'embryon ne stockerait pas exagérément plus de triglycérides à partir du stade morula, en comparaison du stade « ovocyte immature ». La richesse en triglycérides des embryons *in vitro* en présence de sérum ne viendrait pas d'une accumulation de nouveaux triglycérides à partir du sérum environnant, ni d'une synthèse de novo d'acides gras ou de triglycérides, comme le montrent les profils d'expression des gènes codant pour ACC et DGAT1, deux enzymes régulant la synthèse des acides gras et des triglycérides respectivement, qui chutent également à partir du stade morula comme pour les ARNm de l'adipophiline. Elle viendrait peut-être plus d'un manque de dégradation / utilisation des lipides présents dans l'ovocyte, et jusqu'au stade 5-8 cellules, comme l'indique la faible expression du gène codant pour CPT-II, enzyme catalysant la β-oxydation des lipides. Cette absence de dégradation / utilisation des triglycérides conduisant au maintien de leur accumulation pourrait être le résultat d'un blocage métabolique induit par un ou plusieurs composés du sérum, comme l'insuline, qui est connue pour inhiber la lipase et contrôler indirectement la β-oxydation via l'activation de l'acétyl-CoA carboxylase. D'autre part, l'insuline peut aussi activer la lipogenèse via l'activation transcriptionnelle de SREBP1, facteurs de transcription qui régule l'expression des gènes de la lipogenèse et que nous avons mis en évidence dans les embryons dès les premiers stades de développement embryonnaire, et même dans l'ovocyte. Il faut cependant rester prudent sur ces conclusions car ce ne sont que des résultats d'expression des gènes que nous avons et en aucun cas des résultats d'activité enzymatique. D'autre part, l'expression élevée du gène codant pour ACSL1 jusqu'au stade morula indique que l'embryon doit entre autre synthétiser des composés lipidiques complexes, mais autres que les triglycérides. A un stade du développement embryonnaire où l'accroissement des surfaces cellulaires est très important, ces composés pourraient être plutôt des lipides membranaires. Cette hypothèse reste à vérifier.

En conclusion de cette partie, nous pouvons dire, 1/ que le gène codant pour l'adipophiline est exprimé dans les ovocytes bovins immatures et matures, ainsi que dans les embryons, du stade 2 cellules au stade blastocyste et 2/ que le milieu coculture est le milieu *in vitro* qui mime le mieux la sous expression génique pour cette protéine qui a été observée avec le milieu *in vivo*, alors qu'une supplémentation en sérum l'augmente, comme observé

auparavant pour les teneurs en triglycérides. Par conséquent, l'expression du gène codant pour l'adipophiline pourrait donc être un marqueur spécifique de l'accumulation de triglycérides et, par voie de conséquence, de la cryorésistance d'embryons bovins.

3. Ajout d'acides gras polyinsaturés dans le milieu de culture, taux de développement embryonnaire et cryorésistance des embryons

Plusieurs études ont montré le bienfait d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés soit dans la ration alimentaire, DHA (C22 :6) et EPA (C20 :5), soit dans le milieu de maturation, EPA et acide arachidonique, ou encore dans le milieu de développement, l'isomère t10 c12 de l'acide linoléique conjugué (C18 :2), sur la cryorésistance des ovocytes et des embryons. Pour notre part, nous avons cherché à améliorer la qualité des embryons bovins produits *in vitro* en terme de survie embryonnaire après vitrification par OPS et réchauffement, en ajoutant dans le milieu de développement des acides gras très insaturés et à longue chaîne carbonée (C22 :6 ; C18 :3 et C18 :2), conjointement à un antioxydant, le β-mercaptoéthanol, et à voir un éventuel effet dose sur le taux de production d'embryons 7 et 8 jours après la fécondation *in vitro*.

L'ajout de 100 µM de β-mercaptoéthanol, seul, a significativement fait chuter le taux de blastocystes à J7 et J8, mais en contre partie, a largement amélioré le taux de survie *in vitro* des embryons J7. Ces effets bénéfiques sur le développement de l'embryon du β-mercaptoéthanol ajouté au milieu de culture *in vitro* ont déjà été signalés antérieurement dans la bibliographie (Feugang et al., 2004 ; Hashem et al., 2006). Ce composé chimique thiolé interagit directement avec certains radicaux oxydés et peut chélater les ions métalliques et ainsi protéger les cellules du stress oxydatif. Puisqu'il a été ajouté conjointement aux acides gras dans les milieux de développement pour notre étude, nous avons donc évalué l'effet cumulé de la supplémentation en acides gras et en β-mercaptoéthanol.

Pour les deux séries d'expériences, des taux de survie très élevés, de l'ordre de 70 à 85%, ont été obtenus pour les embryons produits dans le milieu de développement « témoin négatif », c'est-à-dire le milieu mSOF enrichi avec 5 % de sérum, et de l'ordre de 75 à 95% pour le milieu supplémenté en β-mercaptoéthanol sans acide gras. En outre, les taux de blastocystes à J7 et J8, et les taux de survie *in vitro* n'ont pas été affectés par l'ajout d'acides gras durant la culture d'embryons. Seule une diminution du taux de développement à J 7 après ajout de 10 µM C22: 6 et 100 µM C18:2, et une baisse du taux de survie des embryons après ajout de C22:6 et C18:2 à la dose de 100 µM ont été observées. Cette étude montre que l'ajout de 100 µM C18:2, 10 µM C18:3 ou 10 µM C22:6 couplé à un ajout de 100 µM β-

mercaptoéthanol pendant six jours dans le milieu de développement *in vitro* ne modifie par le taux de survie *in vitro* des embryons après vitrification et dégel. Comme le taux de survie des embryons « témoins négatifs » était très élevé, il est possible qu'un différentiel de survie *in vitro* n'ait pas pu être mis en évidence dans notre étude, à cause notamment de la technique de cryoconservation utilisée. En effet, dans l'étude de Pereira et al. (2007), l'amélioration du taux de survie d'embryons bovins développés dans un milieu enrichi en C18 :2 comparée au milieu enrichi en sérum seul a été obtenue en utilisant la technique de congélation lente, et non la vitrification. La vitrification réduit l'exposition des embryons aux gammes de température qui induisent les chocs thermiques responsables de la formation de cristaux de glace, des changements physiques des lipides très sensibles aux variations de température, et donc des dégâts cellulaires irréversibles. Il nous faudrait refaire cette expérience de survie embryonnaire en utilisant cette fois-ci la congélation lente avant de conclure sur l'effet de l'ajout de 100 µM C18:2, 10 µM C18:3 ou 10 µM C22:6 sur la survie *in vitro* des embryons bovins dans nos conditions de développement.

4. Ajout d'acides gras polyinsaturés dans le milieu de culture et variation de l'expression génique

Les acides gras polyinsaturés régulent l'expression de nombreux gènes en rapport avec le métabolisme lipidique par l'intermédiaire de facteurs de transcription ou d'autres médiateurs clés comme les récepteurs nucléaires et l'AMPKα. Rien n'était connu à ce jour sur ces mécanismes dans l'embryon bovin, alors que ces données peuvent être primordiales pour la compréhension des phénomènes biologiques et biophysiques, qui se déroulent dans les embryons produits *in vitro* et *in vivo*. Nous avons étudié les transcrits de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique pour des embryons bovins produits *in vitro* avec supplémentation d'acides gras polyinsaturés, 100 µM C18:2, 10 µM C18:3 et 10 µM C22:6 couplé à un ajout de 100 µM de β-mercaptoéthanol pendant six jour dans le milieu de développement. Deux milieux témoins de production ont été également testés, le milieu mSOF enrichi de 5 % de sérum seul ou avec en plus 100 µM de β-mercaptoéthanol. Nous avons également suivi la variation des quantités relatives de transcrits de ces mêmes gènes au cours de la maturation ovocytaire et durant tout le développement embryonnaire préimplantatoire pour deux conditions de développement, avec ajout de sérum seul à 5 % et avec ajout de 5 % de sérum ou avec en plus 10 µM de DHA (C22 :6). Des blastocystes produits *in vivo* ont également été analysés.

L'ensemble de ces deux expériences nous a permis de montrer qu'un ajout d'acides gras polyinsaturés dans le milieu de développement embryonnaire modifiait l'expression de plusieurs gènes du métabolisme lipidique, et ce dès le stade 5-8 cellules, et qu'en fonction de l'acide gras ajouté, la réponse expressionnelle variait. L'expression génique de SCD1, enzyme responsable de la désaturation du carbone 9, est régulée par un apport de DHA, mais pas par un apport de C18 :2 et de C18 :3. Cette différence pourrait être due à la longueur de la chaîne carbonée du DHA. En effet, l'expression génique de SCD1 est connue dans d'autres modèles, pour n'être régulée que par des AGPI ayant au moins 20 carbones. L'expression génique de FADS2, enzyme responsable de la désaturation du carbone 6, est régulée par un apport de 100 µM de C18 :2, et pas par des acides gras à plus longue chaîne carbonée, ni par de faibles concentrations (article 2), comme si un effet dose limitant existait pour les acides gras à plus courte chaîne. Cependant, dans la deuxième expérience (article 3), FADS2 est régulée par un apport de 10 µM de DHA. Ces résultats sont contradictoires. Ils peuvent peut-être s'expliquer par l'échantillonnage qui est différent entre les deux expériences, et donc une variabilité entre répliques qui a pu masquer la différence existant tout de même dans la première expérience. L'expression génique de SREBP1, médiateur transcriptionnel activant l'expression de gènes lipogéniques, est par contre modulée par l'ensemble des 3 AGPI ajoutés dans le milieu de développement des embryons.

Les modifications d'expression génique de SCD1 et de FADS2 induites par une supplémentation en AGPI doivent avoir un effet sur le ratio acides gras saturés / acides gras insaturés des embryons et contribuer aux modifications de fluidité membranaire et de cryorésistance. C'est peut-être par ce biais que les embryons produits en coculture, pour lesquels nous avons également observé une réduction de l'expression génique de SCD1, sont plus résistants au froid, comparés à des embryons produits dans un milieu enrichi en sérum, qui, lui, induit une accumulation d'acides gras saturés, acides palmitique et stéarique, moins favorables à la fluidité membranaire et donc moins favorables également à la cryorésistance des embryons. Les cellules d'oviductes sont en effet connues pour synthétiser de nombreux lipides, cholestérol, triglycérides, phospholipides, signe d'un métabolisme lipidique très actif dans ces cellules, qui pourraient être incorporés au niveau des membranes embryonnaires. De même, dans l'expérimentation de Pereira et al. (2007), l'ajout de l'isomère t10, c12 de l'acide linoléique conjugué a pu permettre une meilleure cryorésistance des embryons du fait d'une modification de ce même ratio acides gras saturés / acides gras insaturés comme le montre la variation d'expression génique de FADS2 que nous avons observée dans notre expérience après ajout du même acide gras dans le milieu de développement des embryons. L'apport

bénéfique de DHA et d'EPA dans l'alimentation sur la cryorésistance des ovocytes pourrait également passer par cette modification de la balance acides gras saturés / insaturés au niveau membranaire que nous avons mis en évidence par notre étude de transcrits.

Le niveau d'expression génique de SCD1 dans les embryons produits *in vivo* est significativement plus élevé que celui des embryons produits *in vitro* avec ajout de sérum. Ce résultat souligne l'importance que doit avoir la voie métabolique de désaturation des lipides dans l'embryon bovin produits *in vivo* qui doit être responsable, au moins pour partie, de la forte cryorésistance de ces embryons par augmentation du degré de désaturation des membranes assurant une meilleure fluidité. Ce résultat tend à démontrer, en plus de ceux obtenus avec supplémentation en DHA dans les milieux de développement embryonnaire, que la variation de l'expression génique de SCD1 pourrait être un bon marqueur de la résistance au froid des embryons bovins. Par contre, aucune différence n'a été observée avec FADS2, comme si l'étape principale ou chef d'orchestre de la désaturation était celle la plus en amont de cette voie métabolique.

Les variations conjointes de l'expression génique de SCD1, FADS2 et de SREBP1 indiquent que les modifications d'expression de ces deux derniers gènes, induites par une supplémentation en acides gras polyinsaturés, pourraient vraisemblablement être régulées par l'inhibition du facteur de transcription SREBP1, tout comme il est rapporté dans la littérature pour d'autres types cellulaires adultes, à partir d'acides gras à longue chaîne, au moins 18 carbones, et ayant au moins deux liaisons insaturées. Par exemple, le C18:1 (n-9) n'a pas d'effet sur la régulation de SREBP1 dans le foie (Xu et al., 1999). Dans notre modèle d'étude, les 3 acides gras ajoutés ont régulé l'expression génique de SREBP1. Tous les trois avaient au moins 18 carbones et deux liaisons insaturées. Ce facteur de transcription est détecté très tôt pendant le développement embryonnaire, et même dans l'ovocyte, alors que les transcrits de FADS2, et de SCD1 ne le sont vraiment qu'à partir du stade 5-8 cellules, au moment de la reprise du génome embryonnaire. Ce résultat indique que la régulation du métabolisme lipidique dans le modèle bovin peut se faire vraiment très précocement, les outils régulant ces voies étant en place.

