



Environnement périconceptionnel et qualité de l'embryon

Académie d'Agriculture:
Reproduction Animale et Biotechnologies.

Véronique Duranthon

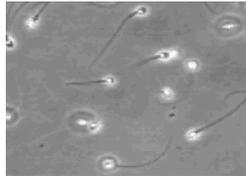
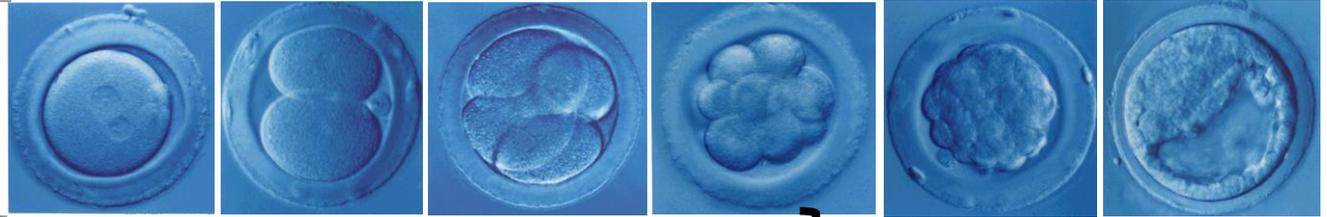
13/06/2023

➤ La « période périconceptionnelle »



➔
Etablissement premiers lignages

Gamétogénèses
Maturation des gamètes



Reprogrammation épigénétique
Inactivation du chromosome X



➔
Biogénèse mitochondriale
Reprogrammation métabolique



Environnement



Phénotype adulte



INRAE

Environnement périconceptionnel et qualité de l'embryon

13/06/2023 / Acad. Agri. / V. DURANTHON

➤ L'ovocyte: sensible à son environnement

Exemple: le cas de l'obésité maternelle



- Les ovocytes produisent des blastocystes de moindre qualité/potentiel.
- Fausses couches précoces.
- Anomalies congénitales.
- Risques de développement de syndrome métaboliques chez les descendants.

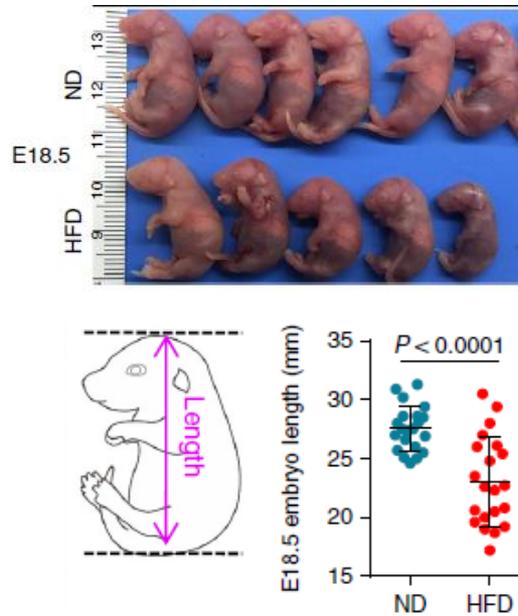


- Les ovocytes présentent
 - Accumulation de lipides,
 - Expression de marqueurs de stress du réticulum endoplasmique
 - Modification de l'ultrastructure et des potentiels de membranes des mitochondries
 - stress oxydant,
 - des anomalies de fuseaux méiotiques,
- Poids de naissance réduits, puis over-growth, adiposité, intolérance au glucose.
- Le même phénotype est observé après transfert des blastocystes en receveuses contrôles.

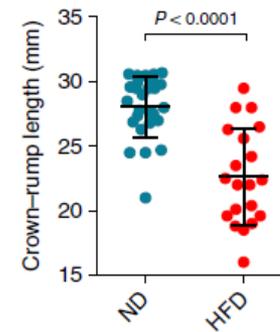
➤ Ovocyte et programmation du phénotype par l'environnement maternel

Le cas de l'obésité maternelle: modèle de souris HFD

Fœtus de femelles obèses fécondés par des mâles normaux



Fœtus issus de transferts dans des receveuses contrôles de zygotes issus de FIV (mâles normaux) d'ovocytes de femelles obèses HFD

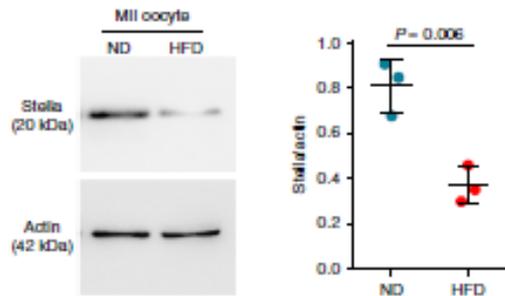


Han et al. 2018 Nature Genetics

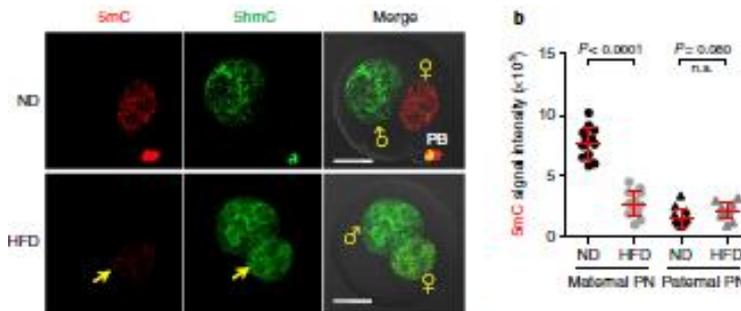
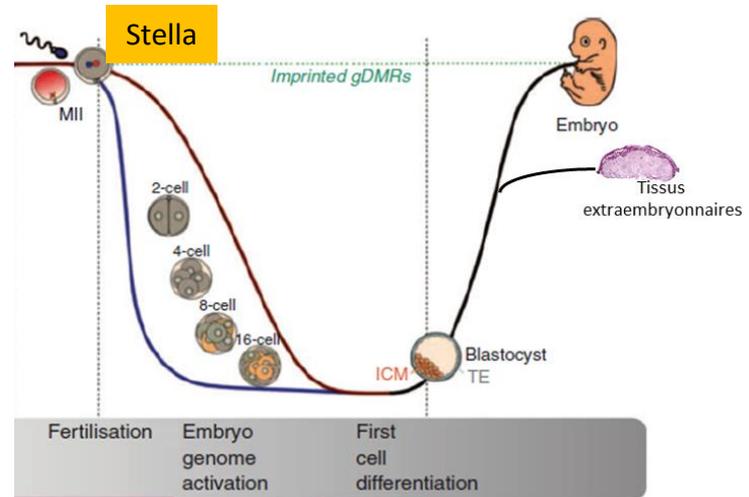


INRAE

➤ Ovocyte et programmation du phénotype par l'environnement maternel (2)



Quantification de la protéine Stella dans les ovocytes ND et HFD



Perturbation de l'asymétrie de reprogrammation de la méthylation de l'ADN dans les zygotes HFD

