

La qualité de l'ovocyte bovin : du phénotype aux gènes

ANGULO L. (1,2), GUYADER-JOLY C. (2), AUCLAIR S. (1), PONCHON S. (2), GONZALEZ C. (2), HENNEQUET-ANTIER C. (3), BOUSSAHA M. (4), HUMBLLOT P. (2,5), DALBIES-TRAN R. (1), PONSART C. (2)

(1) UMR85 INRA-CNRS-Univ. Tours, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly

(2) Union Nationale des Coopératives d'Élevage et d'Insémination Animale, dpt R&D, Maisons-Alfort et Chateauvillain

(3) UR83 INRA Unité de Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly.

(4) UMR 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, 78350 Jouy-en-Josas

(5) Department of Clinical Sciences, SLU, 750-07 Uppsala (Suède)

RESUME

Les échecs de gestation interviennent pour la plupart dans les premiers jours qui suivent l'insémination. Ces échecs précoces sont liés en particulier à la composante génétique de la baisse de fertilité des vaches laitières. Compte-tenu du rôle prépondérant des facteurs maternels au cours des premiers jours du développement de l'embryon, ces échecs précoces mettent en cause la qualité de l'ovocyte. Ainsi, les programmes de recherche Ovogenae/Ovogenae2 ont été développés pour établir une carte d'expression des gènes dans l'ovocyte bovin associée au potentiel de développement embryonnaire.

Dans ce cadre, treize vaches montbéliardes ont été phénotypées sur la qualité de leurs ovocytes, plus précisément sur la proportion de leurs ovocytes capable d'évoluer en embryons viables à 7 jours de développement après maturation et fécondation in vitro (Guyader-Joly et al., 2008). Des animaux extrêmes sur ce caractère ont été isolés : trois animaux présentant un taux de développement de 0 à 17%, trois animaux présentant un taux de développement de 36 à 55%. Ces animaux ont été génotypés sur puce Illumina 54K, pour la recherche de polymorphisme associé au phénotype.

En parallèle, une approche de génomique expressionnelle a été conduite. Après traitement de stimulation ovarienne, des ovocytes ont été prélevés sous contrôle échographique aux stades immatures et matures, soit 48h avant et 20h après le pic de LH. L'expression des gènes dans ces ovocytes a été analysée sur puce à ADN afin de mettre en évidence les fonctions moléculaires et cellulaires altérées. L'analyse a révélé des différences d'expression des gènes entre les deux groupes d'animaux, aux deux stades. La différence de qualité des ovocytes mesurée par leur aptitude au développement jusqu'au stade blastocyste est associée à la perturbation modérée de l'expression d'un nombre important de gènes, impliqués dans diverses fonctions biologiques telles que le métabolisme oxydatif ou le contrôle des acides nucléiques. Ces gènes ont été positionnés sur le génome bovin pour une analyse de correspondance au regard des QTL de fertilité connus.

Parmi ces marqueurs potentiels de qualité ovocytaire, les plus pertinents pourront être étudiés plus finement pour la recherche de mutations causales et intégrés à terme dans une optique de sélection génétique.

Bovine oocyte quality: from phenotype to genes

ANGULO L. (1,2), GUYADER-JOLY C. (2), AUCLAIR S. (1), PONCHON S. (2), GONZALEZ C. (2), HENNEQUET-ANTIER C. (3), BOUSSAHA M. (4), HUMBLLOT P. (2,5), DALBIES-TRAN R. (1), PONSART C. (2)

(1) UMR85 INRA-CNRS-Univ. Tours, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly

(2) Union Nationale des Coopératives d'Élevage et d'Insémination Animale, dpt R&D, Maisons-Alfort and Chateauvillain

SUMMARY

In bovines, most gestation failures that occur in the first few days post-conception are influenced by genetic effects. Due to the critical role of maternal factors in sustaining early embryo development, such early failures point out a suboptimal oocyte quality as a major determinant in this phenomenon. We developed a program aiming at producing a gene expression footprint of the bovine oocyte associated with its embryonic development potential.