En conclusion, cette étude montre que l'ajout de C18:2, C18:3 ou C22:6 pendant six jours dans le milieu de culture *in vitro* régule l'expression des ARNm de protéines impliquées dans le métabolisme des lipides des embryons bovins à J7-J8, comme SCD1 et FADS2, et ce, probablement via la régulation de SREBP1. Ce résultat est le signe d'une modification dans le ratio acides gras saturés / insaturés dans l'embryon bovin, qui pourrait sans aucun doute être en lien avec une modification de la perméabilité des membranes et par conséquence avoir une

incidence sur la cryoconservation des embryons, même si nous n'avons pas montré d'amélioration de la cryorésistance des embryons dans nos conditions expérimentales après ajout de ces acides gras. Pour le milieu coculture, un mécanisme identique est fortement probable, mais il reste à vérifier.

5. Ajout d'acides gras polyinsaturés dans le milieu de culture et phosphorylation de l'AMPKα

L'AMPKα joue un rôle très important dans le contrôle du métabolisme lipidique via la régulation du facteur de transcription SREBP1 dans le foie. Son activation par des acides gras polyinsaturés est notamment associée à une inhibition de l'expression d'ACC et de FAS. Nous nous sommes posé la question de savoir si les modifications d'expression de SREBP1 observées après ajout d'acides gras polyinsaturés pouvaient passer par ce médiateur. Nous avons donc produit des embryons *in vitro* dans deux conditions de développement, avec ajout de sérum seul à 5 % et avec ajout de sérum à 5 % et de DHA (C22 :6) à 10 µM. Nous n'avons observé aucun effet de la supplémentation en DHA dans le milieu de développement embryonnaire sur le niveau d'activité de l'AMPKα mesurée dans les embryons à J7 post fécondation. Cependant, nous ne pouvons pas conclure que l'AMPKα n'est pas impliquée dans l'effet du DHA sur l'expression de SREBP1. Il est possible qu'au stade blastocyste, aucune modification de l'activité de l'AMPKα n'existe alors qu'elle pourrait tout à fait être effective à des stades plus précoces du développement. Il faudrait donc compléter ces résultats par une mesure de l'activité de l'AMPKα sur des stades plus précoces de développement embryonnaire et par exemple utiliser des inhibiteurs spécifiques de son activité afin de déterminer le rôle de cette kinase dans la modification de l'expression des gènes induite par une supplémentation en DHA.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis d'améliorer les connaissances sur le métabolisme lipidique des embryons bovins préimplantatoires. Après un premier temps passé à mettre au point et valider les techniques de RT-QPCR sur le modèle « embryon bovin jour 7 post FIV », il a permis de mieux caractériser le profil d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (stockage, synthèse, désaturation et oxydation, figure 19) de l'embryon préimplantatoire bovin, et de voir dans quelle mesure ce profil était modifié en fonction des conditions de développement appliquées, embryons produits *in vitro* avec ajout de sérum exclusivement, ou avec en plus une supplémentation en acide gras essentiels insaturés, sur un tapis de cellules, et également *in vivo*. Il a permis de valider des marqueurs géniques de l'accumulation des triglycérides et de la fluidité membranaire. Il a également permis de démontrer que l'expression de SCD1 et FADS2 pouvait être régulée dès le stade 5-8 cellules par l'apport d'acides gras, via probablement SREBP1, déjà exprimés à ces stades de développement, et que l'accumulation de triglycérides ne serait peut-être pas due à une synthèse de novo d'acides gras et de triglycérides, mais plus à un manque de dégradation des réserves lipidiques existantes, par des voies qui restent encore à déterminer.

D'après nos propres résultats et nos recherches bibliographiques, nous avons pu mieux prendre conscience de l'importance de la nature des lipides ajoutés dans le milieu de développement des embryons, dans le milieu de maturation des ovocytes, et même dans la ration alimentaire, sur le profil d'expression génique et la cryorésistance des embryons. Il serait bon de prendre en compte ce paramètre dans les futurs arrivages d'ovaires, et de les trier en fonction de ce nouveau paramètre autant que faire se peut.

L'ensemble des résultats de ce travail de thèse soulève de nombreux points qui demandent à être éclaircis et approfondis lors de futurs travaux de recherche. Les investigations sur l'expression des gènes étudiés doivent être poursuivies, avec notamment une comparaison des profils d'expression aux différents stades de développement déjà étudiés mais pour une production *in vivo* pour mieux appréhender les différences entre embryons *vivo* et *vitro*. Les résultats de ces études doivent surtout être validés au niveau fonctionnel avec une étude quantitative traductionnelle par immuno-détection de l'adipophiline par exemple, protéine impliquée dans le stockage des triglycérides, et pour laquelle nous avons vu nettement une variation d'expression génique en fonction des milieux de développement. Une approche fonctionnelle a tout de même été réalisée dans cette thèse lors de l'étude de la

phosphorylation de l'AMPKα. Celle-ci demande à être complétée pour des stades de développement plus précoces, afin de voir si la régulation de l'expression de SCD1 et de FADS2 passerait par ce médiateur, via SREBP1, dans l'embryon bovin. La mesure de l'activité enzymatique de CPT-II et de SCD1 par radioactivité est une donnée qui semble nécessaire à acquérir. Elle permettrait de savoir si le stockage de triglycérides dans les embryons bovins produits *in vitro* peut être pour partie en relation avec une moindre activité mitochondriale du stade morula au stade blastocyste, et de vérifier si les embryons produits *in vivo* ont vraiment une activité de désaturation des lipides plus intense par rapport aux embryons produits *in vitro*, ce qui serait en lien direct avec la faible cryorésistance de ces derniers. La validation physiologique de nos résultats a été réalisée *in vitro* et *in vivo* après gel / dégel des embryons. Cependant, pour des raisons inconnues, il n'a pas été possible de valider les effets en l'occurrence du milieu coculture sur la cryorésistance des embryons après gel/ dégel et transfert *in vivo*. Ces expériences sont à reprogrammer, avec cette fois une cryoconservation des embryons par congélation lente pour mieux mettre en évidence l'éventuelle protection contre le « cold shock » que pourrait induire la coculture ou la supplémentation en acides gras, en fonction du milieu à tester choisi.

L'approche gènes candidats réalisée lors de cette thèse a été orientée vers certaines voies du métabolisme lipidique, stockage, synthèse, désaturation et oxydation, en fonction des quelques résultats qui étaient connus dans la bibliographie sur la teneur en lipides des embryons bovins et les différences de cryorésistance observées. Pour compléter cette approche, des gènes en relation avec le transport et la dégradation des lipides pourraient être étudiés. FAT (fatty acid translocase) qui aide au transport des acides gras à longue chaîne à travers la membrane plasmique, FATP (fatty acid transporter protein) ou FABPc (cytoplamic fatty acid binding protein) qui aident au transport des acides gras de la membrane plasmique vers les compartiments intracellulaires, et notamment la mitochondrie, pourraient être de bons candidats, tout comme LPL (lipoproteine-lipase) qui hydrolyse les triglycérides en acide gras, LIPE (lipase hormonosensible) qui catalyse la lipolyse adipocytaire, HTGL (hepatic TG lipase) qui régule la lipolyse. Il pourrait être envisagé de compléter l'approche réalisée sur l'oxydation mitochondriale en suivant le profil d'expression de facteurs de transcription entrant dans la biogenèse des mitochondries et des facteurs de réplication du génome mitochondrial, comme TFAM (transcription factor A mitochondrial) et PGC1α (co-activateur 1α des PPARs) qui joue un rôle clé de coordinateur du flux métabolique au niveau de la β-oxydation. Une accumulation excessive des triglycérides pourrait en effet être en lien direct

avec une sous expression de ces facteurs, et par conséquent aboutir à un disfonctionnement mitochondrial comme observé dans le muscle (Muoio and Koves, 2007).

Une approche transcriptomique globale, avec hybridation sur membranes ou sur lames de verre, prévue au début de cette thèse, mais non réalisée pour diverses raisons (matériels et techniques non disponibles en temps, existence de gènes candidats), pourrait de nouveau être envisagée, à présent que l'amplification d'ARN est possible à partir de très peu de matériel, comme c'est le cas pour les embryons au stade préimplantatoire. Cette approche permettrait d'avoir un profil général du transcriptome de ce modèle et donc un regard plus large sur d'autres voies métaboliques qui pourraient être impliquées dans le différentiel vivo / vitro observé. Par contre, c'est une approche 'méga' chère dixit Sylvain.

Une autre perspective de travail serait d'essayer d'ajouter les acides gras polyinsaturés, que nous avons testés pendant le développement, dès la maturation des ovocytes pour modifier encore plus tôt le métabolisme lipidique des futurs embryons, d'ajouter d'autres AGPI à longue chaîne que le DHA ajouté dans cette étude, par exemple l'acide arachidonique, acide gras qui est incorporé directement dans les phopholipides constitutifs des membranes, ce qui pourrait permettre d'améliorer la fluidité membranaire des embryons. Une étude a déjà montré les effets bénéfiques de l'acide arachidonique sur la cryorésistance des embryons après ajout dans le milieu de maturation (Marques et al., 2007). Enfin, la leptine, hormone peptidique qui inhibe la lipogenèse dans différents tissus en réprimant l'expression d'ACC et de SREBP-1c via l'AMPK et stimulant l'oxydation des acides gras, pourrait être un bon candidat pour essayer de favoriser la lipolyse des triglycérides stockés massivement dans l'embryon, dès les premiers stades de développement. Ajoutée au milieu de maturation, elle est déjà connue pour augmenter le pourcentage d'ovocytes compétents au développement et réduire le taux d'apoptose des blastocystes.

En complément des perspectives citées ci-dessus, une approche cartographique fonctionnelle du contenu lipidique des embryons par microscopie confocale couplée à un spectromètre de fluorescence et basée sur l'affinité polaire des lipides pourrait être une perspective d'étude intéressante pour visualiser les lipides présents dans l'embryon, comme cela est déjà fait pour des cellules isolées et des tissus biologiques après coloration. De plus, il serait possible de discriminer certaines classes de lipides, comme les triglycérides, les phospholipides et les esters de cholesterol en fonction de leur polarité, de faire une quantification relative de ceux-ci, et de les localiser. Cette approche aurait l'avantage de pouvoir faire des analyses sur des embryons unitaires, et de caractériser un lot de production d'embryons avant de prendre la décision de les transférer après cryoconservation.

L'ensemble des gènes étudiés dans cette thèse sur le modèle bovin pourrait être analysé sur deux autres modèles, l'embryon petit ruminant *in vitro*, ovin ou caprin, et l'embryon porcin *in vivo*. En effet, pour l'embryon ovin surtout et dans une moindre mesure l'embryon caprin, une accumulation de triglycérides et une diminution des phopholipides ont été également rapportées dans la littérature (Charpigny et al, 2000). Il serait intéressant de voir si les mêmes modifications et / ou régulations du métabolisme lipidique sont présentes dans ce modèle petit ruminant *in vitro* par rapport aux embryons *in vivo*. De la même façon, les embryons de porcs sont très riches en gouttelettes lipidiques, limitant énormément le succès de leur cryoconservation (Dobrinsky, 2001). Les mécanismes développés par l'embryon porcin *in vivo* pourraient-ils être identiques à ceux observés dans le modèle bovin *in vitro* ? Cette étude comparative pourrait être un élément clé supplémentaire à la meilleure compréhension du métabolisme lipidique de l'embryon, de sa régulation et de ses altérations.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abd El Razek, I.M., Charpigny, G., Kodja, S., Marquant-Le Guienne, B., Mermillod, P., Guyader-Joly, C., Humblot, P., 2000. Differences in lipid composition between in vivo- and in vitroproduced bovine embryos. Theriogenology 53, 346 abstract.

Abe, H., Hoshi, H., 2003. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. The Journal of reproduction and development 49, 193-202.

Abe, H., Otoi, T., Tachikawa, S., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H., 1999. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. Anat Embryol (Berl) 199, 519-527.

Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H., 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. Molecular reproduction and development 61, 57-66.

Adamiak, S.J., Mackie, K., Watt, R.G., Webb, R., Sinclair, K.D., 2005. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. Biology of reproduction 73, 918-926.

Adrian, J., Potus, J., Frangne, R., , 1999. La Science Alimentaire de A à Z, Lavoisier Tec & Doc ed, Paris.

Allen, K.G., Harris, M.A., 2001. The role of n-3 fatty acids in gestation and parturition. Exp Biol Med (Maywood) 226, 498-506.

Ambrose, D.J., Kastelic, J.P., Corbett, R., Pitney, P.A., Petit, H.V., Small, J.A., Zalkovic, P., 2006. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in alpha-linolenic acid. J. Dairy Sci. 89, 3066-3074.

Aoyagi, Y., Fukui, Y., Iwazumi, Y., Urakawa, M., Minegishi, Y., Ono, H., 1989. Effects of culture system on development of in vitro-fertilized bovine ova into blastocysts. Theriogenology 31, 168-168.