Han et al. 2018 Nature Genetics



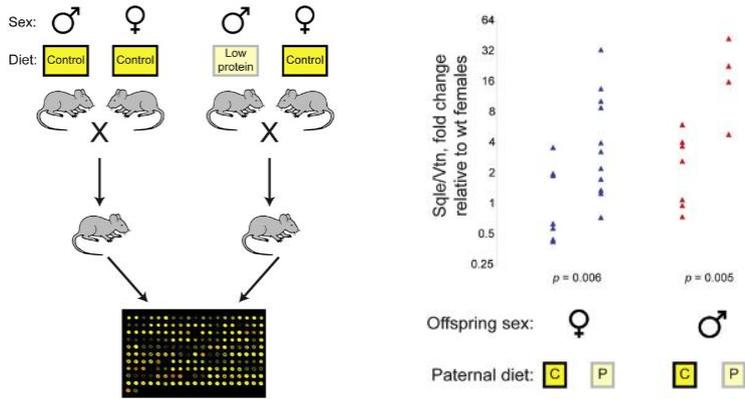
INRAE

Environnement périconceptionnel et qualité de l'embryon

13/06/2023 / Acad. Agri. / V. DURANTHON

➤ Spermatozoïde et programmation du phénotype par l'environnement paternel

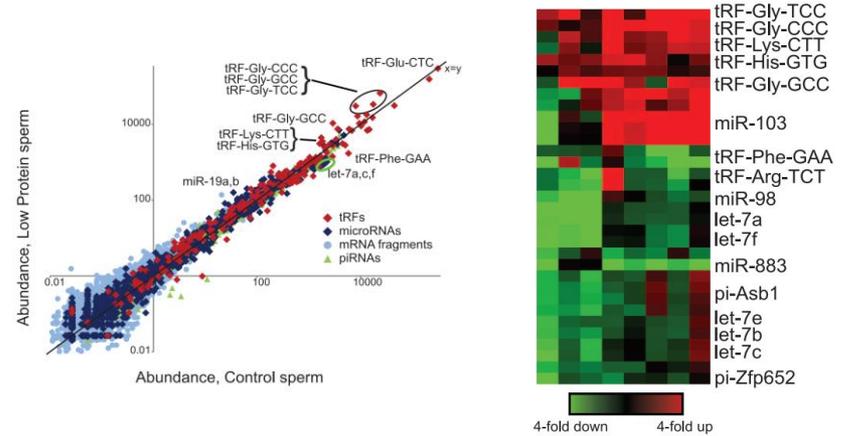
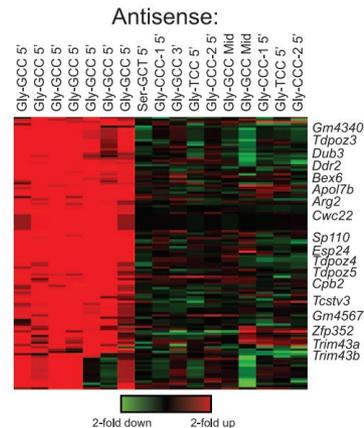
Exemple : programmation du métabolisme hépatique du cholestérol par le régime paternel
Low Protein Diet (LPD)



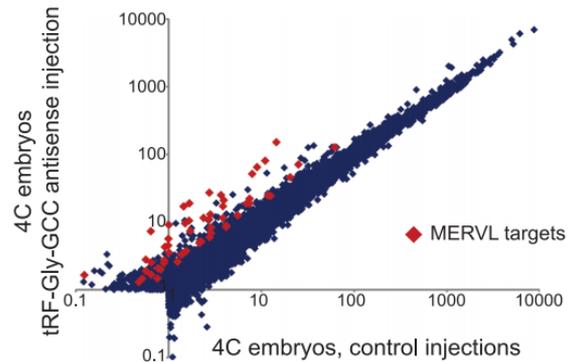
Surexpression de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol dans le foie des descendants
Ici : Expression de l'enzyme Squalène epoxidase
Phénotype reproduit par IVF

Carone et al. Cell, 2010

L'inhibition des ces tRF modifie les profils d'expression génique de cellules ES et des embryons: surexpression de gènes régulés par MERVL



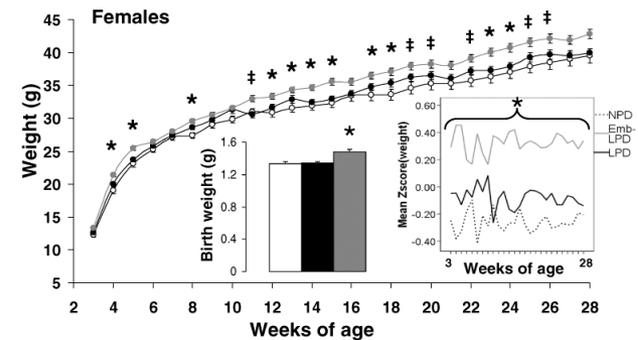
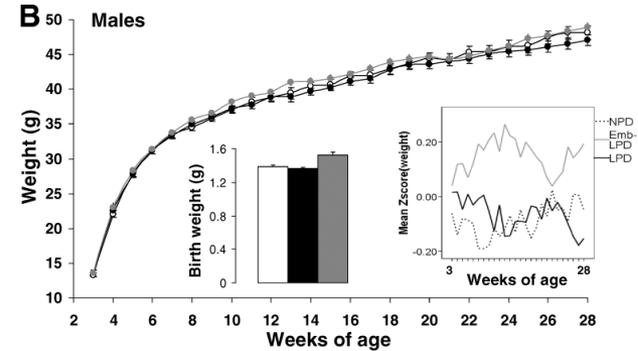
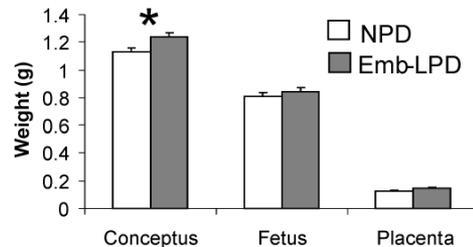
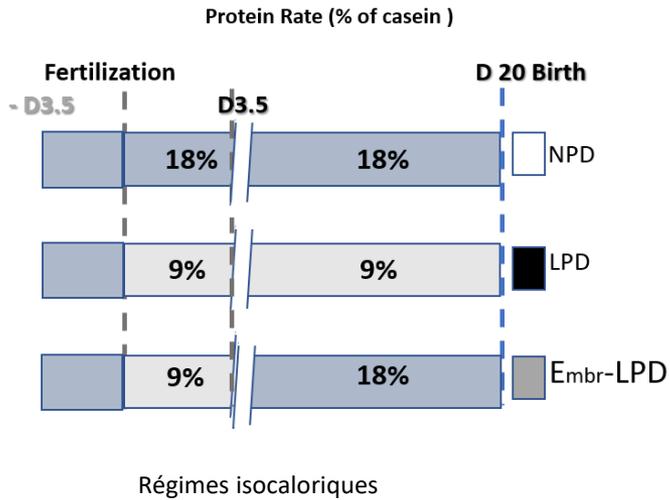
Le régime LPD induit une sur représentation de tRF dans le sperme de la queue de l'épididyme



Sharma et al. Science, 2016

➤ La période préimplantatoire (fécondation-blastocyste) : une cible pour la programmation du phénotype.

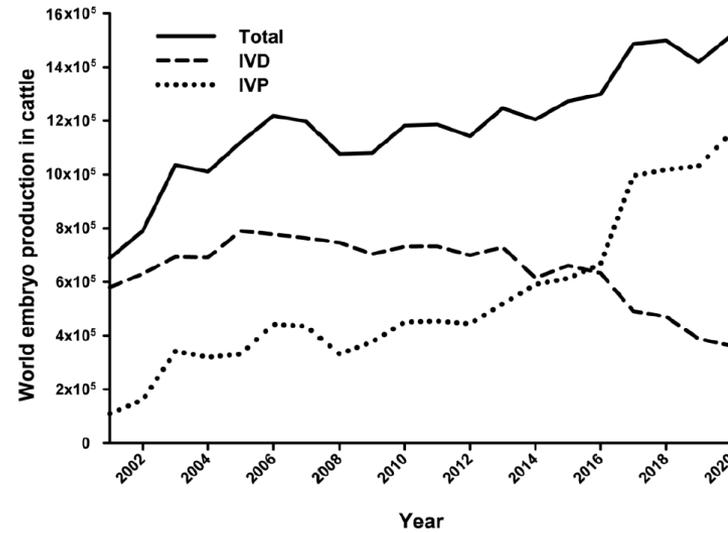
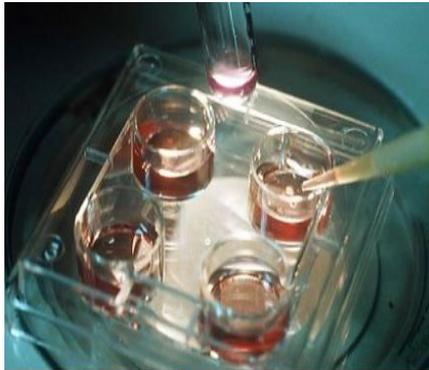
Exemple : programmation du poids des individus un régime maternel Low Protein Diet (LPD)



Poids des conceptus (à 17 J. post coitum) issus d'embryons NPD ou Embr-LPD transférés au stade blastocyste dans des femelles receveuses NPD.