In this context, thirteen Montbeliard cows have been phenotyped on oocyte quality, based on their ability to produce viable embryos after seven days of in vitro culture (Guyader-Joly et al., 2008). Among them, two sets of three extreme animals were isolated, who displayed in vitro embryo development rates comprised between 0-17% and 36-55% respectively. These animals were genotyped on a 54K SNPchip, in order to reveal putative phenotype-associated polymorphisms.

Comparative gene expression studies were performed between oocytes collected under ultrasound supervision from these two groups of animals, both at the immature and mature stage. In order to identify altered cellular and molecular functions, transcriptomic profiles were characterized using a 22K oligochip, and differential transcripts were revealed between the two animal groups, at both stages. Overall, the difference in oocyte developmental potential was associated with a moderate alteration (ratio up to 4) of a large number of genes. Their mapping onto the bovine genome has been analysed relative to previously identified QTL for female fertility.

Following the validation of these potential oocyte quality markers, functional studies will be performed for the most pertinent genes. Further sequencing and search for polymorphisms will pave the way to implementing their use in genomic selection.

INTRODUCTION

Dans l'espèce bovine, des études ont mis en évidence la part importante des échecs précoces de gestation sur les performances de reproduction : environ deux tiers des échecs apparaissent liés à des défauts de fécondation ou de

développement embryonnaire avant 8 jours de développement. En particulier, les effets génétiques se manifestent précisément au cours de ces étapes précoces du développement embryonnaire. Ce qu'il est convenu d'appeler la qualité des gamètes joue un rôle évident dans l'établissement de la gestation, et particulièrement la qualité

de l'ovocyte du fait du rôle prépondérant des facteurs maternels dans la formation du blastocyste. En effet, au cours de sa croissance dans l'ovaire l'ovocyte synthétise et accumule des ARN qu'il utilisera au cours des étapes ultérieures de maturation, d'ovulation, de fécondation et des premières divisions embryonnaires jusqu'au stade 8/16 cellules à partir duquel l'embryon générera ses propres ARN. Les ARN maternels stockés dans l'ovocyte reflètent donc le potentiel de développement embryonnaire. Ceci a suscité un effort de recherche important au cours de la dernière décennie. Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle unique de vaches montbéliardes phénotypées sur la qualité de leurs ovocytes (Guyader-Joly *et al.*, 2007) : nous avons mis en œuvre une analyse de génomique expressionnelle comparée entre des ovocytes issus de deux groupes d'animaux extrêmes présentant des taux de développement embryonnaires contrastés et mis en évidence des gènes différentiels, dont la liste a été analysée en regard des QTL connus de fertilité femelle.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. COLLECTE D'OVOCYTES ET PHENOTYPAGE

Treize vaches montbéliardes ont été soumises à traitement de stimulation ovarienne et les ovocytes collectés par ovum-pick up sur des follicules de 3-6 mm environ 48 h avant le pic de LH. Les ovocytes de qualité 1 à 3 (non dénudés) ont été sélectionnés pour maturation puis fécondation in vitro (JO). Les embryons ont été cultivés in vitro sur tapis de cellules vero, les taux d'embryons clivés et d'embryons développés (morulae/blastocystes) évalués à J2 et J7 respectivement. Cinquante sessions ont été réalisées, 3 à 4 pour chaque animal. Ceci a permis d'identifier des animaux extrêmes, donneurs d'ovocytes de bonne (B) et mauvaise (M) qualité. Concernant la production d'ovocytes pour la biologie moléculaire, les animaux sélectionnés ont été soumis au même traitement de stimulation, et les ovocytes collectés soit comme ci-dessus (ovocytes immatures OI), soit 20h après le pic présumé de LH, juste avant l'ovulation (ovocytes matures OM) ; les ovocytes dont le cumulus n'était pas expansé ont été éliminés). Au total, une quarantaine de sessions d'OPU ont permis de collecter le matériel biologique nécessaire.