Aoyama, T., Peters, J.M., Iritani, N., Nakajima, T., Furihata, K., Hashimoto, T., Gonzalez, F.J., 1998. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). The Journal of biological chemistry 273, 5678-5684.

Awazawa, M., Ueki, K., Inabe, K., Yamauchi, T., Kaneko, K., Okazaki, Y., Bardeesy, N., Ohnishi, S., Nagai, R., Kadowaki, T., 2009. Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. 382, 51-56.

Balasubramanian, S., Son, W.J., Kumar, B.M., Ock, S.A., Yoo, J.G., Im, G.S., Choe, S.Y., Rho, G.J., 2007. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. Theriogenology 68, 265-275.

Barascu, A., Besson, P., Le Floch, O., Bougnoux, P., Jourdan, M.L., 2006. CDK1-cyclin B1 mediates the inhibition of proliferation induced by omega-3 fatty acids in MDA-MB-231 breast cancer cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. 38, 196-208.

Barcelo-Fimbres, M., Brink, Z., Seidel, G.E., Jr., 2009. Effects of phenazine ethosulfate during culture of bovine embryos on pregnancy rate, prenatal and postnatal development. Theriogenology 71, 355-368.

Barcelo-Fimbres, M., Seidel, G.E., Jr., 2007. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. Molecular reproduction and development 74, 1395-1405.

Baril, G., Cognie, Y., Pougnard, J.L., Leboeuf, B., Traldi, A.S., Guignot, F., Beckers, J.F., Mermillod, P., 2001a. Improvement of embryo cryopreservation and embryo transfer methods in small ruminants., . 8èmes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.

Baril, G., Traldi, A.L., Cognie, Y., Leboeuf, B., Beckers, J.F., Mermillod, P., 2001b. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. Theriogenology 56, 299-305.

Barnes, F.L., Eyestone, W.H., 1990. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. Theriogenology 33, 141-152.

Barnes, F.L., First, N.L., 1991. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. Molecular reproduction and development 29, 117-123.

Bavister, B.D., 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. Hum. Reprod. Update 1, 91-148.

Bell, R.M., Coleman, R.A., 1980. Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. Annual review of biochemistry 49, 459-487.

Berthelot, F., Martinat-Botte, F., Locatelli, A., Perreau, C., Terqui, M., 2000. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. Cryobiology 41, 116-124.

Berthelot, F., Martinat-Botte, F., Perreau, C., Terqui, M., 2001. Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage embryos with intact zona pellucida. Reprod. Nutr. Dev. 41, 267-272.

Berthelot, F., Martinat-Botté, F., Perreau C., Locatelli, A., Manceau, P., Venturi, E., Terqui, M., 2002. The use of an appropriate vitrification medium allows development of 30 % of cryopreserved blastocysts and their birth as live piglets. Pig News Inf, pp. 103-108.

Berthelot, F., Venturi, E., Cognie, J., Furstoss, V., Martinat-Botte, F., 2007. Development of OPS vitrified pig blastocysts: effects of size of the collected blastocysts, cryoprotectant concentration used for vitrification and number of blastocysts transferred. Theriogenology 68, 178-185.

Bettegowda, C., Foss, C.A., Cheong, I., Wang, Y., Diaz, L., Agrawal, N., Fox, J., Dick, J., Dang, L.H., Zhou, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Pomper, M.G., 2005. Imaging bacterial infections with radiolabeled 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 1145-1150.

Betteridge, K., 1989. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. Equine Vet. J 8 92-100.

Bi, Y., Cai, M., Liang, H., Sun, W., Li, X., Wang, C., Zhu, Y., Chen, X., Li, M., Weng, J., 2009. Increased carnitine palmitoyl transferase 1 expression and decreased sterol regulatory element-binding protein 1c expression are associated with reduced intramuscular triglyceride accumulation after insulin therapy in high-fat-diet and streptozotocin-induced diabetic rats. Metabolism 58, 779-786.

Bilby, T.R., Guzeloglu, A., MacLaren, L.A., Staples, C.R., Thatcher, W.W., 2006. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: II. Endometrial gene expression related to maintenance of pregnancy. J. Dairy Sci. 89, 3375-3385.

Bilodeau-Goeseels, S., Schultz, G.A., 1997. Changes in ribosomal ribonucleic acid content within in vitro-produced bovine embryos. Biology of reproduction 56, 1323-1329.

Bionaz, M., Loor, J.J., 2008. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. BMC Genomics 9, 366.

Blond, J.P., Henchiri, C., Bezard, J., 1989. Delta 6 and delta 5 desaturase activities in liver from obese Zucker rats at different ages. Lipids 24, 389-395.

Blondin, P., Coenen, K., Guilbault, L.A., Sirard, M.A., 1996. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. Theriogenology 46, 1191-1203.

Blondin, P., Sirard, M.A., 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Molecular reproduction and development 41, 54-62.

Boelhauve, M., Sinowatz, F., Wolf, E., Paula-Lopes, F.F., 2005. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. Biology of reproduction 73, 737-744.

Bongso, A., Ng, S.C., Fong, C.Y., Ratnam, S., 1991. Cocultures: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. Fertil. Steril. 56, 179-191.

Boni, R., Tosti, E., Roviello, S., Dale, B., 1999. Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. Biology of reproduction 61, 1050-1055.

Botham, K.M., Zheng, X., Napolitano, M., Avella, M., Cavallari, C., Rivabene, R., Bravo, E., 2003. The effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids delivered in chylomicron remnants on the transcription of genes regulating synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein by the liver: modulation by cellular oxidative state. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J 228, 143-151.

Brady, P.S., Ramsay, R.R., Brady, L.J., 1993. Regulation of the long-chain carnitine acyltransferases. FASEB J. 7, 1039-1044.

Branca, A., Gallus, M., Dattena, M., Cappai, P., 2000. Preliminary study of vitrification of goats embryos at different stage of development. 7th International Conference on Goats, Tours-Poitiers, France, 1032.

Brandt, J.M., Djouadi, F., Kelly, D.P., 1998. Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. The Journal of biological chemistry 273, 23786-23792.

Brasaemle, D.L., Barber, T., Wolins, N.E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E.J., Londos, C., 1997. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. J. Lipid Res. 38, 2249-2263.

Brasaemle, D.L., Dolios, G., Shapiro, L., Wang, R., 2004. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. The Journal of biological chemistry 279, 46835-46842.

Bretillon, L., Chardigny, J.M., Gregoire, S., Berdeaux, O., Sebedio, J.L., 1999. Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro. Lipids 34, 965-969.

Brindle, N.P., Zammit, V.A., Pogson, C.I., 1985. Regulation of carnitine palmitoyltransferase activity by malonyl-CoA in mitochondria from sheep liver, a tissue with a low capacity for fatty acid synthesis. Biochem. J. 232, 177-182.

Brown, A.J., Hutchings, C., Burke, J.F., Mayne, L.V., 1999. Targeted display: a new technique for the analysis of differential gene expression. Methods Enzymol. 303, 392-408.

Brown, M., Goldstein, JL.,, 1999. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. Proc Natl Acad Sci USA 96, 11041-11048.

Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell 89, 331-340.

Buechler, C., Ritter, M., Duong, C.Q., Orso, E., Kapinsky, M., Schmitz, G., 2001. Adipophilin is a sensitive marker for lipid loading in human blood monocytes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1532, 97-104.

Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocrinol. 25, 169-193.

Byrne, A.T., Southgate, J., Brison, D.R., Leese, H.J., 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. Journal of reproduction and fertility 117, 97-105.

Caamano, J.N., Ryoo, Z.Y., Thomas, J.A., Youngs, C.R., 1996. beta-mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine in vitro-matured/in vitro-fertilized embryos. Biology of reproduction 55, 1179-1184.

Camous, S., Kopecny, V., Flechon, J.E., 1986. Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo. Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization 58, 195-200.

Camp, H.S., Ren, D., Leff, T., 2002. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. Trends Mol. Med. 8, 442-447.

Cao, G., Beyer, T.P., Yang, X.P., Schmidt, R.J., Zhang, Y., Bensch, W.R., Kauffman, R.F., Gao, H., Ryan, T.P., Liang, Y., Eacho, P.I., Jiang, X.C., 2002. Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. The Journal of biological chemistry 277, 39561-39565.

Cao, G., Liang, Y., Broderick, C.L., Oldham, B.A., Beyer, T.P., Schmidt, R.J., Zhang, Y., Stayrook, K.R., Suen, C., Otto, K.A., Miller, A.R., Dai, J., Foxworthy, P., Gao, H., Ryan, T.P., Jiang, X.C., Burris, T.P., Eacho, P.I., Etgen, G.J., 2003. Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. The Journal of biological chemistry 278, 1131-1136.

Cases, S., Smith, S.J., Zheng, Y.W., Myers, H.M., Lear, S.R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welch, C.B., Lusis, A.J., Erickson, S.K., Farese, R.V., Jr., 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 13018-13023.

Cases, S., Stone, S.J., Zhou, P., Yen, E., Tow, B., Lardizabal, K.D., Voelker, T., Farese, R.V., Jr., 2001. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. The Journal of biological chemistry 276, 38870-38876.

Cerri, R.L., Juchem, S.O., Chebel, R.C., Rutigliano, H.M., Bruno, R.G., Galvao, K.N., Thatcher, W.W., Santos, J.E., 2009. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows. J. Dairy Sci. 92, 1520-1531.

Chanussot, B., Leclerc, J., Narce, M., Poisson, J.P., 2000. Depletion of delta 9 desaturase (EC 1.14.99.5) activity in lactating rat during protein restriction. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 62, 169-173.

Charpigny, G., Guesnet, P., Marquant-LeGuiene, B., Heyman, Y., Mermillod, P., Humblot, P., 2003. Fatty acid composition of triglycerides, phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines of bovine embryos. BRG 4, 159–172.

Charpigny, G., Marquent-Leguienne, B., Abd el Razek, I., Humblot, P., and Mermillod, P. (2000). Differences in fatty acids incorporation into lipids between in vivo and in vitro produced embryos from ruminant species. In "Proceedings of the 7th international Conference on Goats, Tours, France. Vol.2 (Eds L. Gruner and Y. Chebert.) p. 1034. (Institut de l'Elevage and INRA: Paris, France.) (Abstr.)

Charpigny, G., Reinaud, P., Tamby, J.P., Creminon, C., Guillomot, M., 1997. Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. Biology of reproduction 57, 1032-1040.

Chemineau, P., Procureur, R., Cognie, Y., Lefevre, P.C., Locatelli, A., Chupin, D., 1986. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue-infected goat herd without bluetongue transmission. Theriogenology 26, 279-290.

Chian, R.C., Chung, J.T., Niwa, K., Sirard, M.A., Downey, B.R., Tan, S.L., 2003. Reversible changes in protein phosphorylation during germinal vesicle breakdown and pronuclear formation in bovine oocytes in vitro. Zygote (Cambridge, England) 11, 119-129.

Childs, S., Carter, F., Lynch, C.O., Sreenan, J.M., Lonergan, P., Hennessy, A.A., Kenny, D.A., 2008. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). Theriogenology 70, 992-1003.

Chin, J., Chang, T.Y., 1982. Further characterization of a Chinese hamster ovary cell mutant requiring cholesterol and unsaturated fatty acid for growth. Biochemistry 21, 3196-3202.

Chinetti-Gbaguidi, G., Fruchart, J.C., Staels, B., 2005. Role of the PPAR family of nuclear receptors in the regulation of metabolic and cardiovascular homeostasis: new approaches to therapy. Curr. Opin. Pharmacol. 5, 177-183.

Chiu, H.C., Kovacs, A., Ford, D.A., Hsu, F.F., Garcia, R., Herrero, P., Saffitz, J.E., Schaffer, J.E., 2001. A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. The Journal of clinical investigation 107, 813-822.

Cho, S.R., Cho, S.K., Lee, S.L., Lee, H.J., Choe, S.Y., Rho, G.J., 2002. Enhanced cryosurvival of bovine blastocysts produced in vitro in serum-free medium. J. Assist. Reprod. Genet. 19, 487-492.

Choi, Y., Kim, Y.C., Han, Y.B., Park, Y., Pariza, M.W., Ntambi, J.M., 2000. The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. J. Nutr. 130, 1920-1924.

Chouinard, P.Y., Corneau, L., Butler, W.R., Chilliard, Y., Drackley, J.K., Bauman, D.E., 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. J Dairy Sci 84, 680-690.

Christon, R., Fernandez, Y., Cambon-Gros, C., Periquet, A., Deltour, P., Leger, C.L., Mitjavila, S., 1988. The effect of dietary essential fatty acid deficiency on the composition and properties of the liver microsomal membrane of rats. J. Nutr. 118, 1311-1318.

Clamp, A.G., Ladha, S., Clark, D.C., Grimble, R.F., Lund, E.K., 1997. The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. Lipids 32, 179-184.

Clandinin, M.T., Field, C.J., Hargreaves, K., Morson, L., Zsigmond, E., 1985. Role of diet fat in subcellular structure and function. Can. J. Physiol. Pharmacol. 63, 546-556.