➤ Impact de la production in vitro des embryons?



Total: 1.4974 million

IVD= in vivo derived
IVP= in vitro produced

Source IETS 2021



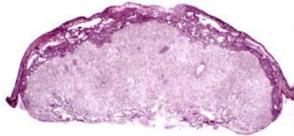
INRAE

Environnement périconceptionnel et qualité de l'embryon

13/06/2023 / Acad. Agri. / V. DURANTHON

➤ Conséquences des procédures associées à la production in vitro des embryons chez la souris

SUPEROVULATION/ FIV /CULTURE



Gestation

Croissance fœtale
réduite
Anomalies placentaires

Adulte

Métabolisme
Fonction cardiovasculaire
Comportements

Gènes

DNA methylation
Histone acetylation
Imprinted genes

⇒ *Dimorphismes sexuels*

⇒ *Dimorphismes sexuels*

Mann et al. 2004, Watkins et al. 2007, Fortier et al. 2008, Rivera et al. 2008, Collier et al. 2009, Delle Piane et al. 2010, Fauque et al. 2010 a et b, Bloise et al. 2012, Schwarzer et al. 2012; Donjacour et al. 2014, de Waal et al. 2014, Chen et al. 2015

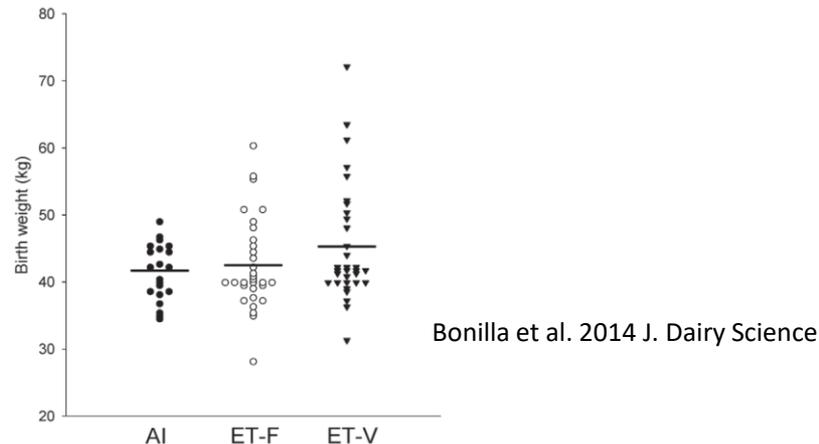
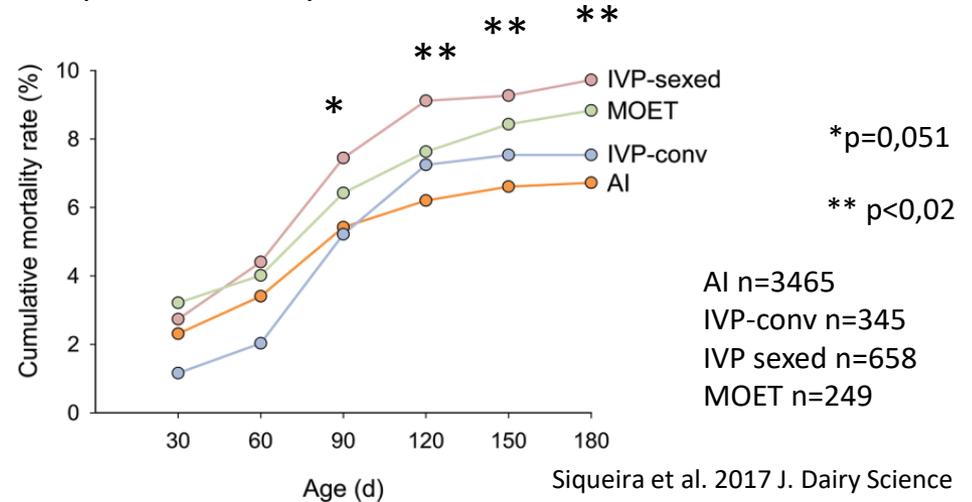
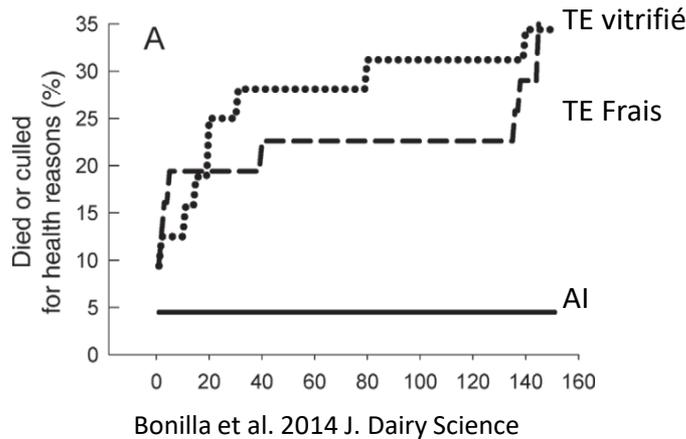


➤ Aptitude au développement pré et post natal des embryons bovins produits in vitro

Etude sur les 25 dernières années:

- 27% des receveuses de IVP embryons produisent un veau vivant
- Taux de gestation de 10 à 40% plus faibles pour IVP embryons

Ealy et al. 2019 J. Anim. Sci.



➤ Performances des individus nés d'embryons produits in vitro

Endpoint	AI	IVP-conv	IVP-sexed	MOET	P-value
Weight at first breeding	344 a	351 bc	355 c	346 ab	<0,0001
Milk yield (305d)	11 038 a	10 946 ab	10 717 b	10 891 ab	0,0014
Fat yield (305 d)	388 a	385 ab	377 b	384 ab	0,0072
Protein yield (305 d)	334 a	336 a	327 b	331 ab	0,0218

	AI	MOET	ET-in vitro	Biotec
Gestation length (days)	275.1 ± 0.10 (n = 3759)	274.5 ± 0.23 (n = 822)	273.9 ± 0.28 (n = 490)	P = 0.10
Birth weight (kg)	37.7 ± 0.08 ^b (n = 3489)	38.0 ± 0.15 ^a (n = 740)	38,0 ± 0.24 ^a (n = 460)	P < 0.0001
Birth-to-weaning mortality (%)	2.79 (n = 3759)	3.77 (n = 822)	2.86 (n = 490)	P = 0.62
Weaning weight (kg)	101.1 ± 0.13 (n = 3489)	100.3 ± 0.29 (n = 740)	102.9 ± 0,32 (n = 460)	P = 0.03
Age at first service (month)	14.2 ± 0.03 (n = 2901)	14.2 ± 0.06 (n = 706)	14.3 ± 0.10 (n = 201)	P = 0.86
Age at first calving (month)	24.8 ± 0.06 (n = 2134)	25.0 ± 0.12 (n = 525)	24.9 ± 0.27 (n = 86)	P = 0.71
Milk production at the first lactation (305 days; L)	9626.0 ± 44.9 (n = 2065)	9821.6 ± 84.6 (n = 516)	9501.8 ± 230.6 (n = 85)	P = 0.93

AI n=3 465
 IVP-conv n=345
 IVP sexed n=658
 MOET n=249

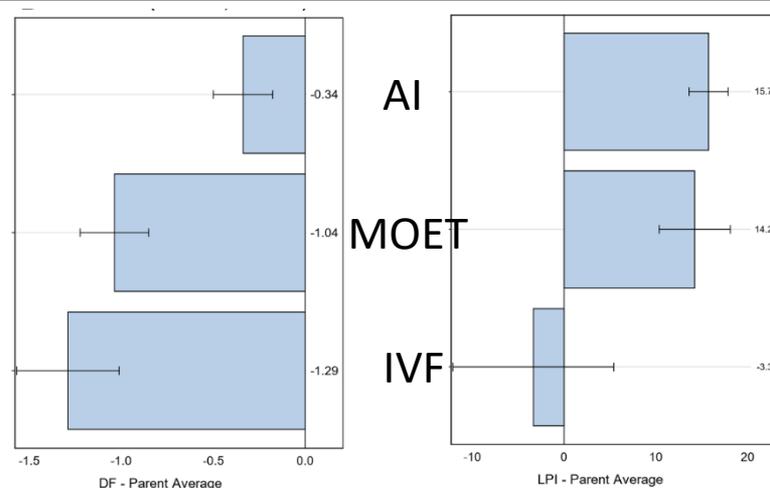
Siqueira et al. 2017 J. Dairy Science

Baruselli et al. 2021 Reprod. Fertil. Dev.