1.2. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE

L'ARN des ovocytes a été extrait de pools de 15 ovocytes par stade pour chacun des six animaux extrêmes (3 donneuses B et 3 donneuse M). Après double amplification avec le kit RiboAmp (Arcturus), la quantité et la qualité de ces ARN amplifiés ont été contrôlées par mesure de la densité optique et microélectrophorèse (Bionalyzer®, Agilent). Les sondes ont été marquées en Cy5 ou Cy3 avec le kit ULS aRNA labelling kit (Kreatech, Amsterdam, Pays-Bas). Pour chaque stade, chacun des 3 échantillons de donneuses B est hybridé en dye-swap contre deux échantillons issus de donneuses M, soit douze lames. La puce à ADN est une puce 22k produite par le CRB (INRA Jouy-en-Josas). L'analyse quantitative des lames a été réalisée grâce au logiciel Genepix®. Pour l'analyse statistique, le package Limma a été appliqué, avec une correction de Benjamini-Hochberg (BH) ou Bonferroni au seuil de 5%. L'analyse fonctionnelle des gènes différentiels a été faite avec DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) en utilisant la totalité de la puce 22k comme référence.

2. RESULTATS

2.1. PHENOTYPAGE SUR LE POTENTIEL DE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Treize vaches montbéliardes ont été caractérisées sur le développement embryonnaire après collecte d'ovocytes par OPU et fécondation in vitro. Les données sont résumées dans le tableau 1. Ceci a permis discriminer les animaux V1 à V5 d'une part, et V7 à V13 d'autre part, dont les ovocytes présentent respectivement des ovocytes de bon (>34 %) ou

mauvais (<17 %) potentiel de développement, défini comme le rapport du nombre de blastocystes sur le nombre d'ovocytes inséminés.

Tableau 1 Collecte d'ovocytes par ovum-pick up et production d'embryons sur treize animaux phénotypés

animal	nb de sessions	ovocytes		taux de développement	
		collectés	inséminés	% d'inséminés	% de clivés
V1	4	23,0±3,6	19,0±2,1	58%	59%
V2	4	10,0±2,6	7,8±2,4	55%	57%
V3	4	8,5±3,0	8,0±2,9	44%	58%
V4	4	22,8±8,7	19,5±6,0	36%	38%
V5	4	17,5±3,4	14,0±4,1	34%	36%
V6	4	8,0±4,1	7,5±3,5	20%	32%
V7	4	20,8±4,6	19,0±2,9	17%	21%
V8	3	20,3±5,1	18,7±5,7	16%	21%
V9	3	16,3±5,0	12,3±5,9	16%	19%
V10	4	9,0±5,8	8,0±5,7	16%	22%
V11	4	14,0±5,2	12,3±6,2	10%	17%
V12	4	8,8±2,1	8,0±2,4	9%	14%
V13	4	9,3±3,3	8,8±3,9	0%	0%

2.2. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE

Les ARN maternels des animaux V1, V2 et V4 ont été comparés aux ARN maternels des animaux V7, V11 et V13 aux deux stades immature et mature. Après analyse statistique et correction BH au seuil de 5%, environ 1400 et 2200 sondes apparaissent différentielles entre ovocytes présumés de bonne et mauvaise qualité aux stades immature et mature respectivement. Les nombres sont d'environ 100 et 200 lorsque l'on applique la correction plus stringente de Bonferroni au seuil de 5%. Les résultats détaillés sont présentés dans le tableau 2. Parmi ces oligonucléotides différentiels, 569 (BH5%) et 23 (Bonferroni 5%) sont communs aux deux stades ; parmi eux, une petite minorité varie dans un sens opposé aux deux stades. Environ deux tiers de ces oligonucléotides différentiels ont une annotation fiable c'est-à-dire que le gène correspondant est identifié. Des analyses fonctionnelles (Gene Ontology) ont été mises en œuvre. Les gènes différentiels sont préférentiellement impliqués dans plusieurs fonctions parmi lesquelles la gamétogenèse, la reproduction, le métabolisme des acides nucléiques et le métabolisme cellulaire.

2.3. ANALYSE EN REGARD DES QTL DE FERTILITE

Les gènes différentiels ont été positionnés sur le génome bovin, et leur localisation a été analysée en regard des QTL (quantitative trait loci) de fertilité femelle (collaboration S. Fritz et A. Capitan.). Il ne s'agit pas ici d'identifier des QTL, mais de repérer des gènes potentiellement impliqués dans la qualité ovocytaire et probablement conservés entre races, aussi nous avons considéré l'ensemble des QTL dans les trois principales races laitières françaises, Holstein, Normande et Montbéliarde. Pour chaque stade et chaque sens de variation, de l'ordre d'une centaine ou d'une dizaine de gènes différentiels (après correction de BH ou Bonferroni au seuil de 5% respectivement) correspondent à des gènes situés dans des QTL de fertilité et présentant un LRT>10 (likelihood ratio test). Les résultats sont détaillés dans le tableau 3.