Coenen, K., Massicotte, L., Sirard, M.A., 2004. Study of newly synthesized proteins during bovine oocyte maturation in vitro using image analysis of two-dimensional gel electrophoresis. Molecular reproduction and development 67, 313-322.

Cohen, P., Miyazaki, M., Socci, N.D., Hagge-Greenberg, A., Liedtke, W., Soukas, A.A., Sharma, R., Hudgins, L.C., Ntambi, J.M., Friedman, J.M., 2002. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. Science 297, 240-243.

Conroy, D.M., Stubbs, C.D., Belin, J., Pryor, C.L., Smith, A.D., 1986. The effects of dietary (n-3) fatty acid supplementation on lipid dynamics and composition in rat lymphocytes and liver microsomes. Biochimica et biophysica acta 861, 457-462.

Cooper, G.M., Hausman, R.E., 2003. A Molecular Approach. Sinauer Associates, Inc. Publishers. The cell.

Cooper, R.A., Strauss, J.F.,, 1984. Regulation of cell membrane cholesterol. Physiology of membrane fluidity. 1, 73-97.

Criado, M., Eibl, H., Barrantes, F.J., 1982. Effects of lipids on acetylcholine receptor. Essential need of cholesterol for maintenance of agonist-induced state transitions in lipid vesicles. Biochemistry 21, 3622-3629.

Crosier, A.E., Farin, P.W., Dykstra, M.J., Alexander, J.E., Farin, C.E., 2000. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. Biology of reproduction 62, 1459-1465.

Crosier, A.E., Farin, P.W., Dykstra, M.J., Alexander, J.E., Farin, C.E., 2001. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. Biology of reproduction 64, 1375-1385.

Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M., Anchordoguy, T.J., Drobnis, E., 1989. Lipid phase transitions measured in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy. Cryobiology 26, 76-84.

Dalen, K.T., Ulven, S.M., Bamberg, K., Gustafsson, J.A., Nebb, H.I., 2003. Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. The Journal of biological chemistry 278, 48283-48291.

Dattena, M., Accardo, C., Pilichi, S., Isachenko, V., Mara, L., Chessa, B., Cappai, P., 2004. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. Theriogenology 62, 481-493.

Dattena, M., Ptak, G., Loi, P., Cappai, P., 2000. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. Theriogenology 53, 1511-1519.

de A.Camargo, L.S., Powell, A.M., do Vale Filho, V.R., Wall, R.J., 2005. Comparison of gene expression in individual preimplantation bovine embryos produced by in vitro fertilisation or somatic cell nuclear transfer. Reproduction, fertility, and development 17, 487-496.

De La Fuente, R., O'Brien, M.J., Eppig, J.J., 1999. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. Human reproduction (Oxford, England) 14, 3060-3068.

De Sousa, P.A., Watson, A.J., Schultz, R.M., 1998. Transient expression of a translation initiation factor is conservatively associated with embryonic gene activation in murine and bovine embryos. Biology of reproduction 59, 969-977.

Dentin, R., Girard, J., Postic, C., 2005. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. Biochimie 87, 81-86.

Dieleman, S.J., Bevers, M.M., 1993. Folliculogenesis and oocyte maturation in superovulated cattle. Molecular reproduction and development 36, 271-273.

Diez, C., Heyman, Y., Le Bourhis, D., Guyader-Joly, C., Degrouard, J., Renard, J.P., 2001. Delipidating in vitro-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. Theriogenology 55, 923-936.

Dinnyés, A., Carolan, C., Lonergan, P., Massip, A., Mermillod, P., 1996. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviduct fluid. Theriogenology 46, 1425-1439.

Dobrinsky, J.R., 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. Theriogenology 45, 17-26.

Dobrinsky, J.R., Johnson, L.A., Rath, D., 1996. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. Biology of reproduction 55, 1069-1074.

Dobrinsky, J.R., 2001. Cryopreservation of swine embryos: a chilly past with a vitrifying future. Theriogenology 56, 1333-1344.

Doherty, A.S., Mann, M.R., Tremblay, K.D., Bartolomei, M.S., Schultz, R.M., 2000. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. Biol Reprod 62, 1526-1535.

Donnay, I., Faerge, I., Grondahl, C., Verhaeghe, B., Sayoud, H., Ponderato, N., Galli, C., Lazzari, G., 2004. Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. Theriogenology 62, 1093-1107.

Duplus, E., Forest, C., 2002. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? Biochem. Pharmacol. 64, 893-901.

Duranthon, V., Renard, J.P., 2001. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. Theriogenology 55, 1277-1289.

Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., Foufelle, F., 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. Biochimie 86, 839-848.

Edwards, P.A., Kennedy, M.A., Mak, P.A., 2002. LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. Vascul Pharmacol 38, 249-256.

Eisinger, D.P., Serrero, G., 1993. Structure of the gene encoding mouse adipose differentiation-related protein (ADRP). Genomics 16, 638-644.

El-Gayar, M., Holtz, W., 2001. Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. J. Anim. Sci. 79, 2436-2438.

El-Halawany, N., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Gilles, M., Tesfaye, D., Schellander, K., 2004. Quantitative expression analysis of blastocyst-derived gene transcripts in preimplantation developmental stages of in vitro-produced bovine embryos using real-time polymerase chain reaction technology. Reproduction, fertility, and development 16, 753-762.

Emery, R.S., Liesman, J.S., Herdt, T.H., 1992. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. J. Nutr. 122, 832-837.

Emmerson, P.J., Clark, M.J., Medzihradsky, F., Remmers, A.E., 1999. Membrane microviscosity modulates mu-opioid receptor conformational transitions and agonist efficacy. J Neurochem 73, 289-300.

Enright, B.P., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward, F.A., Yang, X., Boland, M.P., 2000. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. Theriogenology 54, 659-673.

Faas, F.H., Carter, W.J., 1980. Cytochrome P450 mediated drug metabolism in the streptozotocin diabetic rat. Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme 12, 706-707.

Fair, T., Gutierrez-Adan, A., Murphy, M., Rizos, D., Martin, F., Boland, M.P., Lonergan, P., 2004. Search for the bovine homolog of the murine ped gene and characterization of its messenger

RNA expression during bovine preimplantation development. Biology of reproduction 70, 488-494.

Fair, T., Hyttel, P., Greve, T., 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. Molecular reproduction and development 42, 437-442.

Fair, T., Lonergan, P., Dinnyes, A., Cottell, D.C., Hyttel, P., Ward, F.A., Boland, M.P., 2001. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. Molecular reproduction and development 58, 186-195.

Farkas, T., Csengeri, I., Majoros, F., Oláh, J., 1980. Metabolism of fatty acids in fish : III. Combined effect of environmental temperature and diet on formation and deposition of fatty acids in the carp, Cyprinus carpio Linnaeus 1758. Aquaculture 20, 29-40.

Fatehi, A.N., Zeinstra, E.C., Kooij, R.V., Colenbrander, B., Bevers, M.M., 2002. Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate. Theriogenology 57, 1347-1355.

Feng, H.L., Wen, X.H., Presser, S.C., 1996. Effect of different co-culture systems in early human embryo development. Human reproduction (Oxford, England) 11, 1525-1528.

Ferguson, E.M., Leese, H.J., 1999. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. Journal of reproduction and fertility 116, 373-378.

Feugang, J.M., de Roover, R., Moens, A., Leonard, S., Dessy, F., Donnay, I., 2004. Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. Theriogenology 61, 71-90.

Fink, L., Seeger, W., Ermert, L., Hanze, J., Stahl, U., Grimminger, F., Kummer, W., Bohle, R.M., 1998. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. Nat. Med. 4, 1329-1333.

Fissore, R.A., Kurokawa, M., Knott, J., Zhang, M., Smyth, J., 2002. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. Reproduction (Cambridge, England) 124, 745-754.

Foretz, M., Ancellin, N., Andreelli, F., Saintillan, Y., Grondin, P., Kahn, A., Thorens, B., Vaulont, S., Viollet, B., 2005. Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. Diabetes 54, 1331-1339.

Foretz, M., Pacot, C., Dugail, I., Lemarchand, P., Guichard, C., Le Liepvre, X., Berthelier-Lubrano, C., Spiegelman, B., Kim, J.B., Ferre, P., Foufelle, F., 1999. ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. Molecular and cellular biology 19, 3760-3768.

Fouladi-Nashta, A.A., Gutierrez, C.G., Gong, J.G., Garnsworthy, P.C., Webb, R., 2007. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. Biology of reproduction 77, 9-17.

Frei, R.E., Schultz, G.A., Church, R.B., 1989. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. Journal of reproduction and fertility 86, 637-641.

Frohnert, B.I., Hui, T.Y., Bernlohr, D.A., 1999. Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. The Journal of biological chemistry 274, 3970-3977.

Fujitani, Y., Kasai, K., Ohtani, S., Nishimura, K., Yamada, M., Utsumi, K., 1997. Effect of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro-produced bovine embryos. J Anim Sci 75, 483-489.

Gabler, N.K., Radcliffe, J.S., Spencer, J.D., Webel, D.M., Spurlock, M.E., 2009. Feeding long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids during gestation increases intestinal glucose absorption potentially via the acute activation of AMPK. The Journal of nutritional biochemistry 20, 17-25.

Gandolfi, F., Moor, R.M., 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. Journal of reproduction and fertility 81, 23-28.

Gao, J., Serrero, G., 1999. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. The Journal of biological chemistry 274, 16825-16830.

Gao, J., Ye, H., Serrero, G., 2000. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids. J Cell Physiol 182, 297-302.

Gardner, D.K., Lane, M., 2005. Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. Reproduction, fertility, and development 17, 361-370.

Garg, M.L., Snoswell, A.M., Sabine, J.R., 1986. Influence of dietary cholesterol on desaturase enzymes of rat liver microsomes. Progress in lipid research 25, 639-644.

Gargiulo, C.E., Stuhlsatz-Krouper, S.M., Schaffer, J.E., 1999. Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane. J. Lipid Res. 40, 881-892.

Gentile, L., Monti, M., Sebastiano, V., Merico, V., Nicolai, R., Calvani, M., Garagna, S., Redi, C.A., Zuccotti, M., 2004. Single-cell quantitative RT-PCR analysis of Cpt1b and Cpt2 gene expression in mouse antral oocytes and in preimplantation embryos. Cytogenetic and genome research 105, 215-221.

Gilde, A.J., van der Lee, K.A., Willemsen, P.H., Chinetti, G., van der Leij, F.R., van der Vusse, G.J., Staels, B., van Bilsen, M., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. Circ. Res. 92, 518-524.

Giron, M.D., Lara, A., Suarez, M.D., 1996. Short-term effects of dietary fats on the lipid composition and desaturase activities of rat liver microsomes. Biochemistry and molecular biology international 40, 843-851.

Gomez, E., Rodriguez, A., Munoz, M., Caamano, J.N., Hidalgo, C.O., Moran, E., Facal, N., Diez, C., 2008. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. Theriogenology 69, 1013-1021.

Goncalves, R.F., Staros, A.L., Killian, G.J., 2008. Oviductal fluid proteins associated with the bovine zona pellucida and the effect on in vitro sperm-egg binding, fertilization and embryo development. Reprod. Domest. Anim. 43, 720-729.

Goossens, K., Van Poucke, M., Van Soom, A., Vandesompele, J., Van Zeveren, A., Peelman, L.J., 2005. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. BMC Dev. Biol. 5, 27.

Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y., Ogawa, K., 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. Journal of reproduction and fertility 83, 753-758.

Granlund, L., Pedersen, J.I., Nebb, H.I., 2005. Impaired lipid accumulation by trans10, cis12 CLA during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. Biochimica et biophysica acta 1687, 11-22.

Griinari, J.M., Corl, B.A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V., Bauman, D.E., 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. The Journal of nutrition 130, 2285-2291.

Grippo, A.A., Anderson, S.H., Chapman, D.A., Henault, M.A., Killian, G.J., 1994. Cholesterol, phospholipid and phospholipase activity of ampullary and isthmic fluid from the bovine oviduct. Journal of reproduction and fertility 102, 87-93.

Grummer, R.R., Carroll, D.J., 1991. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. J. Anim. Sci. 69, 3838-3852.

Guerin, J.F., Nicollet, B., 1997. Interest of co-cultures for embryos obtained by in-vitro fertilization: a French collaborative study. Human reproduction (Oxford, England) 12, 1043-1046.

Guerin, P., El Mouatassim, S., Menezo, Y., 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum. Reprod. Update 7, 175-189.

Guignot, F., 2003. Le point sur la cryoconservation des embryons. dans Biotechnologies de la Reproduction:quoi de neuf. Association pour l'Etude de la Reproduction Animale, Maison-Alfort, France, pp. 77-88.

Guignot, F., Bouttier, A., Baril, G., Salvetti, P., Pignon, P., Beckers, J.F., Touze, J.L., Cognie, J., Traldi, A.S., Cognie, Y., Mermillod, P., 2006a. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. Theriogenology 66, 1004-1011.

Guignot, F., Poulin, N., Baril, G., Cognie, J., Bouttier, A., Beckers, J.F., Touze, A., Mermillod, P., 2006b. Improved in vivo survival rate of in vitro produced goat embryos after coculture with bovine oviductal cells and vitrification Renc. Rech. Ruminants 13.