Analyse rétrospective 2012-2019

- Production laitière sur 3 lactations égale à potentiel génétique équivalent
- Légère diminution de l'index de fertilité des filles pour MOET et IVF
- Augmentation de 3-4 Jours de l'intervalle premier accouplement-conception pour les IVF
- Moindre augmentation de l'index LPI (Lifetime Performance)

AI n=304 163
 IVF n=732
 MOET n=12 993



INRAE

Environnement périconceptionnel et qualité de l'embryon

13/06/2023 / Acad. Agri. / V. DURANTHON

Lafontaine et al. 2023 J. Dairy Science

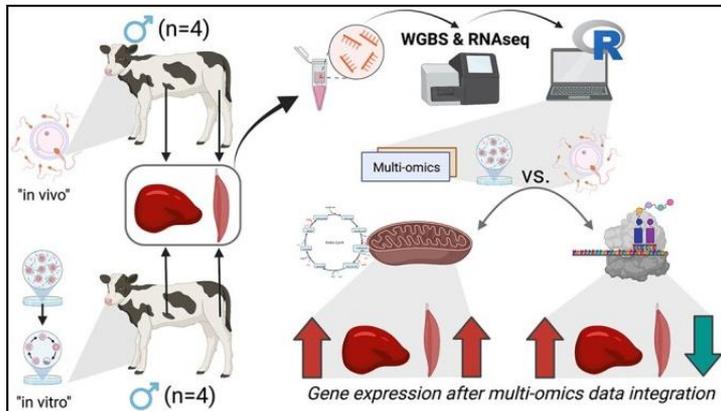
➤ Modifications physiologiques des individus nés d'embryons produits in vitro?

Comparaison MOET-IVP

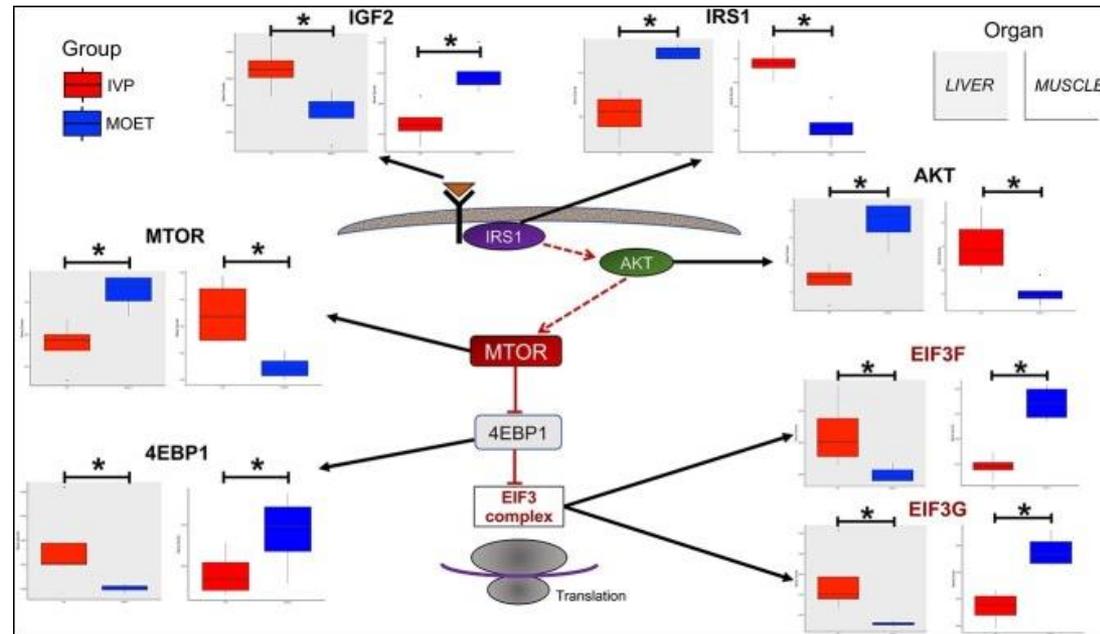
Modifications épigénomiques et transcriptomiques de l'axe Hypothalamus - Hypophyse – Testicule à 3 mois.

Rabaglino et al. 2021 FASEB J.

Intégration de données transcriptome et méthylome du lobe droit du foie et muscle semi-tendineux



- Phosphorylation oxydative
- TCA cycle
- **Respiration aérobie**
- Foie et muscle
- Ribosome
- Synthèse protéique**
- Foie
- Muscle

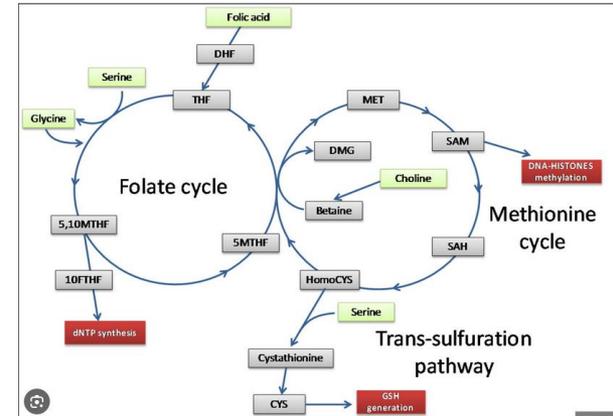
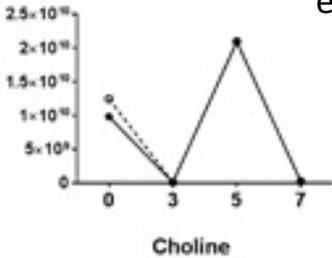


Adaptation du métabolisme énergétique de l'embryon.
Adaptation du fœtus à une fonction placentaire modifiée.
Adaptation métabolique persistante du muscle et du foie?

Rabaglino et al. 2022 Biol. Reprod

➤ Modulation du phénotype par la composition du milieu de culture

Culture des embryons en milieu enrichi en Choline chloride 1,8mM



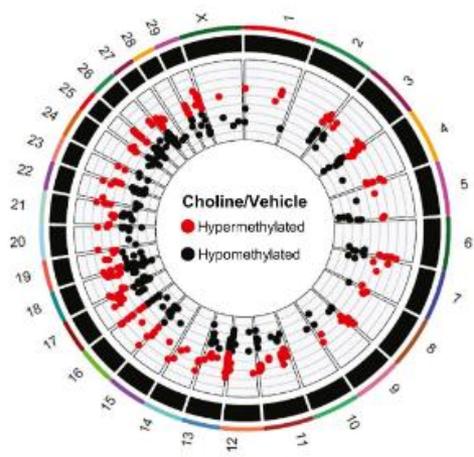
Développement de la masse corporelle par unité de hauteur

Postnatal traits	Treatment combination				Statistical significance
	Control-female	Choline-female	Control-male	Choline-male	
Number of calves at birth and weaning ^b	13/13	11/11	11/10	6/3	-
Birth weight, kg	35.1 ± 2.2	42.9 ± 2.3	35.0 ± 2.5	42.6 ± 3.0	.0081
Adjusted birth weight, kg ^c	36.9 ± 2.0	40.8 ± 2.1	35.9 ± 2.2	41.0 ± 2.7	.0857
Weaning weight, kg	233.3 ± 10.3	246.9 ± 11.3	202.9 ± 13.0	239.7 ± 18.7	.085
205-d adjusted weaning weight, kg ^d	221.5 ± 7.1	238.2 ± 7.9	209.9 ± 9.8	234.2 ± 12.7	.0477
Hip height at weaning, cm	114.4 ± 1.8	110.0 ± 2.3	110.1 ± 2.5	114.1 ± 3.3	.3458
Weight:hip ratio at weaning, kg/cm	1.99 ± 0.06	2.04 ± 0.06	1.84 ± 0.08	2.10 ± 0.11	.0378
Average daily gain, birth to weaning, kg/day ^d	0.93 ± 0.04	0.81 ± 0.05	0.84 ± 0.05	0.93 ± 0.08	.1386