Tableau 3 Nombre de gènes différentiels situés dans des QTL de fertilité femelle

		B > M	B < M
OI	BH 5%	108	123
	Bonferroni 5%	5	11
OM	BH 5%	180	149
	Bonferroni5%	14	18

Tableau 2 Nombre d'oligonucléotides différentiels entre ovocytes de potentiel de développement bon (B) et mauvais (M), aux stades immatures (OI) et matures (OM)

stade	correction statistique	gènes surexprimés chez les B (annotés)			gènes surexprimés chez les M (annotés)		
		B>M	dont B>1,5M	dont B>2M	B<M	dont B<0,66M	dont B<0,5M
OI	BH 5%	658 (471)	44 (36)	5 (2)	797 (563)	72 (52)	9 (7)
	Bonferroni 5%	31 (22)	21 (17)	4 (1)	54 (38)	38 (28)	7 (6)
OM	BH 5%	1238 (870)	102 (64)	9 (9)	974 (693)	106 (93)	13 (13)
	Bonferroni 5%	82 (46)	52 (26)	4 (4)	114 (91)	73 (65)	12 (12)

3. DISCUSSION

Ce travail présente une étude originale sur le phénotypage fin de vaches sur le potentiel de développement embryonnaire de leurs ovocytes, et sur la comparaison du transcriptome d'ovocytes extrêmes sur ce critère. En particulier, la collecte d'ovocytes matures par OPU représente un phénotype d'intérêt particulier, du fait de la compétence de développement plus élevée de ces ovocytes par rapport aux ovocytes collectés au stade immature et mis en maturation *in vitro*. Peu d'approches ont utilisé ce prélèvement biologique (Thelie et al., 2007 ; Katz-Jaffe et al., 2009 ; Tesfaye et al., 2009), et la collecte d'ovocytes mature n'a jamais été associée au phénotypage des femelles par rapport à leur potentiel de production. En effet, une quarantaine de sessions d'OPU ont été nécessaires pour la collecte des ovocytes immatures et matures. Sachant que les ovocytes matures prélevés par OPU permettent de doubler le taux de développement *in vitro* (Rizos et al., 2002), les modalités de superovulation et d'OPU testées dans ce projet constituent une amélioration possible de la technique dans un cadre commercial.

Les phénotypes observés dans cette étude sont basés sur la classification des vaches selon leur potentiel de production d'embryons, avec des potentiels variant entre 0 et 58 %. Ces valeurs extrêmes sont comparables à celles rapportées par Heyman et al. (2003). Le taux moyen d'embryons développés (22%) est du même ordre de grandeur que ceux précédemment observés après OPU-FIV, variant de 22 % à 30 % selon les auteurs (Presicce et al., 2011 ; Merton et al., 2009 ; Heyman et al., 2003). De même, le choix des seuils extrêmes pour la production de blastocystes est cohérent avec celui utilisé dans une approche similaire à partir d'ovaires d'abattoirs, où des seuils de 20 et 50 % ont été retenus (Huang et al., 2010).

L'analyse a été menée sur des ovocytes aux stades immature et mature prélevés par OPU : le transcriptome au stade immature représente le stock d'ARN maternels constitué en fin de croissance ovocytaire, tandis que le transcriptome au stade mature peut être vu comme un premier bilan de l'utilisation des ces ARN en vue de la fécondation. Globalement, il ressort de l'étude transcriptomique un nombre assez important de gènes différentiels, mais des amplitudes de variation modérées, reflétant la proximité des situations biologiques. Les gènes présentant les variations les plus importantes (jusqu'à quatre fois) pourront, après validation par qPCR sur des échantillons indépendants, être considérés comme des marqueurs potentiels de la qualité ovocytaire utilisables dans une approche prospective. Il est également probable que des gènes distincts sont affectés chez chaque individu, qui ne sont donc pas directement révélés dans cette étude, mais que ces gènes distincts convergent vers des voies de signalisation communes qui elles sont mises en évidence.