Hagemann, L.J., 1999. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. Theriogenology 51, 449-459.

Hagemann, L.J., Beaumont, S.E., Berg, M., Donnison, M.J., Ledgard, A., Peterson, A.J., Schurmann, A., Tervit, H.R., 1999. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. Molecular reproduction and development 53, 451-458.

Haggarty, P., Wood, M., Ferguson, E., Hoad, G., Srikantharajah, A., Milne, E., Hamilton, M., Bhattacharya, S., 2006. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. Human reproduction (Oxford, England) 21, 766-773.

Hamm, M.W., Sekowski, A., Ephrat, R., 1988. Dietary fat ratios and liver plasma membrane lipid composition. Lipids 23, 829-833.

Hannah, V.C., Ou, J., Luong, A., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2001. Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. The Journal of biological chemistry 276, 4365-4372.

Hardy, R.W., Wickramasinghe, N.S., Ke, S.C., Wells, A., 1997. Fatty acids and breast cancer cell proliferation. Adv. Exp. Med. Biol. 422, 57-69.

Harper, K.M., Brackett, B.G., 1993. Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. Biology of reproduction 48, 409-416.

Hashem, A., Hossein, M.S., Woo, J.Y., Kim, S., Kim, J.H., Lee, S.H., Koo, O.J., Park, S.M., Lee, E.G., Kang, S.K., Lee, B.C., 2006. Effect of potassium simplex optimization medium and NCSU23 supplemented with beta-mercaptoethanol and amino acids of in vitro fertilized porcine embryos. J. Reprod. Dev. 52, 591-599.

Hasler, J.F., 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. Theriogenology 56, 1401-1415.

Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., McCauley, A.D., Mower, S.A., Neely, B., Shuey, L.S., Stokes, J.E., and , Trimmer, S.A., 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology 43, 141-152.

Haster, P.M., pratt and Martin, A., Georg, 1989. Organisation and assembly of the surface membrane during early cleavage of the mouse embryo Roux Arch Develop Biol 193, 170-178.

Hawkins, D.E., Niswender, K.D., Oss, G.M., Moeller, C.L., Odde, K.G., Sawyer, H.R., Niswender, G.D., 1995. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. J. Anim. Sci. 73, 541-545.

Hazel, J.R., Sellner, P.A., 1979. Fatty acid and sterol synthesis by hepatocytes of thermally acclimated rainbow trout (Salmo gairdneri). J Exp Zool 209, 105-114.

Heid, H.W., Moll, R., Schwetlick, I., Rackwitz, H.R., Keenan, T.W., 1998. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. Cell Tissue Res. 294, 309-321.

Henault, M.A., Killian, G.J., 1993a. Composition and morphology of lipid droplets from oviduct epithelial cells. Anat. Rec. 237, 466-474.

Henault, M.A., Killian, G.J., 1993b. Synthesis and secretion of lipids by bovine oviduct mucosal explants. Journal of reproduction and fertility 98, 431-438.

Hendriksen, P.J., Vos, P.L., Steenweg, W.N., Bevers, M.M., Dieleman, S.J., 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. Theriogenology 53, 11-20.

Hennen, G., 1995. Biochimie 1er cycle, Dunod: , Paris.

Heyman, Y., Joly, T., 2002. Newsletter AETE.

Hochi, S., Kimura, K., Hanada, A., 1999. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. Theriogenology 52, 497-504.

Hocquette, J.F., Bauchart, D., 1999. Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. Reprod. Nutr. Dev. 39, 27-48.

Holm, P., Booth, P.J., Callesen, H., 2002. Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. Reproduction (Cambridge, England) 123, 553-565.

Holm, P., Booth, P.J., Schmidt, M.H., 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.

Holm, P., Shukri, N.N., Vajta, G., Booth, P., Bendixen, C., Callesen, H., 1998. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. Theriogenology 50, 1285-1299.

Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. The Journal of clinical investigation 109, 1125-1131.

Hoshi, H., 2003. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. Theriogenology 59, 675-685.

Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T., 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology 47, 23-32.

Hyttel, P., Laurincik, J., Viuff, D., Fair, T., Zakhartchenko, V., Rosenkranz, C., Avery, B., Rath, D., Niemann, H., Thomsen, P.D., Schellander, K., Callesen, H., Wolf, E., Ochs, R.L., Greve, T., 2000. Activation of ribosomal RNA genes in preimplantation cattle and swine embryos. Anim. Reprod. Sci. 60-61, 49-60.

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. Journal of reproduction and fertility 108, 263-270.

Hyttel, P., Viuff, D., Fair, T., Laurincik, J., Thomsen, P.D., Callesen, H., Vos, P.L., Hendriksen, P.J., Dieleman, S.J., Schellander, K., Besenfelder, U., Greve, T., 2001. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. Reproduction (Cambridge, England) 122, 21-30.

Ikeda, I., Cha, J.Y., Yanagita, T., Nakatani, N., Oogami, K., Imaizumi, K., Yazawa, K., 1998. Effects of dietary alpha-linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in rats. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 62, 675-680.

Ikeda, S., Miyazaki, H., Nakatani, T., Kai, Y., Kamei, Y., Miura, S., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., 2002. Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training. Biochem. Biophys. Res. Commun. 296, 395-400.

Imai, K., Matoba, S., Dochi, O., Shimohira, I., 2002. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryo. J. Vet. Med. Sci. 64, 887-891.

Imamura, M., Inoguchi, T., Ikuyama, S., Taniguchi, S., Kobayashi, K., Nakashima, N., Nawata, H., 2002. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 283, E775-783.

Isachenko, V., Folch, J., Isachenko, E., Nawroth, F., Krivokharchenko, A., Vajta, G., Dattena, M., Alabart, J.L., 2003. Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. Theriogenology 60, 445-452.

Iwasaki, S., Yoshiba, N., Ushijima, H., Watanabe, S., Nakahara, T., 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. Journal of reproduction and fertility 90, 279-284.

Jeffcoat, R., James, A.T., 1984. The regulation of desaturation and elongation of fatty acids in mammals. Elsevier science publishers B.V. 7, 85-112.

Jiang, H.P., Serrero, G., 1992a. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, 7856-7860.

Johnson, M.H., Nasr-Esfahani, M.H., 1994. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? BioEssays 16, 31-38.

Jones, K.T., Whittingham, D.G., 1996. A comparison of sperm- and IP3-induced Ca2+ release in activated and aging mouse oocytes. Developmental biology 178, 229-237.

Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Patel, P.H., Watson, M.A., Matsukuma, K.E., Walczak, R., Collins, J.L., Osborne, T.F., Tontonoz, P., 2002. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. The Journal of biological chemistry 277, 11019-11025.

Joshi, V.C., Aranda, L.P., 1979. Hormonal regulation of the terminal enzyme of microsomal stearoyl coenzyme A desaturase in cultured avian liver explants. Role of insulin. The Journal of biological chemistry 254, 11779-11782.

Jump, D.B., 2002. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. Curr. Opin. Lipidol. 13, 155-164.

Kakuma, T., Lee, Y., Higa, M., Wang, Z., Pan, W., Shimomura, I., Unger, R.H., 2000. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and

pancreatic islets. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 8536-8541.

Kanka, J., Kepková, K., Nemcová, L., 2009. Gene expression during minor genome activation in preimplantation bovine development. Theriogenology 72, 572-583.

Kastrop, P.M., Bevers, M.M., Destree, O.H., Kruip, T.A., 1990. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. Journal of reproduction and fertility 90, 305-310.

Kastrop, P.M., Bevers, M.M., Destree, O.H., Kruip, T.A., 1991. Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in vivo. Molecular reproduction and development 29, 271-275.

Katz-Jaffe, M.G., McCallie, B.R., Preis, K.A., Filipovits, J., Gardner, D.K., 2009. Transcriptome analysis of in vivo and in vitro matured bovine MII oocytes. Theriogenology 71, 939-946.

Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T., Uyeda, K., 2002. Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. The Journal of biological chemistry 277, 3829-3835.

Kawashima, Y., Hanioka, N., Matsumura, M., Kozuka, H., 1983. Induction of microsomal stearoyl-CoA desaturation by the administration of various peroxisome proliferators. Biochimica et biophysica acta 752, 259-264.

Kay, J.K., Mackle, T.R., Auldist, M.J., Thomson, N.A., Bauman, D.E., 2004. Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. J Dairy Sci 87, 369-378.

Kennedy, S.R., Leaver, M.J., Campbell, P.J., Zheng, X., Dick, J.R., Tocher, D.R., 2006. Influence of dietary oil content and conjugated linoleic acid (CLA) on lipid metabolism enzyme activities and gene expression in tissues of Atlantic salmon (Salmo salar L.). Lipids 41, 423-436.

Khurana, N.K., Niemann, H., 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. Biology of reproduction 62, 847-856.

Kim, E.K., Miller, I., Aja, S., Landree, L.E., Pinn, M., McFadden, J., Kuhajda, F.P., Moran, T.H., Ronnett, G.V., 2004a. C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. The Journal of biological chemistry 279, 19970-19976.

Kim, H.J., Takahashi, M., Ezaki, O., 1999. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. The Journal of biological chemistry 274, 25892-25898.

Kim, J.Y., Kinoshita, M., Ohnishi, M., Fukui, Y., 2001. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. Reproduction (Cambridge, England) 122, 131-138.

Kim, M.S., Park, J.Y., Namkoong, C., Jang, P.G., Ryu, J.W., Song, H.S., Yun, J.Y., Namgoong, I.S., Ha, J., Park, I.S., Lee, I.K., Viollet, B., Youn, J.H., Lee, H.K., Lee, K.U., 2004b. Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. Nat. Med. 10, 727-733.

Kimura, Y., Tateno, H., Handel, M.A., Yanagimachi, R., 1998. Factors affecting meiotic and developmental competence of primary spermatocyte nuclei injected into mouse oocytes. Biology of reproduction 59, 871-877.

Kinsella, J.E., 1990. Lipids, membrane receptors, and enzymes: effects of dietary fatty acids. JPEN J Parenter Enteral Nutr 14, 200S-217S.

Kothapalli, K.S., Anthony, J.C., Pan, B.S., Hsieh, A.T., Nathanielsz, P.W., Brenna, J.T., 2007. Differential cerebral cortex transcriptomes of baboon neonates consuming moderate and high docosahexaenoic acid formulas. PloS one 2, e370.

Kuwayama, M., Vajta, G., Ieda, S., Kato, O., 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. Reproductive biomedicine online 11, 608-614.

Kuzan, F.B., Wright, R.W., Jr., 1981. Coculture of bovine embryos with bovine fibroblasts. Theriogenology 15, 115.

Lammoglia, M.A., Willard, S.T., Oldham, J.R., Randel, R.D., 1996. Effects of dietary fat and season on steroid hormonal profiles before parturition and on hormonal, cholesterol, triglycerides, follicular patterns, and postpartum reproduction in Brahman cows. J. Anim. Sci. 74, 2253-2262.

Lane, M., Bavister, B.D., Lyons, E.A., Forest, K.T., 1999. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. Nat. Biotechnol. 17, 1234-1236.

Lane, M.W., Ahern, T.J., Lewis, I.M., Gardner, D.K., Peura, T.T., 1998. Cryopreservation and direct transfer of in vitro produced bovine embryos: A comparison between vitrification and slow-freezing. Theriogenology 49, 170-170.

Larigauderie, G., Furman, C., Jaye, M., Lasselin, C., Copin, C., Fruchart, J.C., Castro, G., Rouis, M., 2004. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24, 504-510.

Latham, K.E., Garrels, J.I., Chang, C., Solter, D., 1991. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. Development (Cambridge, England) 112, 921-932.

Laurincik, J., Thomsen, P.D., Hay-Schmidt, A., Avery, B., Greve, T., Ochs, R.L., Hyttel, P., 2000. Nucleolar proteins and nuclear ultrastructure in preimplantation bovine embryos produced in vitro. Biology of reproduction 62, 1024-1032.

Lee, Y.L., Lee, K.F., Xu, J.S., He, Q.Y., Chiu, J.F., Lee, W.M., Luk, J.M., Yeung, W.S., 2004. The embryotrophic activity of oviductal cell-derived complement C3b and iC3b, a novel function of complement protein in reproduction. The Journal of biological chemistry 279, 12763-12768.

Lefevre, P., Diot, C., Legrand, P., Douaire, M., 1999. Hormonal regulation of stearoyl coenzyme-A desaturase 1 activity and gene expression in primary cultures of chicken hepatocytes. Arch. Biochem. Biophys. 368, 329-337.

Lefevre, P., Tripon, E., Plumelet, C., Douaire, M., Diot, C., 2001. Effects of polyunsaturated fatty acids and clofibrate on chicken stearoyl-coA desaturase 1 gene expression. Biochem. Biophys. Res. Commun. 280, 25-31.

Leibo, S.P., 2008. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. Theriogenology 69, 37-47.

Leibo, S.P., Loskutoff, N.M., 1993a. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. Theriogenology 39, 81-94.

Leibo, S.P., Loskutoff, N.M., 1993b. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. Theriogenology 39, 81-94.