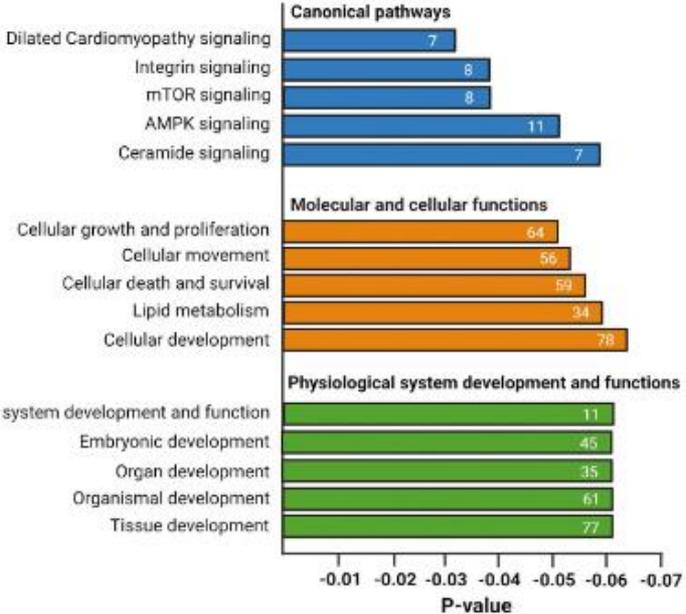
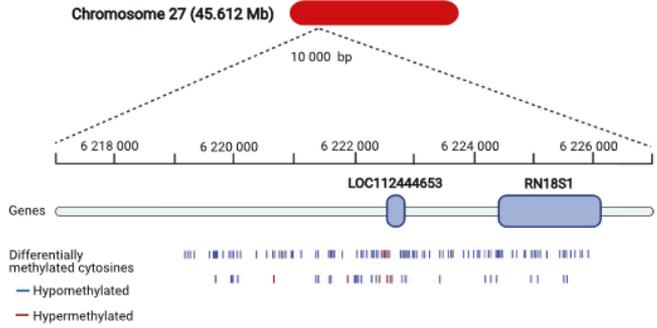
Modulation du phénotype par la composition du milieu de culture (2)

Analyse du méthylome du muscle
Longissimus dorsi à 4 mois:

- 670 DMCs dont 239 hyperméthylées
- 392 DMC localisées dans 196 gènes



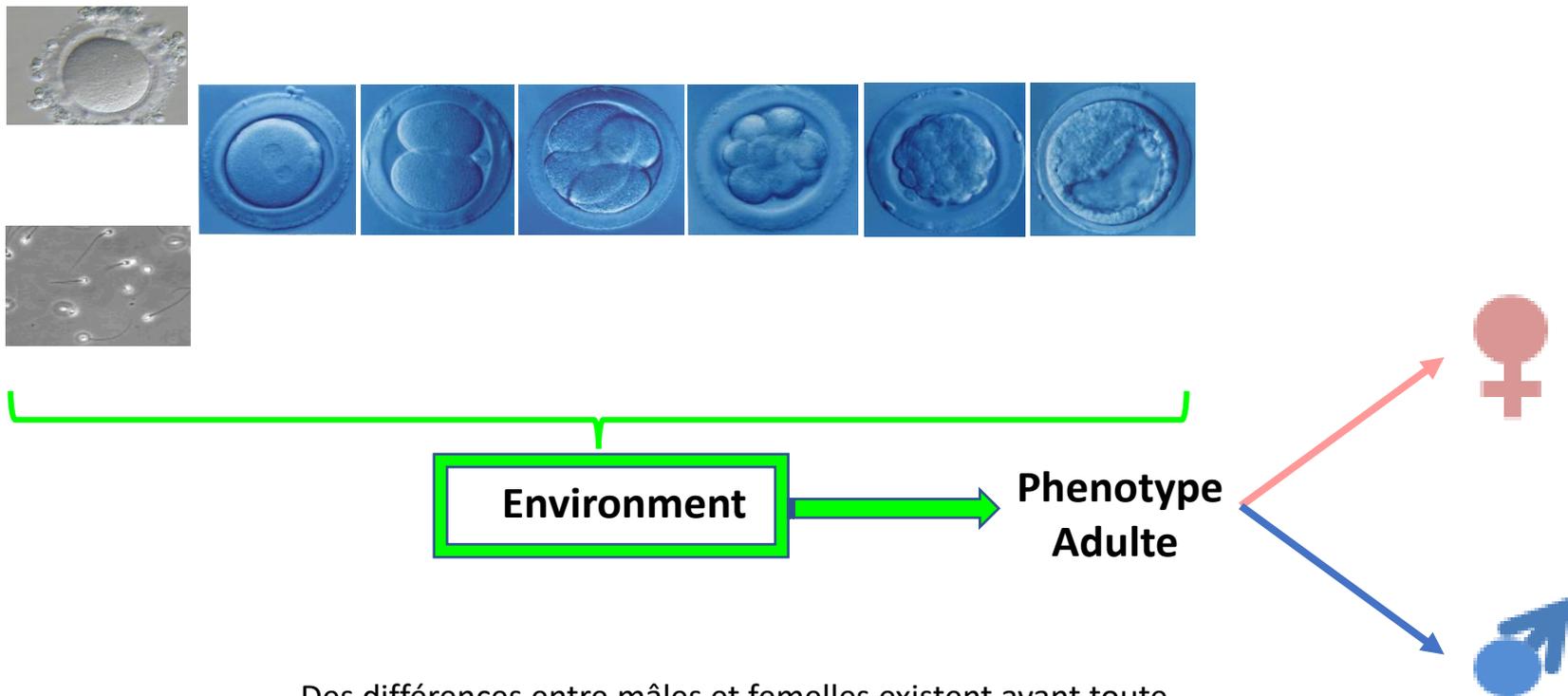
177 DMC localisées sur BTA27 :
gènes Ribosome 5,8 S et 18S