Le phénotype associé au taux de développement embryonnaire est potentiellement intéressant pour la sélection génétique, puisque des hérédités modérées ont été rapportées pour les nombres d'ovocytes collectés par OPU et nombre d'embryons produits (0,16 à 0,25) et des valeurs un peu plus faibles pour les taux de développement embryonnaire (0,10 ; Merton et al., 2009). D'après cet auteur, les index estimés pour ces nouveaux caractères ne sont pas

associés à l'index de fertilité femelle associé à des taureaux. Néanmoins, dans notre étude, logiquement, les animaux à faible potentiel de développement embryonnaire ont un index de fertilité bas, à l'inverse, les animaux à fort potentiel de développement embryonnaire ont des index très variables, leur reproduction pouvant être altérée à un autre niveau (résultats non publiés). Il a été possible d'associer plusieurs gènes différentiels à certains QTL de fertilité : aux stades immatures et matures respectivement, 231 et 329 gènes différentiellement exprimés entre les ovocytes des donneuses présentant un potentiel de développement embryonnaire bas ou élevé sont situés sur des QTL de fertilité. Récemment, Huang et al. (2010) ont identifié 5 SNPs situés sur les chromosomes 1, 8, 12 13 et 16, associés aux taux de développement *in vitro* (après collecte d'ovocytes immatures sur ovaires d'abattoir). Nous ne retrouvons pas toutes ces régions dans notre étude, ce qui n'est pas contradictoire dans la mesure où i) d'une part notre étude est une analyse de génomique expressionnelle, qui compare le niveau des ARN maternels, tandis que Huang et al. ont mené une approche de génétique ; ii) d'autre part, nos observations ont été réalisées en race Montbéliarde alors que l'étude de Huang concerne des vaches Holstein. Nous identifions néanmoins deux gènes différentiels à moins de 1 mégabase du SNP identifié sur le chromosome 12.

CONCLUSION

L'approche pluri-disciplinaire originale mise en œuvre pour cette étude, combinant des données de phénotypage, de génétique et de génomique expressionnelle, a permis de générer une liste restreinte de gènes d'intérêt pour une utilisation potentielle dans le cadre de la sélection génomique.

Ce travail est associé au programme Ovogenae2 (ANR-07-GANI-004) soutenu par l'ANR et ApisGene. Il entre dans le cadre d'une thèse CIFRE financée par l'UNCEIA.

Guyader-Joly, C., Ponchon, S., Gonzalez, C., Marquant-Le Guienne, B., Clément, F., Dalbies-Tran, R., Mermillod P., Humblot P., 2008. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 131-132
 Huang, W., Kirkpatrick, B.W., Rosa, G.J.M., Khatib, H. 2010. *Animal Genetics*, 41 : 570-578.
 Katz_Jaffe, M.G., McCallie B.R., Filipovits, J., Gardner, D.K. 2009. *Theriogenology*. 71 :939-946.
 Heyman, Y., Tamassia, M., Richard, C., Renard, J.P., Chastant-Maillard, S. 2003 *Theriogenology*, 60(5):891-900
 Merton, J.S., Ask, B., Onkundi, D.C., Mullaart, E., Colenbrander, B., Nielen, M.. 2009. *Theriogenology*, 72(7):885-93
 Presicce GA, Xu J, Gong G, Moreno JF, Chaubal S, Xue F, Bella A, Senatore EM, Yang X, Tian XC, Du F. 2011, *Vet Med Int.* Article ID 145626,
 Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., Lonergan, P. 2002. *Mol Reprod. Dev.* 61:234-248
 Tesfaye, D., Ghanem, N., Carter, F., Sirard, M.A., Hoelker, M., Schellander, L., Lonergan, P. 2009 *Reprod. Fertil. Dev.*, 21:451-461.
 Thelie, A., Papillier, P., Pennetier, S., Perreau, C., Martin Traverso, J.M., Usbekova, S., Mermillod, P., Joly, C., Humblot, P., Dalbies-Tran, R. 2007. *BMC Dev Biol* 7:125.