Leibo, S.P., Pollard, J.W., Martino, A., 1995. Chilling and freezing sensitivity of “reassembled” in vitro-derived bovine embryos Theriogenology 43, 265.

Lequarre, A.S., Traverso, J.M., 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. Biology of reproduction 71, 425-431.

Lequarre, A.S., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbies-Tran, R., Callesen, H., Mermillod, P., 2005. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. Theriogenology 63, 841-859.

Leroy, J.L., Genicot, G., Donnay, I., Van Soom, A., 2005a. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with nile red: a practical approach. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene 40, 76-78.

Leroy, J.L., Vanholder, T., Delanghe, J.R., Opsomer, G., Van Soom, A., Bols, P.E., Dewulf, J., de Kruif, A., 2004. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. Theriogenology 62, 1131-1143.

Leroy, J.L., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A., Opsomer, G., de Kruif, A., Genicot, G., Van Soom, A., 2005b. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. Reproduction (Cambridge, England) 130, 485-495.

Letexier, D., Pinteur, C., Large, V., Frering, V., Beylot, M., 2003. Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. J. Lipid Res. 44, 2127-2134.

Leung, D.W., 2001. The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases. Front. Biosci. 6, D944-953.

Li, R., Cameron, A.W., Batt, P.A., Trounson, A.O., 1990. Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. Reproduction, fertility, and development 2, 345-350.

Lobaccaro, J.M., Repa, J.J., Lu, T.T., Caira, F., Henry-Berger, J., Volle, D.H., Mangelsdorf, D.J., 2001. [Regulation of lipid metabolism by the orphan nuclear receptors]. Ann Endocrinol (Paris) 62, 239-247.

Lonergan, P., Carolan, C., Van Langendonckt, A., Donnay, I., Khatir, H., Mermillod, P., 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. Biology of reproduction 54, 1420-1429.

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

Lonergan, P., Gutierrez-Adan, A., Rizos, D., Pintado, B., de la Fuente, J., Boland, M.P., 2003a. Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. Molecular reproduction and development 66, 297-305.

Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P., Gordon, I., 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. Molecular reproduction and development 37, 48-53.

Lonergan, P., Pedersen, H.G., Rizos, D., Greve, T., Thomsen, P.D., Fair, T., Evans, A., Boland, M.P., 2004. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. Biol Reprod 71, 1096-1100.

Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., Boland, M.P., 2003b. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. Reprod Domest Anim 38, 259-267.

Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Moreira, P.M., Pintado, B., de la Fuente, J., Boland, M.P., 2003c. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. Biology of reproduction 69, 1424-1431.

Loor, J.J., Lin, X., Herbein, J.H. : , 2001. Alterations in blood plasma and milk fatty acid profiles of lactating Holstein cows in response to ruminal infusion of a conjugated linoleic acid mixture. Anim. Res. 50, 463-476.

Luciano, A.M., Lodde, V., Beretta, M.S., Colleoni, S., Lauria, A., Modina, 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. Molecular reproduction and development 71, 389-397.

Lucy, M.C., Staples, C.R., Michel, F.M., Thatcher, W.W., Bolt, D.J., 1991. Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin F2 alpha, luteinizing hormone, and follicular growth. J. Dairy Sci. 74, 483-489.

Mahfouz, M.M., Smith, T.L., Kummerow, F.A., 1984. Effect of dietary fats on desaturase activities and the biosynthesis of fatty acids in rat-liver microsomes. Lipids 19, 214-222.

Majerus, V., Lequarre, A.S., Ferguson, E.M., Kaidi, S., Massip, A., Dessy, F., Donnay, I., 2000. Characterization of embryos derived from calf oocytes: kinetics of cleavage, cell allocation to inner cell mass, and trophectoderm and lipid metabolism. Molecular reproduction and development 57, 346-352.

Mannaerts, B.M.J.L., 1986. Cytological parameters for rating bovine embryo quality. . Cur. Top. Vet. Med. Anim. Sci 34, 216-222.

Marquant-Le Guienne, B., Gerard, M., Solari, A., Thibault, C., 1989. In vitro culture of bovine egg fertilized either in vivo or in vitro. Reprod. Nutr. Dev. 29, 559-568.

Marques, C., Baptista, M., Vasques, M., Horta, A., Pereira, R., 2007. Effect of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on bovine oocyte in vitro maturation and subsequent embryo development and freezability. Reprod Dom Anim 42, 108–109.

Marszalek, J.R., Kitidis, C., Dararutana, A., Lodish, H.F., 2004. Acyl-CoA synthetase 2 overexpression enhances fatty acid internalization and neurite outgrowth. The Journal of biological chemistry 279, 23882-23891.

Marszalek, J.R., Kitidis, C., Dirusso, C.C., Lodish, H.F., 2005. Long-chain acyl-CoA synthetase 6 preferentially promotes DHA metabolism. The Journal of biological chemistry 280, 10817-10826.

Martin, G., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Staels, B., Auwerx, J., 1997. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. The Journal of biological chemistry 272, 28210-28217.

Martínez, A.G., Brogliatti, G.M., Valcarcel, A., de las Heras, M.A., 2002. Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: a field trial. Theriogenology 58, 963-972.

Martinez, A.G., Valcarcel, A., de las Heras, M.A., de Matos, D.G., Furnus, C., Brogliatti, G., 2002. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. Anim. Reprod. Sci. 73, 11-21.

Martínez, A.G., Valcárcel, A., Furnus, C.C., de Matos, D.G., Iorio, G., de las Heras, M.A., 2006. Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. Small Ruminant Res. 63, 288-296.

Martino, A., Pollard, J.W., Leibo, S.P., 1996. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. Mol Reprod Dev 45, 503-512.

Marx, N., Duez, H., Fruchart, J.C., Staels, B., 2004. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. Circ. Res. 94, 1168-1178.

Mashek, D.G., Li, L.O., Coleman, R.A., 2006. Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. J. Lipid Res. 47, 2004-2010.

Massip, A., 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. Reprod. Domest. Anim. 36, 49-55.

Massip, A., 2003. Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. Reprod. Nutr. Dev. 43, 325-330.

Massip, A., Mermillod, P., Dinnyes, A., 1995. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. Human reproduction (Oxford, England) 10, 3004-3011.

Massip, A., Mermillod, P., Wils, C., Dessy, F., 1993. Effects of dilution procedure and culture conditions after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced in vitro. Journal of reproduction and fertility 97, 65-69.

Masui, Y., 1972. Hormonal and cytoplasmic control of the maturation of frog oocytes. The Soviet journal of developmental biology 3, 484-495.

Masui, Y., 2001. From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). Differentiation 69, 1-17.

Mattos, R., Staples, C.R., Thatcher, W.W., 2000. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. Rev Reprod 5, 38-45.

McEvoy, T.G., Coull, G.D., Broadbent, P.J., Hutchinson, J.S., Speake, B.K., 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. Journal of reproduction and fertility 118, 163-170.

McGarry, J.D., Brown, N.F., 1997. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. European journal of biochemistry / FEBS 244, 1-14.

Mead, J.F., 1984. The non-eicosanoid functions of the essential fatty acids. J. Lipid Res. 25, 1517-1521.

Memili, E., Dominko, T., First, N.L., 1998. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. Molecular reproduction and development 51, 36-41.

Memili, E., First, N.L., 1999. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. Biology of reproduction 61, 1198-1207.

Memili, E., First, N.L., 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. Zygote (Cambridge, England) 8, 87-96.

Men, H., Agca, Y., Riley, L.K., Critser, J.K., 2006. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. Theriogenology 66, 2008-2016.

Menck, M.C., Guyader-Joly, C., Peynot, N., Le Bourhis, D., Lobo, R.B., Renard, J.P., Heyman, Y., 1997. Beneficial effects of Vero cells for developing IVF bovine eggs in two different coculture systems. Reprod. Nutr. Dev. 37, 141-150.

Menezo, Y., Guerin, P., 1997. The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 73, 99-104.

Menezo, Y., Renard, J.P., Delobel, B., Pageaux, J.F., 1982. Kinetic study of fatty acid composition of day 7 to day 14 cow embryos. Biology of reproduction 26, 787-790.

Menezo, Y.J., Guerin, J.F., Czyba, J.C., 1990. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. Biology of reproduction 42, 301-306.

Mermillod, P., Mourmeaux, J.L., Wils, C., Massip, A., Dessy, F., 1992. Protein-free oviduct-conditioned medium for complete bovine embryo development. Vet Rec 130, 13.

Mermillod, P., Traldi, A., Baril , G., Beckers, J., Massip, A., Cognie´, Y., 1997. Avitrification method for direct transfer of sheep embryos. Proceedings of the 15th science meeting on European embryo transfer association, p. 212 [abstract].

Mermillod, P., Traldi, A.L., Baril, G., Beckers, J.F., Massip, A., Cognié, Y., 1999. A vitrification method for direct transfer of sheep embryos. 15e Colloque Scientifique de l'AETE, Lyon, 212.

Mermillod, P., Vansteenbrugge, A., Wils, C., Mourmeaux, J.L., Massip, A., Dessy, F., 1993. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. Biology of reproduction 49, 582-587.

Merton, S., 2008. 24th Annual Meeting A.E.T.E. - PAU, France, 12th -13th September 2008. In: Brem, G. (Ed.), 24ème COLLOQUE SCIENTIFIQUE, 24th SCIENTIFIC MEETING, PAU, France.

Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J.P., Chatterjee, V.K., Glass, C.K., Gonzalez, F.J., Grimaldi, P.A., Kadowaki, T., Lazar, M.A., O'Rahilly, S., Palmer, C.N., Plutzky, J., Reddy, J.K., Spiegelman, B.M., Staels, B., Wahli, W., 2006. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. Pharmacol. Rev. 58, 726-741.

Miller, D.J., Eckert, J.J., Lazzari, G., Duranthon-Richoux, V., Sreenan, J., Morris, D., Galli, C., Renard, J.P., Fleming, T.P., 2003. Tight junction messenger RNA expression levels in bovine embryos are dependent upon the ability to compact and in vitro culture methods. Biology of reproduction 68, 1394-1402.

Mimouni, V., Poisson, J.P., 1992. Altered desaturase activities and fatty acid composition in liver microsomes of spontaneously diabetic Wistar BB rat. Biochimica et biophysica acta 1123, 296-302.

Minokoshi, Y., Kim, Y.B., Peroni, O.D., Fryer, L.G., Muller, C., Carling, D., Kahn, B.B., 2002. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nature 415, 339-343.

Misirlioglu, M., Page, G.P., Sagirkaya, H., Kaya, A., Parrish, J.J., First, N.L., Memili, E., 2006. Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 18905-18910.

Mohan, M., Hurst, A.G., Malayer, J.R., 2004. Global gene expression analysis comparing bovine blastocysts flushed on day 7 or produced in vitro. Molecular reproduction and development 68, 288-298.

Morash, A.J., Bureau, D.P., McClelland, G.B., 2009. Effects of dietary fatty acid composition on the regulation of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 152, 85-93.

Mukaida, T., Nakamura, S., Tomiyama, T., Wada, S., Oka, C., Kasai, M., Takahashi, K., 2003. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. Human reproduction (Oxford, England) 18, 384-391.

Murthi, P., Fitzpatrick, E., Borg, A.J., Donath, S., Brennecke, S.P., Kalionis, B., 2008. GAPDH, 18S rRNA and YWHAZ are suitable endogenous reference genes for relative gene expression studies in placental tissues from human idiopathic fetal growth restriction. Placenta 29, 798-801.

Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashman, R.J., Grupen, C.G., Nottle, M.B., 1995. Cryopreservation of porcine embryos. Nature 374, 416.

Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashman, R.J., Grupen, C.G., Seamark, R.F., Nottle, M.B., 1994. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. Biology of reproduction 51, 618-622.

Natale, D.R., De Sousa, P.A., Westhusin, M.E., Watson, A.J., 2001. Sensitivity of bovine blastocyst gene expression patterns to culture environments assessed by differential display RT-PCR. Reproduction 122, 687-693.

Natale, D.R., Kidder, G.M., Westhusin, M.E., Watson, A.J., 2000. Assessment by differential display-RT-PCR of mRNA transcript transitions and alpha-amanitin sensitivity during bovine preattachment development. Molecular reproduction and development 55, 152-163.

Naudet, M., 1992. Principaux constituants des corps gras. In Manuels des Corps Gras, Lavoisier Tec & Doc, Paris.

Nibart, M., Thibier, M., 1987. In Merieux Editions, 3ème réunion AETE, Lyon, 27-39. In: Editions, I.M. (Ed.), 3ème réunion AETE, Lyon, France, pp. 27-39.

Niemann, H., 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. Theriogenology 35, 109-124.

Niemann, H., Wrenzycki, C., 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. Theriogenology 53, 21-34.

Ntambi, J.M., 1999. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. J. Lipid Res. 40, 1549-1558.

Oghalai, J.S., Zhao, H.B., Kutz, J.W., Brownell, W.E., 2000. Voltage- and tension-dependent lipid mobility in the outer hair cell plasma membrane. Science 287, 658-661.