Enrichissements fonctionnels des gènes portant les DMCs

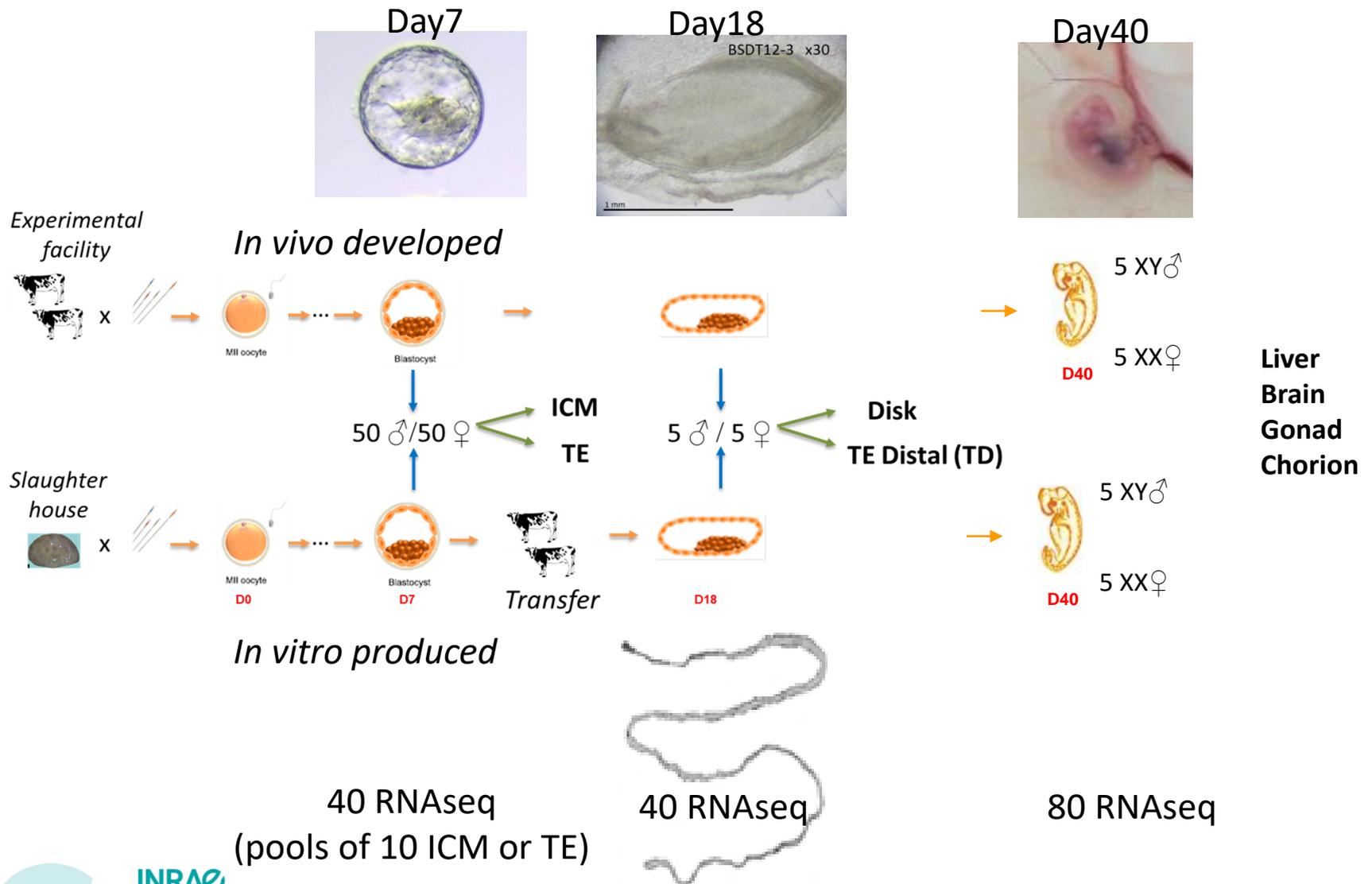


➤ Etude des différences entre embryons mâles et femelles et de leurs altérations par la production in vitro: le projet BoSexDim

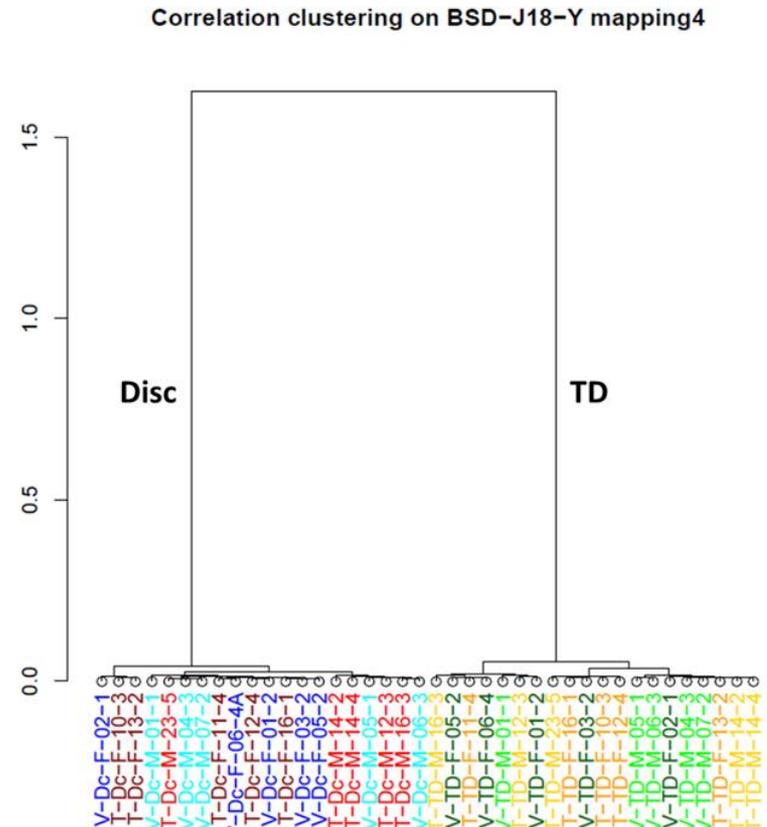
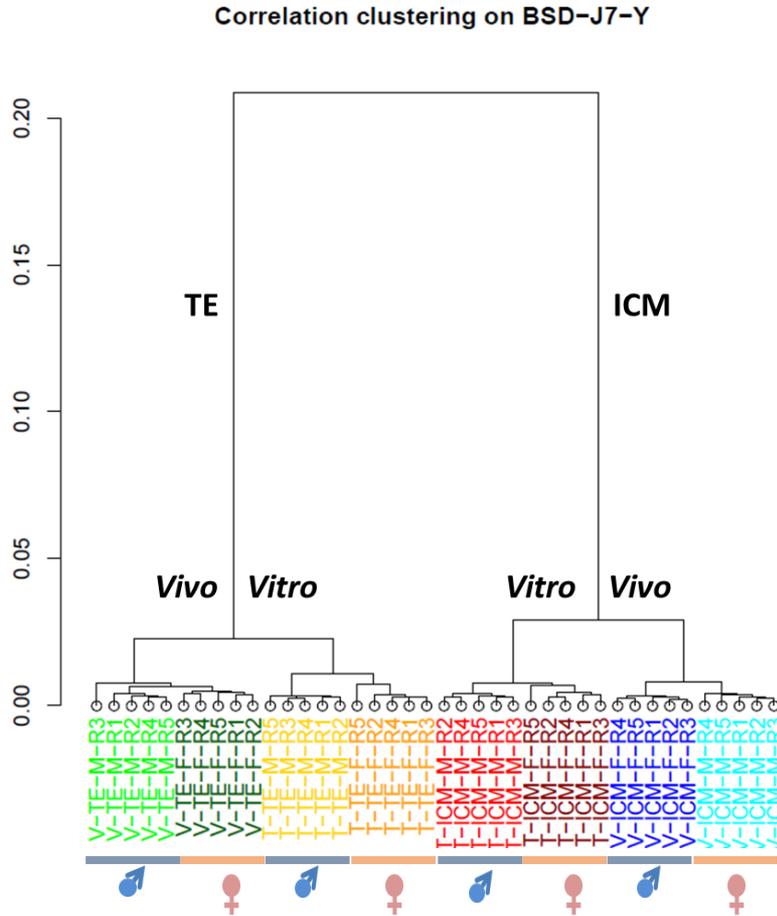


Des différences entre mâles et femelles existent avant toute imprégnation hormonale, dues aux seuls chromosomes sexuels

➤ Plan expérimental du projet BosexDim



➤ Des différences majeures de transcriptome en fonction de la condition de développement et du sexe surtout à Jour7



➤ Recherche des gènes différentiellement exprimés

- Mapping sur génome Hereford ARS-UCD1 et CM001061.2 Hereford chromosome Y

A chaque stade et dans chaque tissu: $GExp = \mu + Sex + Ction + \varepsilon$

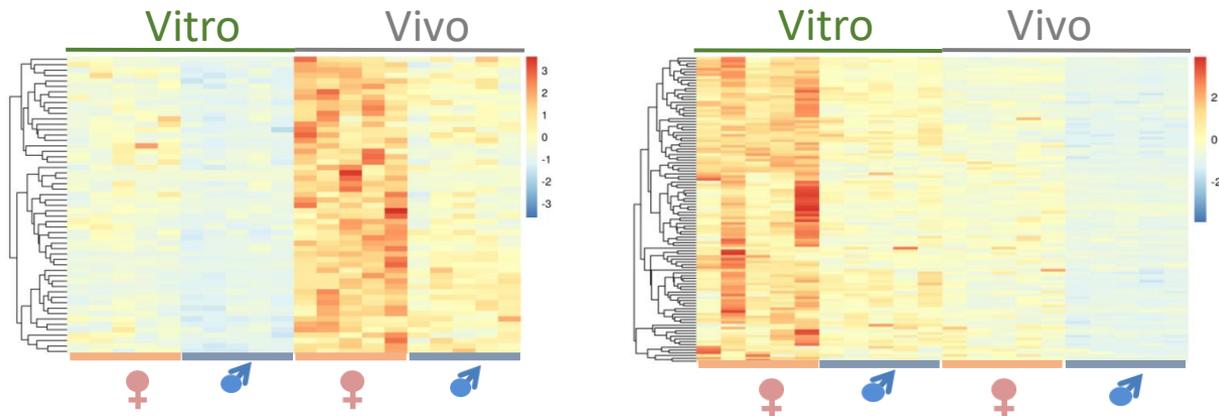
Day7			Day18		
Adj Pval<0,05 ratio>1.2 or <0,83			Adj Pval<0,05 ratio>1.2 or <0,83		
	ICM	TE		Disc	TD
C^{tion}	4424	3527	C^{tion}	1	128
Sex	1287	1156	Sex	646	138