Ory, D.S., 2004. Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home? Circ. Res. 95, 660-670.

Oshino, N., Sato, R., 1972. The dietary control of the microsomal stearyl CoA desaturation enzyme system in rat liver. Archives of biochemistry and biophysics 149, 369-377.

Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikawa, S., Murakami, M., Kikkawa, Y., Suzuki, T., 1997. Cryopreservation of mature bovine oocytes following centrifugation treatment. Cryobiology 34, 36-41.

Ozols, J., 1997. Degradation of hepatic stearyl CoA delta 9-desaturase. Mol. Biol. Cell 8, 2281-2290.

Palasz, A.T., Nibart, M., Martin-Sportiello, I., Humblot, P., 1996. Progrès récents de la congélation d'embryons et d'ovocytes de mammifères. Principe généraux. Elevage et Insémination, pp. 273, 271-213.

Park, Y., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W., Pariza, M.W., 1999. Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. Lipids 34, 235-241.

Park, Y., Storkson, J.M., Ntambi, J.M., Cook, M.E., Sih, C.J., Pariza, M.W., 2000. Inhibition of hepatic stearoyl-CoA desaturase activity by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. Biochimica et biophysica acta 1486, 285-292.

Parks, J.S., Huggins, K.W., Gebre, A.K., Burleson, E.R., 2000. Phosphatidylcholine fluidity and structure affect lecithin:cholesterol acyltransferase activity. J Lipid Res 41, 546-553.

Paynton, B.V., Bachvarova, R., 1994. Polyadenylation and deadenylation of maternal mRNAs during oocyte growth and maturation in the mouse. Molecular reproduction and development 37, 172-180.

Paynton, B.V., 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.

Peet, D.J., Janowski, B.A., Mangelsdorf, D.J., 1998. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. Curr. Opin. Genet. Dev. 8, 571-575.

Pegoraro, L.M., Thuard, J.M., Delalleau, N., Guerin, B., Deschamps, J.C., Marquant Le Guienne, B., Humblot, P., 1998. Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or with Vero cells. Theriogenology 49, 1579-1590.

Pégorier, J.P., Le May, C., 2003. Régulation de l'expression génique par les acides gras. Nutrition clinique et métabolisme. 17, 80-88.

Pemble, L.B., Kaye, P.L., 1986. Whole protein uptake and metabolism by mouse blastocysts. Journal of reproduction and fertility 78, 149-157.

Pereira, R.M., Baptista, M.C., Vasques, M.I., Horta, A.E., Portugal, P.V., Bessa, R.J., Silva, J.C., Pereira, M.S., Marques, C.C., 2007. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). Animal reproduction science 98, 293-301.

Pereira, R.M., Carvalhais, I., Pimenta, J., Baptista, M.C., Vasques, M.I., Horta, A.E., Santos, I.C., Marques, M.R., Reis, A., Pereira, M.S., Marques, C.C., 2008. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. Anim. Reprod. Sci. 106, 322-332.

Peterson, D.G., Matitashvili, E.A., Bauman, D.E., 2003. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased trans-10, cis-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. J. Nutr. 133, 3098-3102.

Peterson, D.G., Matitashvili, E.A., Bauman, D.E., 2004. The inhibitory effect of trans-10, cis-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1. The Journal of nutrition 134, 2523-2527.

Phillips, S.A., Choe, C.C., Ciaraldi, T.P., Greenberg, A.S., Kong, A.P., Baxi, S.C., Christiansen, L., Mudaliar, S.R., Henry, R.R., 2005. Adipocyte differentiation-related protein in human skeletal muscle: relationship to insulin sensitivity. Obes Res 13, 1321-1329.

Picard, L., Greve, T., King, W.A., Betteridge, K.J., Jorgensen, P.H., 1986. Bisection of post-compaction bovine embryos: the difference in viability between the two monozygotic halves. Acta veterinaria Scandinavica 27, 33-48.

Picton, H., Briggs, D., Gosden, R., 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. Molecular and cellular endocrinology 145, 27-37.

Pinyopummintr, T., Bavister, B.D., 1994. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. Theriogenology 41, 1241-1249.

Piperova, L.S., Sampugna, J., Teter, B.B., Kalscheur, K.F., Yurawecz, M.P., Ku, Y., Morehouse, K.M., Erdman, R.A., 2002. Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. The Journal of nutrition 132, 1235-1241.

Plante, L., King, W.A., 1994. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in vitro and in vivo fertilization. J. Assist. Reprod. Genet. 11, 515-529.

Plante, L., Plante, C., Shepherd, D.L., King, W.A., 1994. Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. Molecular reproduction and development 39, 375-383.

Pollard, J.W., Leibo S. P., 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. Theriogenology 41, 101-106.

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.

Ponter, A.A., Parsy, A.E., Saade, M., Mialot, J.P., Ficheux, C., Duvaux-Ponter, C., Grimard, B., 2006. Effect of a supplement rich in linolenic acid added to the diet of post partum dairy cows on

ovarian follicle growth, and milk and plasma fatty acid compositions. Reprod. Nutr. Dev. 46, 19-29.

Prasad, R., Kumar, V., Kumar, R., Singh, K.P., 1999. Thyroid hormones modulate zinc transport activity of rat intestinal and renal brush-border membrane. Am J Physiol 276, E774-782.

Pugh, E.L., Kates, M., 1984. Acyl-acyl carrier protein as substrate of the acyltransferase of rat liver microsomes. Lipids 19, 359-362.

Rall, W.F., Fahy, G.M., 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. Nature 313, 573-575.

Reis, A., McCallum, G.J., McEvoy, T.G., 2005. Accumulation and distribution of neutral lipid droplets is non-uniform in ovine blastocysts produced in vitro in either the presence or absence of serum. Reproduction, fertility, and development 17, 815-823.

Reis, A., Rooke, J.A., McCallum, G.J., Staines, M.E., Ewen, M., Lomax, M.A., McEvoy, T.G., 2003. Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro. Reproduction, fertility, and development 15, 275-284.

Renard, J.P., 1982. La transplantation embryonnaire chez les bovins, In ITEB Editions, Paris, France.

Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Mangelsdorf, D.J., 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. Genes Dev. 14, 2819-2830.

Rieger, D., Luciano, A.M., Modina, S., Pocar, P., Lauria, A., Gandolfi, F., 1998. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro. Journal of reproduction and fertility 112, 123-130.

Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Moreira, P., O'Meara, C., Fair, T., Evans, A.C., Boland, M.P., Lonergan, P., 2004. Species-related differences in blastocyst quality are associated with differences in relative mRNA transcription. Molecular reproduction and development 69, 381-386.

Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Perez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M.P., Lonergan, P., 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. Biology of reproduction 68, 236-243.

Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M.P., 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. Biology of reproduction 66, 589-595.

Rizos, D., Ward, F., Boland, M.P., Lonergan, P., 2001. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. Theriogenology 56, 1-16.

Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., 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. Molecular reproduction and development 61, 234-248.

Robert, C., McGraw, S., Massicotte, L., Pravetoni, M., Gandolfi, F., Sirard, M.A., 2002. Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. Biology of reproduction 67, 1465-1472.

Roberts, L.J., 2nd, Morrow, J.D., 2002. Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. Cell Mol Life Sci 59, 808-820.

Robinson, J.J., Ashworth, C.J., Rooke, J.A., Mitchell, L.M., McEvoy, T.G., 2006. Nutrition and fertility in ruminant livestock. Anim. Feed Sci. Technol. 126, 259-276.

Rodriguez-Dorta, N., Cognie, Y., Gonzalez, F., Poulin, N., Guignot, F., Touze, J.L., Baril, G., Cabrera, F., Alamo, D., Batista, M., Gracia, A., Mermillod, P., 2007. Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified in vitro produced goat embryos. Theriogenology 68, 908-913.

Rosen, E.D., MacDougald, O.A., 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7, 885-896.

Saacke, R., Nebel, R., Karabinus, D., Bame, J., Mullins, J., 1988. Sperm transport and accessory sperm evaluation. In: Proc 12th Tech Conf Artif Insemin Reprod. MO: National Association of Animal Breeders;, Columbia.

Sakakura, Y., Shimano, H., Sone, H., Takahashi, A., Inoue, N., Toyoshima, H., Suzuki, S., Yamada, N., 2001. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 286, 176-183.

Salamone, D.F., Adams, G.P., Mapletoft, R.J., 1999. Changes in the cumulus-oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. Theriogenology 52, 549-561.

Sampath, H., Ntambi, J.M., 2005. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. Annual review of nutrition 25, 317-340.

Sata, R., Tsujii, H., Abe, H., Yamashita, S., Hoshi, H., 1999. Fatty Acid Composition of Bovine Embryos Cultured in Serum-Free and Serum-Containing Medium during Early Embryonic Development. Reproduction, fertility, and development 45, 97-103.

Schachter, D., 1984. Fluidity and function of hepatocyte plasma membranes. Hepatology (Baltimore, Md 4, 140-151.

Scheffen, B., Van der Zwalmen, P., Massip, A., 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. Cryo-Letters 7, 260-269.

Schoonjans, K., Watanabe, M., Suzuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T., Auwerx, J., 1995. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. The Journal of biological chemistry 270, 19269-19276.

Schwarz, S.M., Ling, S.D., Hostetler, B., Draper, J.P., Watkins, J.B., 1984. Lipid composition and membrane fluidity in the small intestine of the developing rabbit. Gastroenterology 86, 1544-1551.

Seidel, G.E., Jr., 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. Theriogenology 65, 228-235.

Sekiya, M., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Najima, Y., Nakakuki, M., Nagai, R., Ishibashi, S., Osuga, J., Yamada, N., Shimano, H., 2003. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. Hepatology 38, 1529-1539.

Sellmayer, A., Danesch, U., Weber, P.C., 1996. Effects of different polyunsaturated fatty acids on growth-related early gene expression and cell growth. Lipids 31 Suppl, S37-40.

Sellner, P.A., Hazel, J.R., 1982. Desaturation and elongation of unsaturated fatty acids in hepatocytes from thermally acclimated rainbow trout. Arch Biochem Biophys 213, 58-66.

Sessler, A.M., Kaur, N., Palta, J.P., Ntambi, J.M., 1996. Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. The Journal of biological chemistry 271, 29854-29858.

Sette, C., Bevilacqua, A., Bianchini, A., Mangia, F., Geremia, R., Rossi, P., 1997. Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. Development 124, 2267-2274.

Shehab-El-Deen, M.A., Leroy, J.L., Maes, D., Van Soom, A., 2009. Cryotolerance of bovine blastocysts is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid. Reprod. Domest. Anim. 44, 140-142.

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

Sirard, M.A., Dufort, I., Vallee, M., Massicotte, L., Gravel, C., Reghenas, H., Watson, A.J., King, W.A., 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. Reproduction, fertility, and development 17, 47-57.

Sirard, M.A., Florman, H.M., Leibfried-Rutledge, M.L., Barnes, F.L., Sims, M.L., First, N.L., 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. Biology of reproduction 40, 1257-1263.

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

Sleeman, M.W., Donegan, N.P., Heller-Harrison, R., Lane, W.S., Czech, M.P., 1998. Association of acyl-CoA synthetase-1 with GLUT4-containing vesicles. The Journal of biological chemistry 273, 3132-3135.

Soupene, E., Kuypers, F.A., 2008. Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J 233, 507-521.

Spector, A.A., Yorek, M.A., 1985. Membrane lipid composition and cellular function. J Lipid Res 26, 1015-1035.

Spence, J.T., Pitot, H.C., 1982. Induction of lipogenic enzymes in primary cultures of rat hepatocytes. Relationship between lipogenesis and carbohydrate metabolism. European journal of biochemistry / FEBS 128, 15-20.

Staples, C.R., Burke, J.M., Thatcher, W.W., 1998. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. Journal of dairy science 81, 856-871.

Steel, R., Hasler, J.F., 2004. Pregnancy rates from transfer of fresh and frozen Holstein and Jersey embryos. Reproduction, Fertility and Development 16(2), 182–183.

Stone, S.J., Myers, H.M., Watkins, S.M., Brown, B.E., Feingold, K.R., Elias, P.M., Farese, R.V., Jr., 2004. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. The Journal of biological chemistry 279, 11767-11776.

Stubbs, C.D., Smith, A.D., 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. Biochim Biophys Acta 779, 89-137.

Suchankova, G., Tekle, M., Saha, A.K., Ruderman, N.B., Clarke, S.D., Gettys, T.W., 2005. Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 326, 851-858.

Sun, Y., Hao, M., Luo, Y., Liang, C.P., Silver, D.L., Cheng, C., Maxfield, F.R., Tall, A.R., 2003. Stearoyl-CoA desaturase inhibits ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux and modulates membrane domain structure. The Journal of biological chemistry 278, 5813-5820.

Sunshine, C., McNamee, M.G., 1994. Lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function: the role of membrane lipid composition and fluidity. Biochim Biophys Acta 1191, 59-64.

Swann, K., Igusa, Y., Miyazaki, S., 1989. Evidence for an inhibitory effect of protein kinase C on G-protein-mediated repetitive calcium transients in hamster eggs. The EMBO journal 8, 3711-3718.