Day40				
	Brain	Liver	Chorion	Gonad
C^{tion}	796	65	662	275
Sex	24	79	41	698

La plupart de ces gènes sont tissus/stade spécifiques

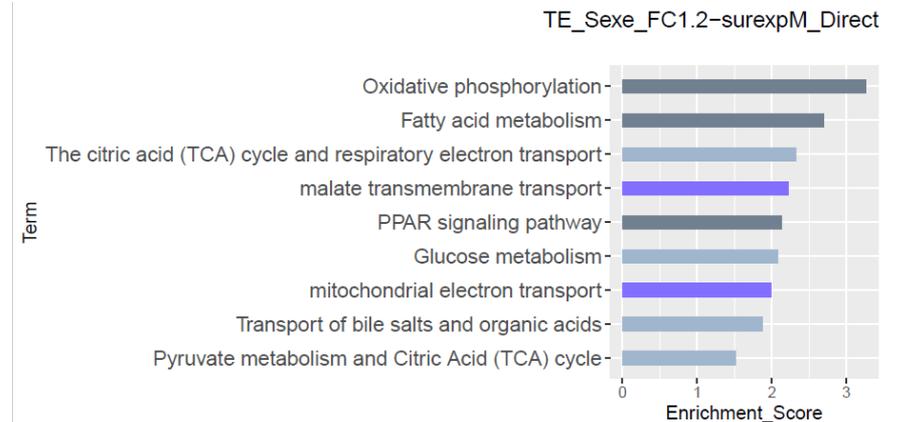
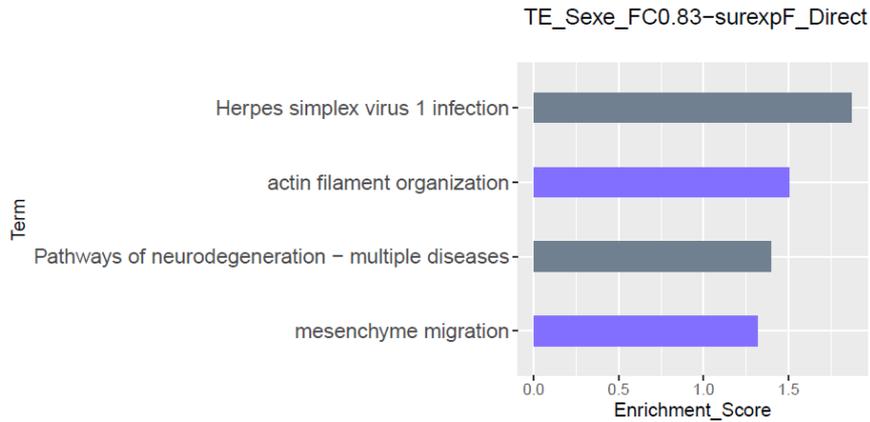
➤ Gènes présentant à la fois un effet sexe et un effet condition à jour 7.

A Jour 7, 30 à 50% des gènes à « effet sexe » sont affectés par la condition de développement des embryons (vivo/vitro)



➤ Enrichissements fonctionnels : gènes présentant un effet sexe dans le trophoctoderme à Jour7

Focus : compartiment extraembryonnaire



Category

- GOTERM_BP
- GOTERM_MF
- KEGG_PATHWAY
- REACTOME_PATHWAY



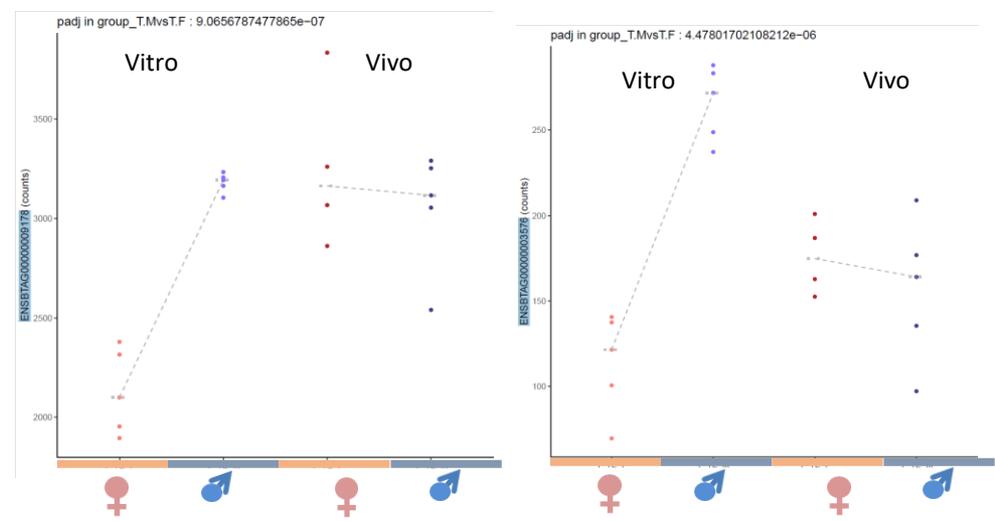
INRAE

Environnement périconceptionnel et qualité de l'embryon

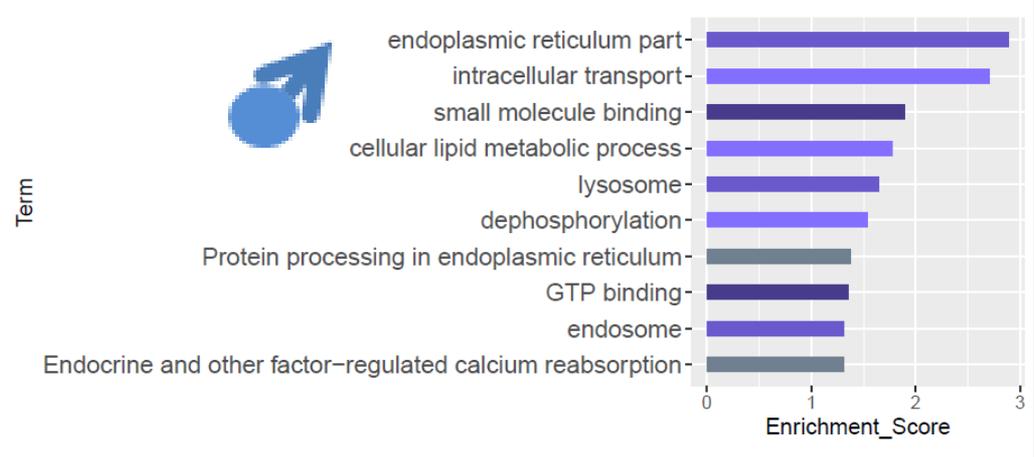
13/06/2023 / Acad. Agri. / V. DURANTHON

➤ La Production in vitro des embryons génère des dimorphismes sexuels d'expression génique