Tahin, Q.S., Blum, M., Carafoli, E., 1981. The fatty acid composition of subcellular membranes of rat liver, heart, and brain: diet-induced modifications. European journal of biochemistry / FEBS 121, 5-13.

Takahashi, M., Nagai, T., Okamura, N., Takahashi, H., Okano, A., 2002. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. Biology of reproduction 66, 562-567.

Telford, N.A., Watson, A.J., Schultz, G.A., 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. Molecular reproduction and development 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. Molecular reproduction and development 66, 105-114.

Tesfaye, D., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Gilles, M., Schellander, K., 2004. A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced in vitro or in vivo. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene 39, 396-404.

Thangavelu, G., Colazo, M.G., Ambrose, D.J., Oba, M., Okine, E.K., Dyck, M.K., 2007. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. Theriogenology 68, 949-957.

Thelie, A., Papillier, P., Pennetier, S., Perreau, C., Traverso, J.M., Uzbekova, S., Mermillod, P., Joly, C., Humblot, P., Dalbies-Tran, R., 2007. Differential regulation of abundance and deadenylation of maternal transcripts during bovine oocyte maturation in vitro and in vivo. BMC Dev. Biol. 7, 125.

Thibier, M., 2000. The IETS statistics of embryo transfer in livestock in the world for the year 1999. Embryo Transfer Newsletter, pp. 24-28.

Thibier, M., 2006. Data Retrieval Committee Annual Report. Embryo Transfer Newsletter. International Embryo Transfer Society, pp. 8-12.

Thibodeaux, J.K., Myers, M.W., Goodeaux, L.L., Menezo, Y., Roussel, J.D., Broussard, J.R., Godke, R.A., 1992. Evaluating an in vitro culture system of bovine uterine and oviduct epithelial cells for subsequent embryo co-culture. Reproduction, fertility, and development 4, 573-583.

Thompson, J.G., 1997. Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. Reprod Fertil Dev 9, 341-354.

Thompson, J.G., 2000. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. Anim. Reprod. Sci. 60-61, 263-275.

Thompson, J.G., Allen, N.W., McGowan, L.T., Bell, A.C., Lambert, M.G., Tervit, H.R., 1998a. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. Theriogenology 49, 1239-1249.

Thompson, J.G., Allen, N.W., McGowan, L.T., Bell, A.C.S., Lambert, M.G., Tervit, H.R., 1998b. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. Theriogenology 49, 1239-1249.

Thompson, J.G., Gardner, D.K., Pugh, P.A., McMillan, W.H., Tervit, H.R., 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. Biology of reproduction 53, 1385-1391.

Thompson, J.G., Sherman, A.N., Allen, N.W., McGowan, L.T., Tervit, H.R., 1998c. Total protein content and protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryos. Molecular reproduction and development 50, 139-145.

Tiku, P.E., Gracey, A.Y., Macartney, A.I., Beynon, R.J., Cossins, A.R., 1996. Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. Science 271, 815-818.

Tocher, D.R., Fonseca-Madrigal, J., Dick, J.R., Ng, W.K., Bell, J.G., Campbell, P.J., 2004. Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Comparative biochemistry and physiology 137, 49-63.

Tomas, E., Tsao, T.S., Saha, A.K., Murrey, H.E., Zhang Cc, C., Itani, S.I., Lodish, H.F., Ruderman, N.B., 2002. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 16309-16313.

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. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene 37, 86-91.

Tominaga, K., Shimizu, M., Ooyama, S., Izaike, Y., 2000. Effect of lipid polarization by centrifugation at different developmental stages on post-thaw survival of bovine in vitro produced 16-cell embryos. Theriogenology 53, 1669-1680.

Tong, F., Black, P.N., Coleman, R.A., DiRusso, C.C., 2006. Fatty acid transport by vectorial acylation in mammals: roles played by different isoforms of rat long-chain acyl-CoA synthetases. Arch. Biochem. Biophys. 447, 46-52.

Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B.M., 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. Cell 79, 1147-1156.

Traldi, A.S., 2000. Vitrification of goat in vivo and in vitro produced embryos. 7th International Conference on Goats, Tours, Poitiers, France, p. 1031.

Trounson, A., Anderiesz, C., Jones, G., 2001. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction (Cambridge, England) 121, 51-75.

Tsuzuki, T., Kawakami, Y., Nakagawa, K., Miyazawa, T., 2006. Conjugated docosahexaenoic acid inhibits lipid accumulation in rats. The Journal of nutritional biochemistry 17, 518-524.

Ushijima, H., Yamakawa, H., Nagashima, H., 1996. Cryopreservation of bovine IVM/IVF embryos at early cleavage stage following removal of cytoplasmic lipid droplets. Theriogenology 45, 159 (Abstr.).

Ushijima, H., Yamakawa, H., Nagashima, H., 1999. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. Biology of reproduction 60, 534-539.

Vajta, G., 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Anim. Reprod. Sci. 60-61, 357-364.

Vajta, G., Holm, P., Greve, T., Callesen, H., 1997a. Survival and development of bovine blastocysts produced in vitro after assisted hatching, vitrification and in-straw direct rehydration. Journal of reproduction and fertility 111, 65-70.

Vajta, G., Holm, P., Greve, T., Callesen, H., 1997b. Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. Acta veterinaria Scandinavica 38, 349-352.

Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H., 1998. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Molecular reproduction and development 51, 53-58.

Van Langendonckt, A., Donnay, I., Schuurbiers, N., Auquier, P., Carolan, C., Massip, A., Dessy, F., 1997. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. Journal of reproduction and fertility 109, 87-93.

Van Soom, A., Van Vlaenderen, I., Mahmoudzadeh, A.R., Deluyker, H., de Kruif, A., 1992. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. Theriogenology 38, 905-919.

Vanderzwalmen, P., Bertin, G., Debauche, C., Standaert, V., van Roosendaal, E., Vandervorst, M., Bollen, N., Zech, H., Mukaida, T., Takahashi, K., Schoysman, R., 2002. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. Human reproduction (Oxford, England) 17, 744-751.

Vanderzwalmen, P., Zech, H., Prapas, N., Nijs, M., Vandamme, B., , Segal-Bertin, G., Debauche, C., Lejeune, B., Van Roosendaal, E., 1999. Pregnancy and implantation rates after transfers of fresh and vitrified embryos on day 4 or 5. Assist. Reprod. Genet 16, 147.

Vidal, H., 2005. [PPAR receptors: recent data]. Ann Endocrinol (Paris) 66, 1S5-9.

Vigneault, C., Gilbert, I., Sirard, M.A., Robert, C., 2007. Using the histone H2a transcript as an endogenous standard to study relative transcript abundance during bovine early development. Molecular reproduction and development 74, 703-715.

Vigneault, C., Gravel, C., Vallee, M., McGraw, S., Sirard, M.A., 2009. Unveiling the bovine embryo transcriptome during the maternal-to-embryonic transition. Reproduction (Cambridge, England) 137, 245-257.

Vigneault, C., McGraw, S., Massicotte, L., Sirard, M.A., 2004. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. Biology of reproduction 70, 1701-1709.

Viuff, D., Avery, B., Greve, T., King, W.A., Hyttel, P., 1996. Transcriptional activity in in vitro produced bovine two- and four-cell embryos. Molecular reproduction and development 43, 171-179.

Viuff, D., Rickords, L., Offenberg, H., Hyttel, P., Avery, B., Greve, T., Olsaker, I., Williams, J.L., Callesen, H., Thomsen, P.D., 1999. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. Biol Reprod 60, 1273-1278.

Voelkel, S.A., Hu, Y.X., 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. Theriogenology 37, 1117-1131.

Wakefield, S.L., Lane, M., Schulz, S.J., Hebart, M.L., Thompson, J.G., Mitchell, M., 2008. Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 294, E425-434.

Wakil, S.J., Stoops, J.K., Joshi, V.C., 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. Annual review of biochemistry 52, 537-579.

Wegner, C.C., Killian, G.J., 1991. In vitro and in vivo association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona pellucida. Molecular reproduction and development 29, 77-84.

Wehrman, M.E., Welsh, T.H., Jr., Williams, G.L., 1991. Diet-induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment, modulates ovarian follicular dynamics, and hastens the onset of postpartum luteal activity. Biology of reproduction 45, 514-522.

Wilmut, I., Rowson, L.E., 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. Vet Rec 92, 686-690.

Worgall, T.S., Sturley, S.L., Seo, T., Osborne, T.F., Deckelbaum, R.J., 1998. Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein. The Journal of biological chemistry 273, 25537-25540.

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. Reproduction, fertility, and development 17, 23-35.

Wrenzycki, C., Herrmann, D., Niemann, H., 2007. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. Theriogenology 68 Suppl 1, S77-83.

Wu, B., Ignotz, G., Currie, W.B., Yang, X., 1997. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. Biology of reproduction 56, 253-259.

Wu, B., Ignotz, G.G., Currie, W.B., Yang, X., 1996. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. Molecular reproduction and development 45, 560-565.

Xu, J., Nakamura, M.T., Cho, H.P., Clarke, S.D., 1999. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. The Journal of biological chemistry 274, 23577-23583.

Yang, J., Craddock, L., Hong, S., Liu, Z.M., 2009. AMP-activated protein kinase suppresses LXR-dependent sterol regulatory element-binding protein-1c transcription in rat hepatoma McA-RH7777 cells. J. Cell. Biochem. 106, 414-426.

Yavin, E., Glozman, S., Green, P., 2001. Docosahexaenoic acid sources for the developing brain during intrauterine life. Nutr Health 15, 219-224.

Yeagle, P.L., 1985. Cholesterol and the cell membrane. Biochim Biophys Acta 822, 267-287.

Zammit, V.A., 1999. Carnitine acyltransferases: functional significance of subcellular distribution and membrane topology. Progress in lipid research 38, 199-224.

Zeron, Y., Arav, A., Sklan, D., 1999a. Fatty acid composition in bovine immature oocytes. Theriogenology 51, 311-311.

Zeron, Y., Arav, A., Sklan, D., 1999b. Fatty acid composition in bovine immature oocytes. Theriogenology 51, 311 (Abstract).

Zeron, Y., Ocheretny, A., Kedar, O., Borochov, A., Sklan, D., Arav, A., 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. Reproduction (Cambridge, England) 121, 447-454.

Zeron, Y., Sklan, D., Arav, A., 2002. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. Molecular reproduction and development 61, 271-278.

Zhang, Y., Repa, J.J., Gauthier, K., Mangelsdorf, D.J., 2001. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. The Journal of biological chemistry 276, 43018-43024.

Zhu, L.J., Altmann, S.W., 2005. mRNA and 18S-RNA coapplication-reverse transcription for quantitative gene expression analysis. Anal. Biochem. 345, 102-109.

Abdulrahman AL DARWICH

Métabolisme lipidique et cryorésistance des embryons dans l'espèce bovine

Les embryons bovins produits *in vitro* sont plus sensibles à la cryoconservation que ceux produits *in vivo,* en partie à cause de leur contenu lipidique, triglycérides et phospholipides. L'objectif de ce travail visait à comprendre les mécanismes moléculaires responsables de cette différence. Le profil transcriptomique de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique a été établi. Le niveau d'expression génique de l'adipophiline obtenu indique qu'il peut être un marqueur spécifique de l'accumulation des triglycérides et de la cryorésistance des embryons. Ainsi, l'accumulation des triglycérides pourrait être liée à une absence de dégradation des lipides et non à une synthèse de novo uniquement. L'ajout d'acides gras polyinsaturés, C18:2, C18:3 ou DHA dans le milieu de développement, a régulé l'expression génique de SCD1 et de FADS2, deux enzymes qui désaturent les lipides, et ce, probablement via la régulation de SREBP1, ce qui pourrait être en lien direct avec les modifications de la balance acides gras saturés / insaturés et jouer sur la fluidité membranaire et la cryorésistance

Mots clés : espèce bovine, milieu de développement embryonnaire, expression génique, triglycérides, phospholipides, adipophiline, SCD1, FADS2, SREBP1, AGPI, DHA.

In vitro produced embryos are more sensitive to cryopreservation than those *in vivo* derived, partly because of their fat content, triglycerides and phospholipids. The objective of this work was to understand the molecular mechanisms responsible for this difference. mRNA expression of genes involved in lipid metabolism has been established. Results of adipophilin mRNA level indicates that it maybe a specific marker for triglycerides accumulation and embryo cryorésistance. Thus, triglyceride accumulation could be related to a lack of lipids degradation rather than new lipids synthesis only. Polyunsaturated fatty acids supplementation, C18: 2 C18: 3 or DHA in culture media regulated mRNA expression of SCD1 and FADS2, two enzymes involved in lipids desaturation, probably through SREBP1 regulation, which could be directly linked to changes in the balance of saturated / unsaturated fatty acids and could contribute to change membrane fluidity and embryo cryoresistance.

Keywords : bovine embryo, culture medium, gene expression, SCD1, FADS2, SREBP1, lipids, triglycerides, phospholipids, adipophilin, SCD1, FADS2, SREBP1, PUFA, DHA.