Jour7
Trophectoderme



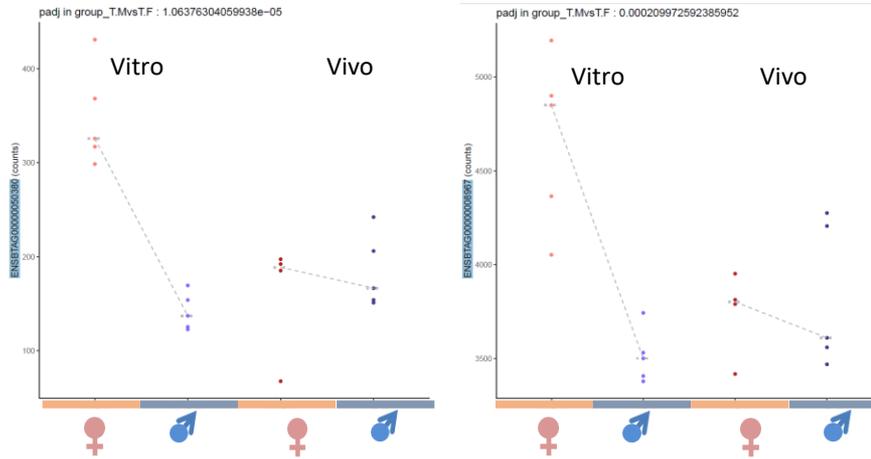
234 gènes surexprimés chez les mâles seulement in vitro



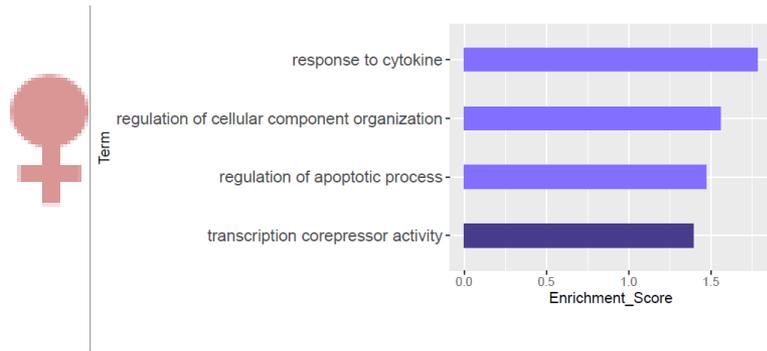
INRAE

➤ La Production in vitro des embryons génère des dimorphismes sexuels d'expression génique (2)

Jour7
Trophectoderme

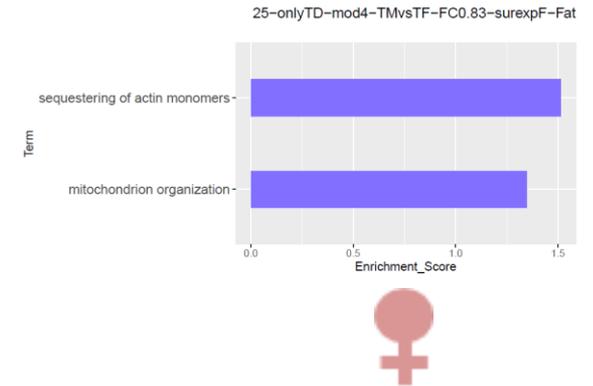
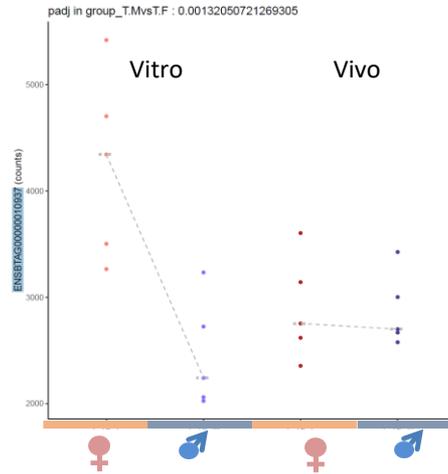


181 gènes surexprimés chez les femelles seulement in-vitro

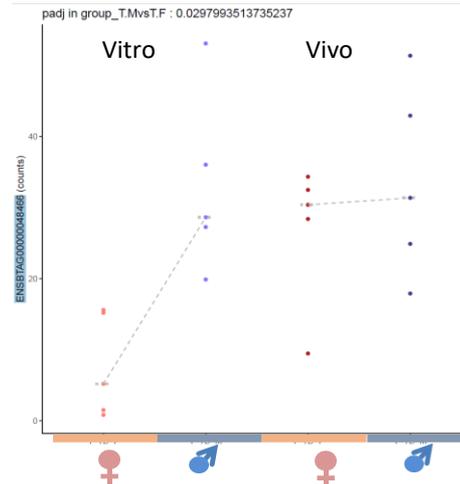


➤ La production In vitro des embryons génère des dimorphismes sexuels dans l'expression génique à Jour 18 dans le trophoctoderme distal.

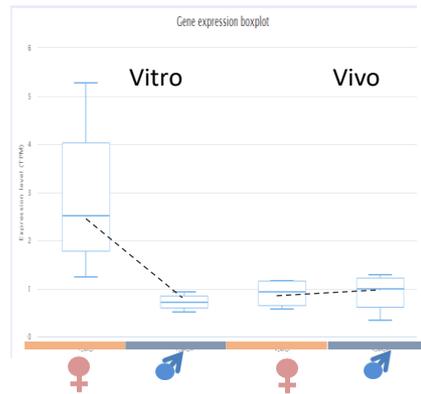
Gènes surexprimés chez les in femelles



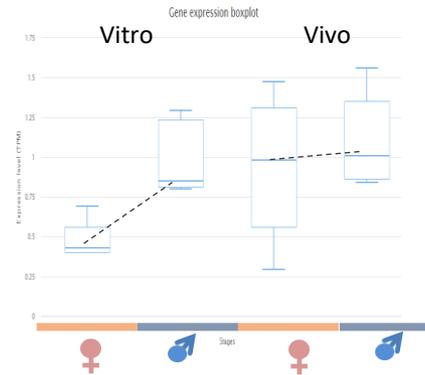
Gènes surexprimés chez les mâles



➤ La production In vitro des embryons génère des dimorphismes sexuels dans l'expression génique à Jour 40 dans chorion.



GO:0019882~antigen processing and presentation
GO:0035556~intracellular signal transduction



R-BTA-72163~mRNA Splicing - Major Pathway
GO:0016070~RNA metabolic process

➤ La production in vitro affecte différenciellement l'épigénome des individus mâles et femelles

Analyse des méthylomes par Reduced Bisulfite Representative sequencing RRBS.

Nombre de Cytosines différenciellement méthylées (DMC) sur les autosomes

DMC	Tropho J18		Chorion		Foie		Cerveau		Gonade	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Total	77 300	16 943	57 759	5 799	1 548	752	27 251	10 228	4 581	4 512
Hyper Vitro	65 566	14 680	56 164	4 516	1 125	372	8 673	3 365	1 437	2 431
Hypo Vitro	13 119	2 263	1 595	1 283	423	380	18 578	6 863	3 144	2 081

- La production in vitro affecte davantage le méthylome des femelles (sauf gonades)
- Dans le tropho, le chorion, et le foie femelle elle induit surtout une augmentation de la méthylation
- Dans le cerveau et la gonade femelle plutôt une diminution de la méthylation



> Conclusions

- L'environnement pendant la période périconceptionnelle programme le phénotype de l'individu à naître.
- Les mécanismes moléculaires, souvent de nature épigénétique sont variés et encore peu compris.
- Leur étude suppose d'abord de travailler tissu par tissu et de prendre en compte le sexe des individus, avant de tenter d'intégrer les résultats.
- La veille s'accroît sur les conséquences possibles de la PIV des embryons bovins.



> Remerciements

Production échantillons

Ludivine Laffont
Sylvie Ruffini
Daniel Le Bourhis
Olivier Desnoes
Christophe Richard
Eugénie Canon
Nathalie Peynot
Nathalie Daniel
Vincent Brochard
Julie Gatien
Pascal Salvetti
Alice Jouneau
Isabelle Hue

Biologie moléculaire

Catherine Archilla
Auréli Bonnet
Nathalie Peynot
Marie-Christine Deloche
Marjolaine André
Auréli Chaulot-Talmon
Francesca Ali
Lorraine Bourgeois-Brunel

Analyse des données

Catherine Archilla
Anne Frambourg
Derya Sebukhan
Luc Jouneau
Florence Jaffrezic
Denis Laloë
Béatrice Mandon-Pépin
Alice Jouneau
Isabelle Hue
Eric Pailhoux
Laurent Schibler

